

**SİĞİR VE TAVUK KIYMALARINDAKİ
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS VARLIĞI VE
KONTAMİNASYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ**

Gözde ERŞAN

BESİN\GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Şebnem PAMUK**

**TEZ NO: 2011-23
2011-Afyonkarahisar**

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİĞİR VE TAVUK KIYMALARINDAKİ *CLOSTRIDIUM*
PERFRINGENS VARLIĞI VE KONTAMİNASYON
DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ**

Gıda Mühendisi
Gözde ERŞAN

BESİN\GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Şebnem PAMUK

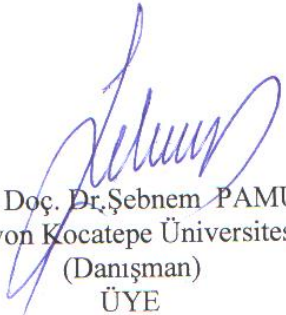
TEZ NO: 2011-23
2011 – AFYONKARAHİSAR


KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Besin\Gıda Hijyeni Ve Teknolojisi Anabilim Dalı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/11/2011


Yrd. Doç. Dr. Şebnem PAMUK
Afyon Kocatepe Üniversitesi
(Danışman)
ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Zeki GÜRLER
Afyon Kocatepe Üniversitesi
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM
Erciyes Üniversitesi
ÜYE

Besin\Gıda Hijyeni Ve Teknolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gözde ERŞAN'ın "Sığır Ve Tavuk Kıymalarındaki *Clostridium perfringens* Varlığı ve Kontaminasyon Düzeyinin Belirlenmesi" Başlıklı Tezi 01.12.2011.Günü Saat.12:30'Da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü
Prof. Dr. İsmail BAYRAM

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ders ve uygulama dönemlerimde tecrübe ve birikimlerini benden esirgemeyen, kıymetli vaktini ayıran değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Şebnem PAMUK'a şükranlarımı sunarım. Üç senelik yüksek lisans hayatım boyunca maddi manevi desteğini fazlasıyla bana sunan gece gündüz benim için koşturan abim Arş. Grv. Koray ÇELİKELOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Grv. Ulaş ACARÖZ'e, Laborant Fahriye KAN'a, Vet.Hek. Özgür SEPİN'e, Biyolog Fahriye ZEMHERİ'ye, istatistiki çalışmalarında yardımcı olan Arş. Grv. İlkay DOĞAN'a ve ayrıca 10.VF.11 numarasıyla bu çalışmayı destekleyen A.K.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca numune toplamamda yardımcı olan ve hafta sonları laboratuvara gidip gelmemde bana yardımcı olan, beni bekleyen; zamanlarını, sabırlarını, maddi manevi bütün ihtiyaçlarımı karşılayan annem Kadriye ÇELİKELOĞLU'na ve babam Eray ÇELİKELOĞLU'na şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar.....	vi
Resimler.....	vii
Tablolar.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
1.2. <i>Cl. perfringens</i> ' in Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri.....	4
1.3. <i>Cl. perfringens</i> ' in Virülens Faktörleri.....	7
1.3.1. <i>Cl. perfringens</i> ' in Toksin Tipleri.....	8
1.3.2. Enterotoksinin Biyokimyasal Özellikleri.....	10
1.4. <i>Cl. perfringens</i> Kaynaklı Gıda İntoksikasyonları.....	10
1.5. <i>Cl. perfringens</i> ' in Gıdalardaki Varlığı.....	18
1.6. <i>Cl. perfringens</i> ' in Saptanması.....	22
1.7. Korunma ve Kontrol.....	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1. Gereç.....	27
2.1.1. <i>Cl. perfringens</i> ' in İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besi Yerleri ve Ayıraçlar.....	27
2.2. Yöntem.....	31
2.2.1. Zenginleştirme.....	33

2.2.2. Katı Besi Yerine Ekim.....	34
2.2.3. <i>Cl. perfringens</i> ' in İdentifikasyonu.....	36
2.2.3.1. Gram Boyama ve Mikroskopik Bakı.....	36
2.2.3.2. Katalaz Testi.....	37
2.2.3.3. Nitrat- Motilite Testi.....	37
2.2.3.4. Laktoz Jelatin Testi.....	38
2.2.3.5. Reverse-CAMP Testi.....	39
2.2.3.6. Asit Fosfataz Testi.....	41
3. BULGULAR.....	43
4. TARTIŞMA.....	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
6. KAYNAKLAR.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
aw	Su aktivitesi
β	Beta
CPE	<i>Clostridium Perfringens</i> Enterotoxin Geni
En ^b	Enterotoksin
E	Epsilon
δ	Gamma
ι	İota
κ	Kappa
kob	Koloni oluşturan birim
μ	Mikron
μm	Mikrometre
mg	Miligram
g	Gram
MID	Minimal İnfeksiyon Dozu
Nm ^a	Nöraminidaz ve sialidaz
Nm	Nöraminidaz
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
θ	Theta

RESİMLER

Resim 2.1. <i>Cl. perfringens</i> 'in TGM'de gaz oluşturan tipik görünümü.....	34
Resim 2.2. <i>Cl. perfringens</i> kolonilerinin TSC agardaki tipik görünümü.....	35
Resim 2.3. <i>Cl. perfringens</i> kolonilerinin TSC agardaki tipik görünümü.....	35
Resim 2.4. <i>Cl. perfringens</i> ' in mikroskoptaki tipik görüntüsü.....	37
Resim 2.5. <i>Cl. perfringens</i> ' in Nitrat Motilite Medyumdaki tipik görüntüsü (hareket negatif).....	38
Resim 2.6. <i>Cl. perfringens</i> ' in dışında bir mikro organizmanın Nitrat Motilite Medyumdaki görüntüsü (hareket pozitif).....	38
Resim 2.7. <i>Cl. perfringens</i> ' in Nitrat Motilite testi pozitif ve negatif örnekleri.....	38
Resim 2.8. Laktoz fermentasyon ve Jelatini sıvılaştırma testi.....	39
Resim 2.9. Reverse – CAMP Testi.....	40
Resim 2.10. <i>Cl. perfringens</i> ' in UV lambası altındaki tipik görüntüsü.....	41
Resim 2.11. <i>Cl. perfringens</i> ' in UV lambası altındaki tipik görüntüsü.....	42
Resim 2.12. <i>Cl. perfringens</i> ' in UV lambası altındaki tipik görüntüsü.....	43

TABLULAR

Tablo 1.1. <i>Cl. perfringens</i> 'in üreme koşulları.....	5
Tablo 1.2. <i>Cl. perfringens</i> 'e ait toksin tiplerinin genetik lokalizasyonu.....	7
Tablo 1.3. <i>Cl. perfringens</i> 'in toksinleri.....	8
Tablo 1.4. <i>Cl. perfringens</i> 'in tiplerine göre toksinleri.....	9
Tablo 1.5. <i>Cl. perfringens</i> ' den kaynaklanan gıda infeksiyonu ile enteritis nekrotikansın patojenitesi.....	11
Tablo 2.1. <i>Cl. perfringens</i> 'in izolasyon ve identifikasyon şeması.....	32
Tablo 2.2. <i>Cl. perfringens</i> 'in identifikasyonu için uygulanan testler.....	33
Tablo 3.1. Örneklerin alındığı yer ile <i>Cl. perfringens</i> bulunma ilişkisi.....	43
Tablo 3.2. Örneklerin türü ile <i>Cl. perfringens</i> 'in bulunma ilişkisi.....	44
Tablo 3.3. Örneklerin alındığı zaman ile <i>Cl. perfringens</i> 'in bulunma ilişkisi.....	44
Tablo 3.4. Aylara göre kıyma örneklerinde <i>Cl. perfringens</i> bulunma yüzdeleri.....	45
Tablo 3.5. Aylara göre kıyma örneklerinde <i>Cl. perfringens</i> bulunma yüzdeleri.....	46
Tablo 3.6. <i>Cl. perfringens</i> 'in kasap ve şarküterilerdeki bulunma yüzdeleri.....	47

ÖZET

Türkiye’de analiz edilen et ve et ürünlerinin değişik mikroorganizmalar ile kontaminasyon düzeyinin çok yüksek olduğu, gıda infeksiyon ve intoksikasyonları oluşturabilecek patojen mikroorganizmaları içerdiği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda mezbaha ve et işletmelerinde sanitasyon ve hijyenik koşulların yeterli düzeyde olmadığı, etlerin çekilmesi, karıştırılması ve parçalanması gibi işlemler sırasında kullanılan ekipman ve personelin özellikle kıymaların çapraz kontaminasyonuna neden olduğu bildirilmektedir. Personel, alet ve ekipman hijyeninin yeterli olmadığı kesimhane ve et işletmelerinde, insan ve hayvan bağırsak florasında bulunan *Cl. perfringens* ile doğal çevrede yaygın olarak yer alan spor formları ürünleri kolaylıkla kontamine ederek gıda kaynaklı infeksiyon oluşum riskini artırmaktadır.

Bu çalışmada, sığır ve tavuk kıymalarındaki *Cl. perfringens*’in varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi amaçlanmış, 2011 yılının Nisan, Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında Afyonkarahisar’ın değişik kasap ve şarküterilerinden satın alınan 100 (50 tavuk kıyma ve 50 sığır kıyma) örnek materyal olarak kullanılmıştır. Örnekler soğuk zincir altında laboratuara getirilerek analizleri yapılmış, örneklerdeki *Cl. perfringens* kontaminasyonu EMS (En Muhtemel Sayı Yöntemi) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Toplam 100 adet kıyma örneğinde (50 sığır kıyma, 50 tavuk kıyma) *Cl. perfringens* varlığı araştırılmıştır. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda 50 sığır kıyma örneğinin 34’ünde (%68) (ortalama 4.9 MPN/g), 50 tavuk kıyma örneğinin 27’sinde (%54) (ortalama 3,5 MPN/g) olmak üzere, toplam 100 örneğin 61’ inden (%61) (ortalama 4.2 MPN/g) *Cl. perfringens* tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, tavuk kıyma ve sığır kıyma örneklerinin 3.0 ile 20.0 MPN/g arasındaki düzeylerde *Cl. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Clostridium perfringens*, sığır kıyma, gıda zehirlenmesi, halk sağlığı, tavuk kıyma.

ABSTRACT

It was reported that meat and meat products which were analyzed in Turkey were contaminated with high level of different microorganisms and could contain patojen microorganisms, which cause food infections and intoxications. Performed studies indicated that sanitation and hygienic conditions were not sufficient in slaughter houses and meat plants and personel and the used equipment cause cross-contamination during mincing, mixing and chopping of meat. *Cl. perfringens* which is found in intestinal flora of human and animal and spor forms of it widely exist in natural enviroment , could easily contaminate products in the meat plants and slaughter houses where personel, tools and equipment hygiene is not enough. This condition increases the risk of foodborne infections.

The aim of this study is to detect the occurence and the level of *Cl. perfringens* in minced meat of beef and chicken. 100 samples (50 minced meat of chicken and 50 minced meat of beef) were used as study material, which were brought from Afyonkarahisar's different Butchers and delicatessens. Samples were taken to laboratory under cold chain then analysis performed. Contamination of *Cl. perfringens* in samples were detected by using MPN (Most Probable Number) method.

Totally 100 samples (50 of them minced meat of beef and 50 of them minced meat of chicken) were analyzed to determine *Cl. perfringens*. After laboratory analysis, *Cl. perfringens* was detected in 34 samples (68%) (average 4.9 MPN/g) of the 50 minced meat of beef, in 27 samples (54%) (average 3.5 MPN/g) of minced meat of chicken, it was detected in 61 samples (61%) (average 4.2 MPN/g) of 100 samples.

As a result, It is detected that minced meat of chicken and beef samples were contaminated with *Cl. perfringens* between 3.0 and 10.0 MPN/g.

Key words: *Clostridium perfringens*, foodborne, ground chicken, minced meat, public health.

1.GİRİŞ

İnsanların yaşamsal, fiziksel ve mental gelişimlerini sağlamak için yeterli gıda tüketmeleri ve tüketilen gıdaların sağlık yönünden güvenli olması gerekmektedir. Hayvansal gıdalardan et; bir taraftan içerdiği esansiyel amino asitler, vitaminler, mineraller ve bazı büyüme faktörleri ile insan beslenmesinde büyük öneme sahipken, diğer taraftan mikroorganizmaların gelişimleri için iyi bir ortam olduğu bilinmektedir (İşeri ve Erol, 2009). Besleyici değeri yüksek pahalı bir ürün olan kıyma her türlü ticari hileyi gizleyebildiğinden sık sık eleştirilere de hedef olmaktadır (Gracey ve ark., 1999).

Özellikle bazı patojen mikroorganizmaların, hayvanların doğal bağırsak mikroflorasında ve çevresel kaynaklarda bulunarak kesim işlemini takiben çiğ etin kontaminasyonuna neden olduğu, ayrıca etlerin parçalanması işlenmesi, paketlenmesi, muhafazası ve taşınması sırasında meydana gelen çapraz kontaminasyonlar ile de son ürüne geçip insan sağlığını tehdit ettiği bildirilmektedir (İnal, 1992). Az gelişmiş ülkelerde su ve gıdaların neden olduğu ishaller hastalıklar nedeniyle her yıl, çoğunu çocukların oluşturduğu 1.8 milyon kişinin hayatını kaybettiği kaydedilmiştir (Anon, 2006b).

Dünyada ortaya çıkan ve önemli halk sağlığı sorunları ile büyük ekonomik kayıplara neden olan gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarının oluşumunda, başta et ve et ürünleri olmak üzere hayvansal gıdaların büyük önem taşıdığı ve bazı patojenlerin de bu olaylardan sorumlu tutulduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda, toplam gıda zehirlenmelerinin % 54.7'sinin et ve et ürünlerinin tüketilmesi ile ortaya çıktığı ve bu zehirlenmelerin önemli bir bölümünden *Clostridium perfringens* (*Cl. perfringens*)'in sorumlu olduğu kaydedilmiştir (Labbe, 1989; Diane ve ark., 2010). Ubiquiter bir mikroorganizma olduğu için kırmızı et ve kanatlı etinde spor

oluşturması açısından potansiyel tehlike olarak kabul edilmektedir (Brynstad ve Granum, 2002). USDA (United States Department of Agriculture) Araştırma Servisi, Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda zehirlenmelerine yol açan en önemli iki patojenin *Salmonella* spp. ve *Cl. perfringens* olduğunu ve bu iki patojenin esas kaynağının tavuk ve hindi etleri olduğunu rapor etmiştir (Anon, 2005b).

Besin zehirlenmesinin nedenleri etiyolojik olarak sıralandığında *Cl. perfringens*'in ilk sıralarda yer aldığı, bu bakteriye rastlanmasının fekal kontaminasyonun göstergesi olduğu, genellikle çok sayıda kişiye hizmet veren kuruluşlarda görüldüğü belirtilmiştir. Sorumlu gıda türlerinin daha çok proteinli gıdalar (kırmızı et, tavuk eti ve et suları) olduğu bildirilmiştir (Dorman ve ark., 2010).

Cl. perfringens ile ilgili ilk gıda kaynaklı zehirlenme olgusu Klein tarafından 1895 yılında öne sürülmüştür. Ancak; *Cl. perfringens*'in tam olarak tanımlanması II. Dünya savaşı sonrasında gerçekleşmiştir (Hans, 1999).

Eski adı *Clostridium welchii* olan *Clostridium perfringens* Amerikalı bakteriyolog Welch tarafından, ciddi yara infeksiyonları ile gazlı gangrene neden olan bir bakteri olarak 1987 yılında, gıda infeksiyonu etkeni olarak ise 1940 yılında tanımlanmıştır (Erol, 2007). İngiltere'de 1953 yılında yaşanan bir dizi salgın sebebiyle yapılan araştırmada, zehirlenmelere yol açan mikroorganizmalar belirlenmiş, Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşanan salgınların yaklaşık % 10'unun *Cl. perfringens* kaynaklı olduğunu tespit etmişlerdir (Hans, 1999). İnsanlarda etkenin A tipinden kaynaklanan enteritis ile C tipinden kaynaklanan nekrotik enteritis bulgularına (pig-bel, Darmbrand) rastlanmaktadır. Bunun yanında *Cl. perfringens* kaynaklı infeksiyonların yumuşak seyirli olmasına bağlı olarak, tanımlanmayan ve rapor edilmeyen olgu sayısının oldukça yüksek olduğu tahmin edilmektedir (Erol, 2007). Etkenin, hayvanlarda da başta enterotoksemi olmak üzere önemli infeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Erol, 2007; Anon, 2011a).

Cl. perfringens 1943 yılında İngiltere’de tavuk etinden hazırlanan yemeği tüketen okul çocuklarında, ilk kez gıda enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanmıştır (Gross ve ark., 1989). Patojenitesi ve toksijenitesi yüksek olan *Cl. perfringens*’in, içme sularında virüs ve protozoal kistlerin inaktivasyonu için uygulanan işlemlerde indikatör mikroorganizma olarak kullanıldığı da bildirilmektedir (Eisgruber ve ark., 2000).

Cl. perfringens sporlu bir bakteri olup toprakta, insan ve birçok sıcakkanlı hayvanın doğal bağırsak florasında bulunmaktadır (Güneş ve ark., 2004). Doğada yaygın bulunabilen bu mikroorganizma sporlu olmasından dolayı gıda işletmelerinde sıklıkla problemlere yol açmaktadır. Özellikle toplu gıda tüketimi yapılan yerlerde görülen gıda kaynaklı enfeksiyon olgularında *Cl. perfringens*’in önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir. Kurallara uygun olarak yapılan temizlik ve dezenfeksiyon, bu etkenin neden olduğu gıda enfeksiyonlarının kontrolünde önem taşımaktadır. Son yıllarda ölümlerle sonuçlanan olguların sıklıkla bildirilmesi, *Cl. perfringens*’in gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önemini ortaya koymaktadır (Brynestad ve Granum 2002; Todd, 1997).

Kırmızı et ile kanatlı eti ve ürünlerinde spor oluşturması açısından potansiyel tehlike olarak kabul edildiği için, son yıllarda et ve et ürünlerinin tüketimi sonucu meydana gelen gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olan mikroorganizmalar arasında en önemlilerinden birisinin *Cl. perfringens* olduğu bildirilmektedir (Sofos, 2005; Riley ve ark., 1999; Labbe ve Duncan, 1977). Gıda üretimi ve gıda çeşitliliğinin artmasıyla birlikte, hazır gıda tüketiminin de çoğalması, gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere dünyada gıda kaynaklı zehirlenme olgularında artışta sebep olmaktadır. Hafif seyretmekle birlikte ölümlerle de sonuçlanabilen bu vakaların, aynı zamanda gıdaların israfı ve hastane masrafları gibi sebeplerle de ülke ekonomisini ciddi şekilde etkilediği belirtilmektedir (Lindström ve ark., 2010).

Bu çalışmada, sığır ve tavuk kıymalarındaki *Cl. perfringens*’in varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

1.2. *Cl. perfringens*'in Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri

Cl. perfringens, *bacillaceae* familyasından olup, Gram-pozitif, çubuk formda, spor oluşturabilen, polisakkarit yapıda kapsüle sahip, mezofilik bir mikroorganizmadır (Merril ve ark., 2006; Nakamura ve ark., 2004; Shimizu ve ark., 2002). Etken, katı besi yerinde düzenli, yuvarlak, hafif opak ve parlak koloni meydana getirmektedir. Koloniler kanlı agarda genellikle hemoliz zonu oluşturmaktadır. Zonlar, alfa toksinin oluşturduğu bulanık dış zon ve theta toksinin oluşturduğu iç zon şeklindedir (Brynstad ve Granum, 2002). Boyutları 3-9/1.0-1.5 µm, sporlu, hareketsiz, katalaz (-), H₂S oluşturan, lesitinaz ve jelatinaz pozitif, nitrat indirgeme ve laktozu fermente etme özeliğine sahip bir bakteridir. *Cl. perfringens*'in anaerobik özelliği *C. botulinum*'da olduğu gibi kesin bir parametre olmayıp, düşük seviyedeki oksijen varlığında da üreyebildiği bildirilmektedir. Sporlarının büyük, oval şeklinde, santral veya subterminal lokalizasyonda olduğu, ısıya ve kurutmaya dayanıklı olduğu belirtilmektedir. Nitratı nitrite, sülfüleri sülfüre indirgelediği, üremenin başlaması için anaerobik koşullara gereksinimi olduğu kaydedilmiştir. Tanısında diagnostik test olarak laktoz fermentasyonunun kullanıldığı belirtilmektedir (Anon, 1996).

Zehirlenmede genellikle proteinden zengin gıdaların aracı olmalarının nedeni, etkenin 13–14 aminoasit ile 5–6 vitamene gereksinim duymasından kaynaklanmaktadır (Tunail, 2000). Bu nedenle en yaygın olarak et ve et ürünlerinde bulunduğu ve geliştiği bildirilmektedir. Bu heterofermentatif özeliği nedeniyle de, çoğu karbonhidratı parçalama yeteneğine sahip olduğu kaydedilmiştir (Jay, 1992). *Clostridium*'ların kendi aralarında fermentatif özellikleri ile birbirlerinden ayırt edildiği, buna göre; sakkarolitik ve proteolitik *clostridium*'lar olmak üzere iki grupta incelendiği bildirilmiştir (Erol, 1999).

Bir çok gıdada (tipik pişmiş etlerde, balık, ıstiridye, tartlar, et suyu ve soslarda) yüksek su konsantrasyonunda ve optimum 43-45⁰C, minimum 15⁰C, maksimum 52⁰C'lerde gelişebildiği saptanmıştır (Anon, 2011a; Hobbs ve Roberts, 2007). pH 5.0'ın altında ve pH 9.0'ın üzerinde gelişemeyen *Cl. perfringens*'in en iyi

gelişebildiği pH aralığının 6.0-7.5 olduğu, bu nedenle *Cl. perfringens*'in asidik koşullara *C.botulinum*'dan daha duyarlı olduğu belirtilmektedir. Hipokloritin sporlar üzerine öldürücü etkiye sahip olduğu, pH 8.5'un altındaki hipoklorit çözeltisinde ve UV ışığı altında canlılığını yitirdiği saptanmıştır (Jay, 2000). Tuz konsantrasyonunun %5-6 olduğu ortamlarda belli bir inhibisyon gözlene de üremenin ancak % 7-8 NaCl konsantrasyonunda engellendiği bildirilmiştir. Spor formlarının ise; % 21.5 NaCl'de canlılığını koruyabildiği kaydedilmiştir (Labbe, 1989). *Cl. perfringens*'in optimum a_w değerinin 0.93 – 0.97 olduğu ve zor koşullara karşı dirençli bir bakteri olduğu belirtilmiştir. Anaerobik ortamda ve ideal şartlarda 8 dakikada iki misli çoğalabilen bakterinin, zehirlenme meydana getirebilmesi için vücuda 10^5 düzeyinden fazla vejetatif formun alınması gerektiği bildirilmiştir (Hobbs ve Roberts, 2007). *Cl. perfringens* sporulasyonunun ise, pH aralığının 6-8, a_w değerinin 0,98 ve sıcaklık aralığının 35- 40⁰C arasında olduğu bildirilmiştir (Sarıgüzel, 2003). *Cl. perfringens*'in üreme koşulları Tablo 1.1.'de gösterilmiştir (Erol, 2007).

Tablo 1.1. *Cl. perfringens*'in üreme koşulları (Erol, 2007).

	Min-max	Optimal
a_w	0.93 – 0.97	0.95
Sıcaklık (°C)	14 – 50	45
pH	5 – 9	6 – 7

Vejetatif formdaki bakterilerin yüksek ısıya ve donma sıcaklıklarına duyarlı olduğu saptanmıştır. Vejetatif hücrelerin büyük bir kısmının ısı direncinin $D_{60^{\circ}C}$ de 5 dakika, sporların ısı direncinin ise suşlara göre değişken olduğu, sporların $D_{100^{\circ}C}$ değerinin 0.31-38 dakika olduğu belirtilmektedir (Adams ve Moss, 1995). *Cl. perfringens* sporlarının soğutulmuş ve dondurulmuş gıdalarda yaşayabildikleri kaydedilmiştir (Hobbs ve Roberts, 2007).

Cl. perfringens sporları ısıya dayanıklı ve ısıya hassas olanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Isıya dayanıklı sporlar 100⁰C'de 5 saat yaşayabilmektedir (Ekici ve ark., 2008).

Cl. perfringens, ürettiği toksine (alfa-beta-epsilon-iyota) göre A, B, C, D ve E olmak üzere beş farklı grupta incelenmektedir (Shimizu ve ark., 2002; Sawires ve Songer, 2006). Bu toksin tipleri (cpa) (cpb) (etx), (ia) olarak bilinen genler tarafından kodlanmaktadır. Alfa toksin (cpa) *Cl. perfringens*'in A, B, C, D ve E tipleri tarafından, beta toksin (cpb) B ve C tipleri tarafından, epsilon toksin (etxD) ise B ve D tipleri tarafından oluşturulmaktadır (Al-Khaldi ve ark., 2004). *Cl. perfringens*'in A'dan E'ye kadar olan tiplerinin üretmiş olduğu toksinlerin genetik yerleşimleri Tablo 1.2.'de gösterilmiştir. Önceleri bilinmeyen beta2 (β_2) ve (cpb2) genlerinin 1997 yılında tespit edildiği bildirilmiştir (Alphons ve ark., 2008).

Cl. perfringens'in endosporları çevre şartlarına en fazla direnç gösteren biyolojik hücre tipleridir. Isıya, kuraklığa ve birçok kimyasal dezenfektana direnç gösterebildikleri kaydedilmiştir (Johansson, 2006).

Gıdaların mikroflorasında bulunan; örneğin et ve et ürünlerindeki psikrofil mikroorganizmalar, aerob mezofil bakterilerin ve enterokokların *Cl. perfringens* üzerine kuvvetli inhibitötik etki gösterdikleri, *Cl. perfringens*'in gelişmesini ve sporların germizasyonunun NaNO₂ ile baskılanabildiği bildirilmektedir. Laboratuvar koşullarında 300 ppm NaNO₂ varlığında *Cl. perfringens*'in gelişmesini göstermediği saptanmıştır (Frazier ve Westhoff, 1989).

Tablo 1.2. *Cl. perfringens*'e ait toksin tiplerinin genetik lokalizasyonu (Brynstad ve Granum 2002; Canard ve ark., 1992).

TİP	Alfa toksin	Beta toksin	Epsilon toksin	İoda toksin	Enterotoksin
A	+	-	-	-	+
B	+	+	+	-	+
C	+	+	-	-	+
D	+	-	+	-	+
E	+	-	-	+	+
Gen	Plc	Cpb1 Cpb2	etx	iap ibp	cpe
Genetik Yerleşim	Kromozom	Plazmid	Plazmid	Plazmid	Plazmid / Kromozom

1.3. *Cl. perfringens*'in Virülens Faktörleri

Duncan ve Strong (1969) *Cl. perfringens* kaynaklı gıda infeksiyonlarının oluşumunda enterotoksinlerin oldukça önemli olduğunu bildirmişlerdir (Byrne ve ark., 2008). Değişik tip toksinleri üretmesine karşın, *Cl. perfringens* kaynaklı gıda infeksiyonlarından çoğunlukla CPE ve β toksininin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Brynstad ve Granum 2002).

Cl. perfringens'in tip A suşlarının insanlarda gazlı gangrene ve yumuşak seyirli diyareye neden olduğu kaydedilmiştir (Songer ve Sawires, 2005; Nakamura ve ark., 2004). Toksinlerin, lesitinaz (fosfolipaz) içerdiği ve bağırsak epitel hücrelerine zarar vererek etkisini gösterdiği bildirilmektedir (Brynstad ve Granum 2002). Vejetatif hücrelerin veya sporların yaralar ya da gıdalar vasıtasıyla vücuda alınmasından sonra organizmaların yerleştiği dokuda süratli bir şekilde gelişip, çeşitli

enzim ve toksinleri üreterek yerleştiği dokuyu büyük çapta tahrip ettikleri belirtilmektedir (Shimizu ve ark., 2002).

1.3.1. *Cl. perfringens*'in Toksin Tipleri

Ürettiği toksinlere göre A'dan E'ye kadar beş tipi olan *Cl. perfringens*'in tüm tiplerinin Fosfolipaz C (alfa toksin) ürettiği, fakat insandaki enfeksiyonlardan çoğunlukla Tip A toksininin sorumlu olduğu kaydedilmiştir (Rood, 1998). CPE'nin (*Cl. perfringens* enterotoksin) enfeksiyonlarındaki başlıca virülens faktör olduğu bildirilmektedir (Brynstad ve Granum 2002; McClane, 2001). *Cl. perfringens*'in tiplerine göre ürettikleri toksinler Tablo 1.3.'te gösterilmiştir.

Tablo 1.3. *Cl. perfringens*'in toksinleri (Rood ve Cole, 1991)

<i>Cl. perfringens</i>	Üretilen Toksinler											
	α	β	ϵ	ι	δ	Θ	κ	λ	μ	ν	Nm ^a	En ^b
A	+++	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
B	+	++	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C	+	++	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
D	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
	Nm ^a	nöraminidaz ve sialidaz					En ^b	enterotoksin				

α -toksinin *Cl. perfringens*'in tüm tipleri tarafından üretildiği, toksinin hücre duvarına saldırarak hücre ölümüne sebebiyet veren lesitinaz etkili bir toksin olduğu, insanlarda gazlı gangrenden, hayvanlarda nekrotik enteritis ve enterotoksemiden sorumlu olduğu kaydedilmiştir (Zhaoa ve ark, 2011; Rood ve Cole, 1991). Tripsine karşı çok duyarlı olan β -toksinin, tip B ve tip C tarafından salgılanan letal ve nekrotik özellikte, 40 kDA ağırlığında, polipeptit zincirli ve ısıya dirençli bir protein

olduğu, hayvanlarda β -toksinin, tip C'den ileri gelen enteritis nekrotikansın önemli bir faktörü olarak görev yaptığı bildirilmektedir (Adams ve Moss, 1995). Biyolojik etkisi tam olarak belirlenemeyen ϵ -toksinin α , β , γ toksinleri gibi letal ve nekrotik özellikte olduğu, genellikle tip B ve özellikle tip D tarafından salgılandığı bildirilmektedir. E tipi toksinin protoksin salgılayarak tripsine benzer şekilde bağırsak proteazlarını etkilediği ve dolaşım sisteminde emildiği, akciğer ödemi ve perikardial sıvı kaybına neden olduğu kaydedilmiştir (McDonel, 1986). Bunun yanında γ -toksinin tip E tarafından salgılanan letal etkili bir protoksin olduğu, iki bağımsız polipeptitten oluştuğu bildirilmektedir. Letal ve hemolitik özellikteki θ -toksinin etkenin tüm tipleri tarafından salgılandığı, *Cl. perfringens* kaynaklı gazlı gangren ile ilişkili olduğu, doku nekrozunda rol oynadığı belirtilmektedir (Stevens, 1987). Tip D ve Tip A tarafından oluşturulan μ -toksinin bağ dokunun önemli bir ögesi olan hyaluronik asidi azalttuğu nöraminidaz, glikoprotein, glikolipid ve oligosakkaritlerin nöraminik aside bağlanmasıyla oluştuğu ve bakterinin tüm tipleri tarafından salgıladığı bildirilmektedir. Bağ dokunun zarar görmesi veya hücre yüzeyinde yer alan reseptörlerin yıkımlanması sonucunda intoksikasyon oluşturan bir toksin tipi olduğu bildirilmektedir. *Cl. perfringens*'in değişik suşları tarafından salgılanan diğer toksinleri hemolizin δ toksini, kollagenaz κ toksini, proteaz λ toksini, nüklez δ toksini, eta ile gamma toksinleridir (Rood ve Cole, 1991). Aşağıdaki Tablo 1.4.'te gösterilmiştir.

Tablo 1.4. *Cl. perfringens*'in tiplerine göre toksinleri (Ray, 1996)

Tipler	Hastalık	Toksinler			
		alfa	Beta	epsilon	Lota
A	Gıda zehirlenmesi, gazlı gangren	+	-	-	-
B	Kuzu dizanterisi	+	+	+	-
C	Nekrotik enteritis, koyun, kuzu, domuzda enterotoksemi	+	+	-	-
D	Koyun, keçi ve sığırdada enterotoksemi	+	-	+	-
E	Patojenite şüpheli	+	-	-	+

1.3.2. Enterotoksinin Biyokimyasal Özellikleri

Cl. perfringens'in ürettiği en az 13 değişik toksininden biri olan CPE'nin 319 aminoasitten oluşan, polipeptid yapıda, 3,5 kDA ağırlığında, izoelektrik noktası 4,3 olan bir enterotoksin olduğu bildirilmiştir. Yapısında çoğunlukla serin, lösin, glutamik asid, izolösin, glisin ve tronin amino asitlerinin olduğu kaydedilmiştir (Myers ve ark., 2006). *Cl. perfringens* kaynaklı gıda intoksikasyonlarında semptomların 6–12 saat içerisinde görülmesi, CPE'nin sentezlenip serbest bırakılması için gerekli zamanı da içermektedir. CPE'nin bağırsak epitel hücrelerinin apikal membranlarında porlar oluşturarak, bağırsak hücreleri ve bağırsak villuslarını yıkımlaması için ekstra selüler Ca^{+2} iyonlarına gereksinim duyduğu belirtilmektedir (Hardy ve ark., 1999; Mahony ve ark., 1986). Diğer enterotoksinler ile karşılaştırıldığında, CPE'nin süratle hareket ederek ince bağırsak villuslarına bağlanıp villusların uçlarını yıkımladığı ve bu işlemin en az 30 dakikada gerçekleştiği saptanmıştır (Lindström ve ark., 2010; McClane ve ark., 1988).

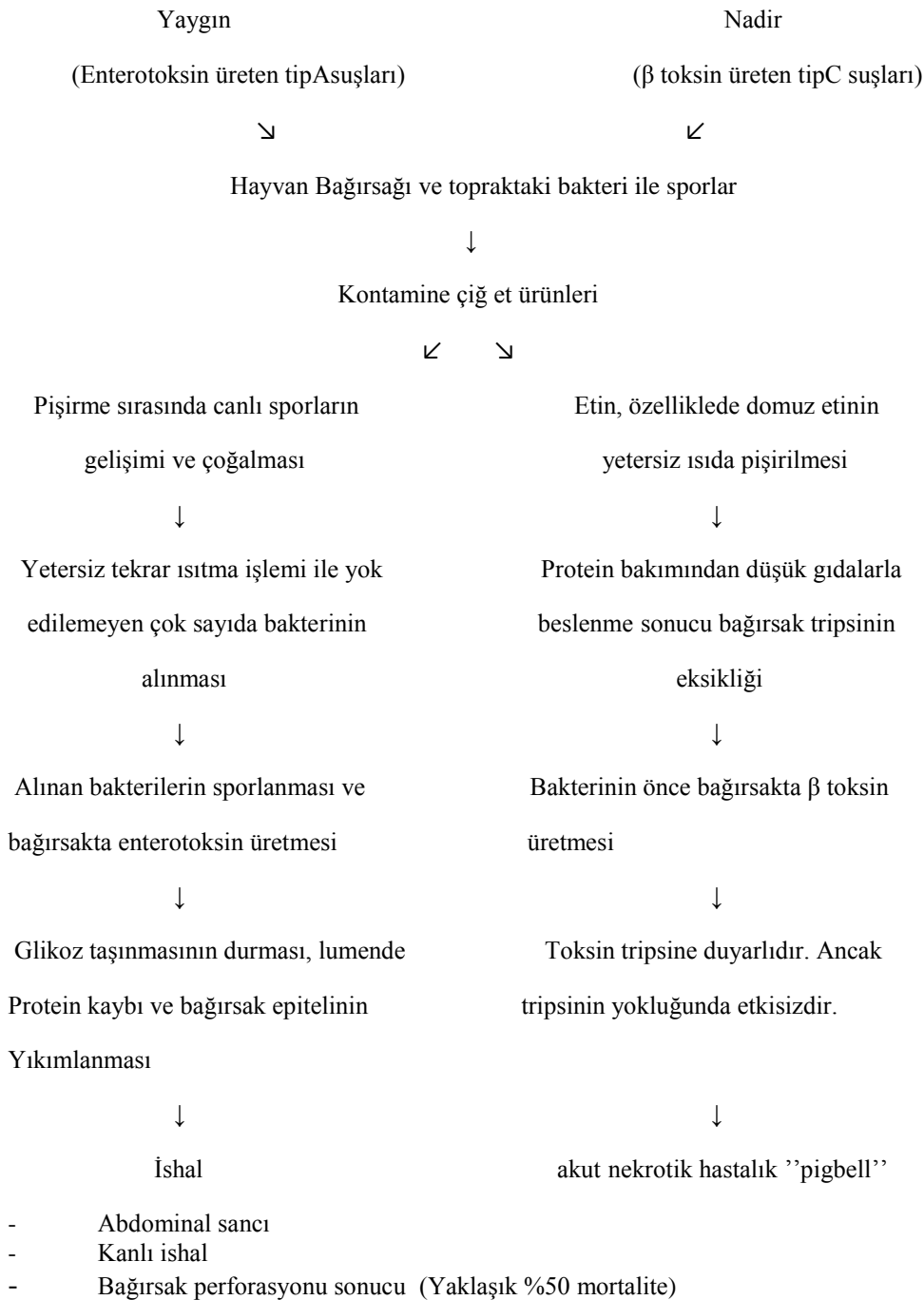
İntoksikasyon çok sayıda çoğalma eğiliminde olan enterotoksin üreten *Cl. perfringens* hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Dışkı numunesinde *Cl. perfringens* miktarının 10^6 düzeyinde olması, *Cl. perfringens* kaynaklı gıda zehirlenmesi tanısının konmasında yeterli olduğu bildirilmektedir. *Cl. perfringens* sporlarından CPE karakterizasyonunun rutin olarak yapılmadığı, çünkü CPE üretiminin sadece laboratuvar şartlarında *Cl. perfringens*'in gelişmesi için kullanılan besi yerinde üretilerek saptanabildiği kaydedilmiştir (Fact ve Popoff, 1997).

1.4. *Cl. perfringens* Kaynaklı Gıda İntoksikasyonları

Bu bakteriler toprak kökenli olup, toz, çiğ et, tavuk, insan ve hayvanların bağırsak sistemlerinde de bulunmaktadır (Huang., 2003). A, B, C, D, E tipi toksin oluşumuna göre 5 tipi bulunmaktadır. Bu toksinlerden özellikle A ve C tipi insanlar için büyük

önem taşımaktadır. Genellikle C tipi toksinin neden olduğu gıda zehirlenmeleri A tipine oranla daha fazla önemsenmektedir. Çünkü toksin A kuvvetli karın ağrısı ve şiddetli diyare oluştururken, toksin C nekrotik enterite neden olmaktadır (Tunail, 2000). *Cl. perfringens*'den ileri gelen A tipi gıda infeksiyonunun patojenitesi, C tipinden kaynaklanan gıda infeksiyonunun patojenitesi ile karşılaştırması Tablo 1.5.' de gösterilmiştir (Mims ve ark., 1993).

Tablo 1.5. *C. perfringens*'den kaynaklanan gıda infeksiyonu ile enteritis nekrotikansın patojenitesi (Mims ve ark., 1993).



Cl. perfringens ile kontamine gıdaların tüketimi sonucu etkenin bağırsak içinde toksin oluşturduğu ve belirtilerin, gıdanın alımından 2 – 36 saat (ortalama 6-12 saat) sonra başladığı (Anon, 2008), 8 ile 24 saat sürdüğü, nadir olarak da ölümlerle sonuçlandığı kaydedilmiştir (Wilson, 2005). *Cl. perfringens*'in sebep olduğu intoksikasyonun ortalama 12-48 saat içinde sonlandığı ve komplikasyonların nadir olarak şekillendiği belirtilmiştir. Etkenin infeksiyöz dozunun 10^5 kob/g'dan yüksek olması gerektiği kaydedilmiştir (Hobbs ve Roberts, 2007). Çok sayıda canlı bakterinin gıda ile alınıp, bakterilerin bağırsakta spor formlarının oluşması ve bu sırada üretilen toksinlerin hedef doku ve organları etkilemesi sonucu ortaya çıkan tablo toksin-infeksiyon olarak adlandırılmaktadır. Gıda infeksiyon ve intoksikasyonlarının çoğunda, karın ağrısı, diyare, kusma, gibi gastro intestinal sisteme ait semptomlar görülmektedir. *Cl. perfringens* kaynaklı enfeksiyonlarda da en yaygın semptom karın ağrısı ve diyare olduğu kaydedilmektedir (Erol, 2007). Vücuda 10^6 'dan fazla vejetatif hücre alınması zehirlenmeye neden olmaktadır (Juneja ve ark., 2006). Sağlıklı bireylerde *Cl. perfringens*'in sebep olduğu rahatsızlık 1-2 gün sürerken, yaşlı veya bağışıklık sistemi zayıf bireylerde daha ciddi sıkıntılara sebep olmaktadır (Rood, 1998). *Cl. perfringens*'in neden olduğu gıda kaynaklı infeksiyon ve intoksikasyonların meydana gelebilmesi için 8–10 mg toksinin bağırsaklardan alınması gerektiği bildirilmiştir (Labbe, 1989).

Yaşlı ve genç hastalarda dehidrasyonla birlikte ölüm görülebilmektedir. *Cl. perfringens* zehirlenmeleri, genellikle okul kantinleri, hastaneler, hapishaneler gibi toplu yemek tüketimi olan yerlerde sıklıkla görülmektedir. Bu bakteri, genellikle mide pH'sına duyarlı olmasına rağmen, zehirlenmeler gıdadaki vejetatif bakteri sayısı 10^5 - 10^6 kob/g düzeyinde olduğunda görülmektedir (Novak ve Juneja 2002). Isıya dirençli olan *Cl. perfringens* sporlarının, ısı işlemi sonucunda canlı kalarak uygun şartlarda vejetatif forma dönüştükleri bildirilmektedir. Organizmanın, enterotoksin sentezini sporulasyon aşamasında gerçekleştirmesi de sporulasyonun önemini arttırmaktadır. Gıda ile birlikte alınan vejetatif hücrelerin, ince bağırsaklarda sporulasyonu sırasında egzotoksijenik karakterli enterotoksin sentezledikleri ve bunun sonucunda gıda zehirlenmesine yol açtıkları bildirilmiştir. *Cl. perfringens* sporulasyonunun yeterli düzeyde olmadığı durumda yeterli miktarda enterotoksin

sentezlenemeyeceğinden *Cl. perfringens* zehirlenmesine çoğu zaman enfeksiyon tipi gıda zehirlenmeleri gurubunda yer verilmiştir (Sarigüzel, 2003).

Cl. perfringens tipA memelilerde gazlı gangrene ve insanlarda gıda zehirlenmelerine yol açan en yaygın tiptir. Gıda ile alınan vejetatif formların konakçının bağırsağında sporlanması sırasında enterotoksin üretilmesi, gıda zehirlenmelerinde oldukça önemlidir (Nakamura ve ark., 2004). İnsanlarda gazlı gangrene ve diyareye A tipi, çok daha ciddi rahatsızlık olan bağırsak iltihaplanmalarına C tipi yol açmaktadır. A tipi zehirlenmede akut karın ağrıları, mide bulantısı ve diyare gözlenir. Semptomlar genellikle 24 saat sürerken; çok yaşlı ve çok genç insanlarda su kaybına bağlı ölümlere sebep olmaktadır. C tipi zehirlenmelere gelişmiş ülkelerde çok nadir karşılaşılmaktadır. İnkübasyon peryodu 5-6 saat olup, kanlı diyare, kusma ve ciddi karın ağrılarına sebep olmaktadır. Bu semptomları ince bağırsak iltihaplanması izlemektedir (Brynstad ve Granum 2002).

A tipi gıda enfeksiyonları, kontamine gıdanın tüketilmesinden yaklaşık 8 – 12 saat sonra akut abdominal sancı, ve diyare semptomları ile başlamakta, 24 saat içinde belirtiler hafiflemekle birlikte yaşlılarda ve bebeklerde şiddetli dehidrasyona yol açmaktadır. Gıdayla alınan vejetatif formların ince bağırsağa taşınarak burada çoğalıp, sporlandığı ve enterotoksinlerini ürettiği bildirilmiştir. Enterotoksinin sporlanmış hücrelerin içinde oluştuğu ve hücrelerin lize olmasıyla ortama yayıldığı kaydedilmiştir (Rood, 1998). Bu enterotoksinin, ince bağırsak epitelyum hücrelerini morfolojik olarak yıkımladığı, epitelyum hücrelerinin villus uçlarının ayrılmasını sağlayarak, sıvı kaybına ve kramplara neden olduğu kaydedilmiştir (Collie ve McClain, 1998). Okul, hastane, kantin, yemekhane vb. toplu yemek tüketilen yerlerde büyük miktarda hazırlanarak pişirilen et ve kanatlı etleri bu tür zehirlenmenin oluşumuna önemli rol oynamaktadır (Hobbs ve Roberts, 1993; Fukushima ve ark., 1987).

C tipi gıda enfeksiyonlarının (Pig Bel, Enteritis necroticans), inkübasyon süresinin 5-6 saat olduğu, ani başlayan abdominal sancı, bazen kanlı diyare, bazen de kusmayı takiben ince bağırsaklarda nekrotik bir yangı oluşturduğu kaydedilmiştir.

Eğer hastalık tedavi edilmez ise, ölümle sonuçlanabileceği, tedavi edilir ise, mortalite oranının düştüğü bildirilmiştir. Bu tip enfeksiyonların çoğunlukla nekrotik β -toksin üretiminden kaynaklandığı, bunun yanında δ -toksin ve θ -toksinin katkısının da olduğu belirtilmiştir. Enteritis nekrotikansın çoğunlukla protein içeren etli yemeklerin tüketilmesiyle ortaya çıktığı kaydedilmiştir (Seinthorsdottir ve ark., 2000; Granum 1990; Hunter ve ark., 1993).

Florence’da (İtalya) 1976 yılında rapor edilen iki olgudan birincisinde; işlenmiş ve servis yapılmadan önce tekrar ısıtılmış hindi etininden kaynaklanan ve *Cl. perfringens*’in neden olduğu 300 ilkökul öğrencisinin etkilendiği vakada, hindi etinin depolama, pişirme sonrası taşınma sırasında uygun sıcaklıklarda muhafaza edilmemesinin zehirlenme ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Diğer olguda ise, restoranda etli sulu yemek yiyen 3 kişide; ciddi hemorajik enterit görülmüş ve 2 hafta içerisinde hayatlarını kaybettikleri kaydedilmiştir (Caroli ve ark., 1977). İngiltere Halk Sağlığı Laboratuvar Servisi Bulaşıcı Hastalık İzleme Merkezi’ne (Public Health Laboratory Service Communicable Disease Surveillance Center), 1992-1999 yılları arasında bildirilen gıda kaynaklı 1426 olgunun % 20’sinin kanatlı eti tüketiminden kaynaklandığı ve bu vakalarda 17 kişinin hayatını kaybettiği kaydedilmiştir (Kessel ve ark., 2001). Yalnızca Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) *Cl. perfringens*’den her yıl yaklaşık 250 bin insanın etkilendiği bildirilmektedir (Mead ve ark., 1999). 1998 – 2000 yılları arasında, CDC (Centers for Disease Control and Prevention) raporlarına göre *Cl. perfringens* ile ilgili 130 salgın ve 6724 vaka rapor edilmiştir (Anon, 2001b). 2000 yılında ABD’nin çeşitli eyaletlerinde 791 *Cl. perfringens* kaynaklı zehirlenme vakası rapor edilmiş, bu vakalarda; kızarmış hindi, tavuk eti, tavuk salatası, ızgara tavuk bonfile, tavuk etli Meksika böreği, sığır etinden yapılmış lazanya, et suyu, kızarmış domuz, kızarmış fasulye, mantar ve pirinç gibi gıdalar sorumlu tutulmuştur (Anon, 2000). 2003 yılında ABD’nin çeşitli eyaletlerinde 1389 *Cl. perfringens* kaynaklı zehirlenme vakası rapor edilmiş, bu vakalarda; sığır eti, güveç, hindi eti, tavuk eti, domuz eti ve mısır gibi gıdalar sorumlu tutulmuştur (Anon, 2003). Benzer şekilde, Japonya’da *Cl. perfringens* kaynaklı gıda zehirlenme olgusu kaydedilmiş, haşlanmış ıspanak ve kızarmış soya peynirinden enterotoksin tespit edilmiş ve hastalığın bu gıdalardan ileri geldiği bildirilmiştir (Miwa ve ark., 1999).

Yetersiz ısı işlemine bağlı olarak şekillenen diğer bir olgu da ABD’de bir partide ikram edilen hindi eti tüketime bağlı olarak meydana gelmiş ve 67 kişide *Cl. perfringens*’ten kaynaklanan gıda intoksikasyonu şekillenmiştir (Tezaguic ve ark., 2000).

ABD’nin çeşitli eyaletlerinde 2004 yılında, 1062 adet *Cl. perfringens* kaynaklı zehirlenme vakası rapor edilmiş, bu vakalarda; sığır eti güveci, kızarmış sığır eti, sığır etli meksika böreği, ızgara tavuk, tavuk bonfile, tavuk salatası, tavuklu meksika böreği, hindi eti, domuz eti, deniz ürünleri, tortellini iğerisindeki peynir, paneer peyniri (bir Hindistan peyniri), spagetti ve pirinç gibi gıdalar sorumlu tutulmuştur (Anon, 2004).

Cl. perfringens kaynaklı infeksiyon vakalarına ilişkin olarak, 2005 yılında 381 kişinin etkilendiği bir salgın rapor edilmiş, salgından sığır eti, sığır etli sandviç, sığır eti içeren barbekü sosu, pizola, ızgara sığır eti, sosis, hindi yemekleri, ızgara tavuk, domuz eti, kızarmış fasulye gibi gıdalar sorumlu tutulmuştur (Anon, 2005 center). Benzer şekilde, 2006 yılında hemen hemen aynı tür gıdaların tüketiminden ileri gelen ve 732 kişinin etkilendiği *Cl. perfringens* kaynaklı zehirlenme vakaları rapor edilmiştir (Anon, 2006c; Anon 2006a).

Avustralya’da, 2002 ve 2005 yılları arasında rapor edilen yaklaşık 43.000 gastroenterit vakasından ve her yıl 3 ile 8 arasında gıda kaynaklı salgından *Cl. perfringens*’in sorumlu tutulduğu kaydedilmiştir (Hall ve ark., 2005; Ozfoodnet Working Group, 2004; Ozfoodnet Working Group, 2002). Japonya’da 1987 – 1996 yılları arasında balık ve kabuklu deniz ürünleri tüketimi sonucu ortaya çıkan *Cl. perfringens*’e bağlı 5 salgın ve 868 vaka bildirilmiştir (Ozfoodnet Working Group 2004; Ozfoodnet Working Group 2003; Cato, 1998; Hall ve ark., 1962). CDC (Centers for Disease Control and Prevention) raporlarına göre, 2000 – 2006 yılları arasında, *Cl. perfringens* ile ilgili 85 salgın ve 3957 vaka rapor edilmiştir (Anon, 2009a; Anon, 2001b).

Almanya’da 1969 yılında okolata sosu yiyen 40 kişinin zehirlendiği vakada, gaita rnneklerinden 1.6×10^7 kob/g düzeyinde; 1983’de pirinçli tavuk çorbasını tüketen ve hastalanan 20 kişide 2.6×10^5 kob/g düzeyinde *Cl. perfringens* izole edildiği, ABD’de 1987 yılında hindi etinden 86 kişinin etkilendiği ve yapılan analizler sonucunda gaita rnneklerinden 2.5×10^7 kob/g düzeyinde *Cl. perfringens* saptandığı kaydedilmiştir. Benzer şekilde İngiltere’de kıyma tüketen 58 kişinin gaita rnneklerinden *Cl. perfringens*’in saptandığı kaydedilmiştir (Sarıgzel., 2005). Florida’da (1985) bildirilen bir vakada; ıslah evindeki 276 tutukludan 74’nde *Cl. perfringens*’e bağlı birbirini izleyen 2 salgın görülmüş, bunlardan ilkinin kızarmış sığır etinden, ikincisinin de jambondan kaynaklandığı bildirilmiştir. Yemeklerin retimi ve servise sunumu incelendiğinde, etlerin pişirme işlemi sonucu yeterince soğutulmadığı, servisten önce yeterince sıcaklık uygulanmadığı ve servis boyunca uygun sıcaklıkta tutulmadığı saptanmıştır (Tavris ve ark., 1985). Almanya’da 1985 ile 1989 yılları arasında gıda kaynaklı *Cl. perfringens* infeksiyonlarının %5.4; Danimarka’da % 12.2, Finlandiya’da % 21.2, Fransa’da 7.0, İzlanda’da %7.0, Hollanda’da 9.1, İsveç’te %18.0, İngiltere’de % 8.0 oranlarında olduğu rapor edilmiştir (Mengert ve ark., 1993). Zehirlenmeye sebep olan gıdaların, daha çok ısı işlemi uygulanması sonucu yarışmacı floranın yok edildiği ve *Cl. perfringens* sporlarının canlı kaldığı gıdalar olduğu belirtilmiştir (Anderson ve ark., 1995).

ABD’nin 2006 yılında Kansas eyaletinde rapor edilen bir salgında, çalışanların önceden pişirip getirdiği yemeklerin tüketimi sonucu, kanatlı eti tüketen 21 kişide *Cl. perfringens*’e bağlı gıda intoksikasyonu grlmştir (Anon, 2006d).

ABD’nin Connecticut eyaletinde 1985 yılında, fabrika çalışanları arasında 1362 çalışandan 44’ünün etkilendiği büyük bir *Cl. perfringens* gastroenterit salgını rapor edilmiştir. Zehirlenmenin et suyundan kaynaklandığı ve et suyunun servise sunulmadan 12 – 24 saat önceden hazırlanmış, uygunsuz olarak soğutulmuş ve servis öncesinde kısa süreli ısıtmaya tabi tutularak tüketime sunulduğu bildirilmiştir (Anon, 2009b).

Cl. perfringens'in gastrointestinal hastalıklara yol açtığı 1980'li yıllardan beri bilinmektedir. Dünya üzerinde en yaygın gıda zehirlenmesi etmenleri arasındadır. 1980 'li yıllarda gıda zehirlenmeleri arasında ABD'de 3., İngiltere'de 2. sırada yer almıştır. ABD'de *Cl. perfringens* zehirlenmeleri en sıklıkla kayda geçen gıda zehirlenmeleri arasında olup, 1981 yılında ABD'de 28 salgında 1162 vaka bildirilmiştir. Yine ABD'de yılda ortalama 10-20 salgın ve her salgında onlarca hatta yüzlerce vaka bildirilmiştir. Bununla beraber pek çok salgın ve/veya bireysel hastalanmanın, dışkıda toksin analizinin yapılma zorunluğu nedeni ile kayıtlara geçirilmediği bilinmekte ve buna bağlı olarak her yıl ABD'de 10.000 *Cl. perfringens* zehirlenmesi olduğu tahmin edilmektedir (Anon, 2001a). *Cl. perfringens*, insan ve hayvanlarda birçok hastalıktan sorumlu önemli bir patojendir. Özellikle tip A tarafından insanlarda meydana gelen gıda infeksiyonu yaygın olarak görülmektedir. ABD'nde 1973-1987 yılları arasında görülen tüm gıda kaynaklı infeksiyonların %10'unu *Cl. Perfringens*'in oluşturduğu ve 12.000'den fazla kişinin hastalıktan etkilendiğini bildirmiştir (Sancak ve ark., 1993).

Galler ve İngiltere'de 1988-1991 yılları arasında meydana gelen gıda zehirlenmelerinin %24'ünün (146/611) *Cl. perfringens* kaynaklı olduğu kaydedilmiştir. Olguların çoğunda güveç, acılı ve kıymalı yemek, soğuk veya yeniden ısıtılmış beyaz et ve kırmızı etin tüketimi sonucu olduğu bildirilmiştir (Byrne ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar, mezbaha veya market bazındaki kanatlı eti ve iç organlarının ve tüketime hazır kanatlı eti ürünlerinin etken ile önemli düzeylerde kontamine olduğunu ortaya koymaktadır (Ojeniyi ve ark., 2000). Bu nedenlerle, bu tip gıda zehirlenmelerini azaltmaya yardım edecek olan hızlı soğutma, soğuk depolama gibi uygulamalar *Cl. perfringens* kaynaklı olguların azalmasında oldukça etkilidir. *Cl. perfringens* orijinli gıda zehirlenme vakaları genellikle yoğun catering yapılan restoran, hastane ve huzur evi gibi kuruluşlarda görülmüştür (Byrne ve ark., 2008).

Cl. perfringens'in gıdalara bulaşmasındaki temel kontaminasyon kaynakları; fekal kalıntılar, toz, toprak ve atık sulardır. Fekal kontaminasyon, özellikle kesim sırasında etlerin bulaşmasına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda kanatlı eti ve

ürünlerinin *Cl. perfringens* ile önemli düzeyde kontamine olduğu bildirilmiştir (İşeri ve Erol 2009; Oliveira ve ark., 2011; Anon, 2006e). *Cl. perfringens*'ten kaynaklanan gıda enfeksiyonlarına tüm dünyada yaygın olarak rastlanmaktadır. Hastalığın hafif seyirli olması ve hastalıktan etkilenenlerin çok küçük bir kısmının rapor edilmesi nedeniyle gerçek sayının rapor edilen olgu sayısının çok üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (Jay, 1992). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1983 – 1992 yılları arasında, yaklaşık 248.520 *Cl. perfringens* kaynaklı zehirlenme vakası bildirilmiş, bu hastalardan 41'inin hastanede tedavi gördüğü ve 7'sinin öldüğü bildirilmiştir (Mead ve ark., 1999).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (Anon, 2011b) verilerine göre, tüketimden birkaç gün önce pişirilmiş uygun olmayan sıcaklıklarda büyük miktarlarda muhafaza edilmiş et tüketimi kaynaklı 69 vakanın meydana geldiği kaydedilmiştir. Benzer şekilde 1970- 2003 yılları arasında 18 yolcu ve gemi mürettebatının etkilendiği bir *Cl. perfringens* olgusu bildirilmiştir. Söz konusu olgunun sebepleri olarak, kontamine çiğ materyal, yetersiz sıcaklık kontrolü, yetersiz pişirme, infekte personel, mutfakta deniz suyu kullanımı gösterilmiştir (Anon, 2011c).

1.5. *Cl. perfringens*'in Gıdalardaki Varlığı

Hayvansal gıdalar insanlarda enfeksiyon ve intoksikasyona neden olan birçok mikroorganizmanın potansiyel kaynağını oluşturmaktadır. Çünkü hayvansal gıdalar bu tür patojen mikroorganizmaların gelişebilmesi için mükemmel bir besi ortamı sağlanmaktadır. Bunun doğal bir sonucu olarak, et ve et ürünleri insanlarda meydana gelen gıda kaynaklı birçok hastalıkta en önemli gıda grubunu oluşturmaktadır. Nitekim kaynağı bilinen gıda enfeksiyonlarının % 50'sinin kırmızı et ve tavuk etinden kaynaklandığı bilinmektedir. Et ve et ürünlerinin tüketimi sonucu insanlarda gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarına neden olan patojen mikroorganizmalardan en önemlilerinin *Salmonella* spp., *S. aureus* ve *Cl. perfringens* olduğu kaydedilmiştir (Kartal, 2010; Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Kıyma haline getirilmiş etler işlenmemiş etlere göre bakteriyel bozulmaya daha duyarlıdır. Kıymanın bakteriyel kalitesi işlenmemiş etlerin bakteriyel kalitesine, üretim sırasında alınan hijyenik önlemlere, paketlenme tipine ve saklama koşullarına göre değişir. Kıyılmış etlerde hücre suyunun dışarı çıkması, etin yüzeyindeki mikroorganizma ürünlerinin dağılması, kıymanın dayanıklılık süresinin kısa olmasına ve tüketici sağlığı açısından tehlike arz etmesine sebep olabilmektedir (Westhoff ve Feldstein, 1976).

Konu ile ilgili olarak ülkemizde bir çok araştırma yapılmıştır. Tekinşen ve ark., (2001) nın Ankara'da yaptıkları araştırmada; marketlerden topladıkları kıyma örneklerinin % 35'inde *Cl. perfringens* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Sancak ve ark., (1993) Van illinde, kasap ve marketlerde tüketime sunulan 100 adet sığır ve 100 adet koyun olmak üzere toplam 200 kıyma örneğini incelemiş, sığır kıyma örneklerinin % 15'inin, toplam et örneklerinin ise % 42 oranında *Cl. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir (Sancak ve ark., 1993). Çakmak ve ark., (2006) yaptıkları çalışmada, kesimhanelerinden alınan 40 donmuş tavuk kıyması ve 40 tavuk burger örneğinden 40 tavuk kıyması örneğinin 28'inden (% 70,0) ortalama 2,6 MPN/g düzeyinde, 40 tavuk burger örneğinin yalnızca 1'inden (% 2,5) 0,36 MPN/g düzeyinde *Cl. perfringens* izole edildiğini bildirmişlerdir. Gönülalan ve Köse (2002), Kayseri ilinde et satışı yapan marketlerden rastlantısal olarak 100 sığır eti kıyması örneği incelemiş ve *Cl. perfringens* sayısını 1.8×10^4 kob/g olarak tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmalarda mikrobiyolojik yönden analizleri yapılan kıyma örneklerinin kalitesinin yeterli olmadığı ve gıda zehirlenmeleri bakımından potansiyel bir tehlike oluşturabileceği sonucuna varmışlardır (Gönülalan ve Köse, 2002). Sarıgüzel (2005), Ankara'da tüketime sunulan değişik firmalara ait 100 hindi kıyması örneğinin 58'inden (%58.0) *Cl. perfringens* izole ve idendiye edildiğini bildirmiştir.

Türkiye'de miktar ve işletme sayısı bakımından önde gelen, Afyonkarahisar'da tesis edilmiş, yüksek kapasiteli beş iş yerinde bazı mikrobiyolojik özellikler (*TAMB*, *Enterobacteriaceae*, maya-küf, *S.aureus*, *Cl. perfringens* yönünden) periyodik olarak belirlenip değerlendirilmiş, et örneklerinin % 6.67'sinde 10^1 kob/g düzeyinde *Cl. perfringens* bulunduğu bildirilmiştir. Yapılan istatistikî analizler, firmalar ve üretim

partileri arasında mikrobiyolojik içerikler açısından önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bu farklılıkların, standart olmayan üretim yöntemi, yetersiz ve farklı teknolojik ve hijyenik uygulamalar, değişik özellikte hammadde kullanımı ve starter kültür kullanılmaması gibi uygulamalardan ileri geldiği düşünülmektedir (Çon ve ark., 2002).

Kalender ve Ertaş (2004) Elazığ ilinde yaptıkları araştırmada, 8 işletmeye ait 160 adet tavuğun bağırsak içeriğini incelemiş ve örneklerin 8'inden (%5) *Cl. perfringens* izole etmişlerdir. Elde edilen izolatların 6'sı tip A olarak tiplendirilmiştir. *Cl. perfringens* tip A insanlarda gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olması sebebiyle, bu araştırma tavukların *Cl. perfringens* tip A yönünden halk sağlığı için önem taşıdığını göstermiştir.

Kamber ve ark., (2007) Kars'ta yerel marketlerden ve kasaplardan topladıkları 96 sığır kıyması örneğinde (16'sı marketlerden, 80'i kasaplardan) *Cl. perfringens* ve toksininin varlığını ELISA yöntemiyle araştırmışlardır. Örneklerin 31'inden (%32) *Clostridium* spp. izole ettiklerini ve bu 31 örnekten 17'sini de (%55) *Cl. perfringens* (2'si marketlerden, 15'i kasaplardan) olarak saptadıklarını, 17 örneğin de 13'ünden (2'si marketlerden, 11'i kasaplardan) elde edilen izolatların toksin ürettiğini bildirmişlerdir.

Ankara'nın değişik semtlerindeki marketlerden ve kasaplardan 2000 yılı Şubat–Eylül ayları arasında alınan toplam 80 hazır sığır kıyma örneğinin incelendiği çalışmada 52 örneğin 28'inin (% 53.8) marketlerden, 24'ünün (% 46.1) kasaplardan alınan örneklere ait olduğu bildirilmiştir. *Cl. perfringens* izole edilen 52 örnekten 35'inin (% 67.3) Haziran – Eylül dönemini kapsayan sıcak aylardan, 17'sinin de (% 32.7) relatif soğuk aylarda (Şubat – Mayıs) alınan örneklere ait olduğu kaydedilmiştir. İncelenen sığır kıymalarının önemli bir bölümünün *Cl. perfringens* ile kontamine olduğu saptamıştır. Örneklerin *Cl. perfringens* ile komtaminasyon düzeyinin düşük olmasına karşın, kıyma tüketiminden kaynaklanabilecek halk sağlığı riskinin önlenmesi bakımından, kıyma üretiminde gerekli tüm hijyenik ve teknik koşulların sağlanması gerektiğine dikkat çekilmektedir (Erol ve Çakmak, 2000).

Yapılan yurt dışı çalışmalarında da, *Cl. perfringens*'e ilişkin önemli veriler elde edilmiştir. Ali ve Fung, (1991) yaptıkları çalışmada, 118 sığır kıyması örneğinin 64'ünden (%54), 55 hindi kıyması örneğinin 40'ından (% 73) *Cl. perfringens* izole ettiklerini kaydetmişlerdir (Ali ve Fung., 1991). Arjantin'de yerel dükkanlarda satılan baharat örneklerinde *Cl. perfringens* varlığının araştırıldığı bir başka çalışmada, 115 örneğin 14'ünde (% 12.7) *Cl. perfringens* izole etmişler ve bu örneklerinde 4'ünün (%28.6) enterotoksijenik *Cl. perfringens* olduğu tespit edilmiştir (Aguilera ve ark., 2005). Hall ve Angelotti (1965), 262 sığır eti ve ürünlerinin 113'ünden (%43.1) *Cl. perfringens* saptadıklarını, 50 sığır eti örneğinin 35'inden (%70), 26 tavuk örneğinin 15'inden (%58) oranında *C. pefringens* izole ettiklerini kaydetmişlerdir.

Miwa ve ark., (1998) Japonya'da, her birinden 50 örnek olmak üzere sığır, domuz ve tavuk etlerinde enterotoksijenik *Cl. perfringens* varlığını ve miktarını araştırdıkları çalışmalarında, *Cl. perfringens* oranının; sığır etlerinde % 16, domuz etlerinde % 10 ve tavuk etlerinde ise % 84 olduğunu; enterotoksijenik *Cl. perfringens* oranını ise; sığır etinde % 2, kanatlı etinde % 12 ve domuz etinde % 0 olduğunu saptamışlardır (Miwa ve ark., 1999; Miwa ve ark., 1998).

Stagnitta ve ark., (2002) Arjantin'in San Luis eyaletinde; enterotoksijenik *Cl. perfringens*'in yaygınlığını araştırmak üzere; 315'i sosis, 100'ü hamburger, 100'ü kıyma olmak üzere 515 örnek incelemişlerdir. Örneklerin 126'sında (% 24.46) *Cl. perfringens* izole ettiklerini, 126 örneğin 9'unun (%7.14) enterotoksijenik olduğunu bildirmişlerdir (Stagnitta ve ark., 2002). Cohen ve ark., (2008) yılında sığır kıymaları ve taze sosislerin mikrobiyel kalitesi üzerine yapılan bir çalışmada, kasap, süpermarket ve fast-food restoranlarından toplanan 150 sığır kıyması ve 100 sosis örneği incelenmiş, *Cl. perfringens*'in, baharatsız örneklerde %8.7, baharatlı örneklerde ise % 29.6 oranında izole edildiği bildirilmiştir Çalışmada kullanılan baharatlarında muhtemel bir *Cl. perfringens* kontaminasyon kaynağı olduğu kaydedilmiştir. (Cohen ve ark., 2008). Craven (2001), kanatlı kesimhanesindeki broiler karkaslarının rins örneklerinin %67'sinden *Cl. perfringens* izole ettiğini kaydetmiştir.

Singh ve ark., (2005) yaptıkları çalışmada, 70'i manda eti, 70'i keçi eti ve 71'i kanatlı eti olmak üzere 211 örnekte *Cl. perfringens* varlığını araştırmışlardır. İncelemeleri sonucunda; keçi etinde % 91.4, kanatlı etinde % 70.4, manda etinde % 65.7 oranında *Cl. perfringens* izole etmişlerdir (Singh ve ark., 2005). Lin ve Labbe (2003) tavuk örneklerinin (karkas, but, boyun) 3.05 MPN/g düzeyinde *Cl. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Wen ve Mc Clane (2004), yaptıkları çalışmada, 147 tavuk örneğinin 56'sından (%38), 68 hindi örneğinin 19'undan (%28), 83 sığır eti örneğinin 17'sinden (%21), 108 sığır kıyma örneğinin ise 25'inden (%23) sırasıyla 2-5 MPN/g, 1-19 MPN/g, 1-10 MPN/g, 3-32 MPN/g düzeylerinde *Cl. perfringens* ile kontamine olduğu bildirmişlerdir.

1.6. *Cl. perfringens*'in Saptanması

Cl. perfringens varlığının izolasyonunda çoğunlukla geleneksel metodlar kullanılmaktadır. *Cl. perfringens*'in tespitinde kullanılan analitik teknikler; reversed passive latex agglutination (tipA enterotoksin için), membran filtrasyon selektif kültür medyum (suda *Cl. perfringens*'in varlığı için) ve geleneksel metodlardan oluşmaktadır (*C. perfringens*'in gıda ve suda aranması) (Bryne ve ark., 2008). *Cl. perfringens* doğada yaygın olarak ve özellikle de çiğ gıda ve gıda içeriklerinde bulunmaktadır. Bazı durumlarda çok az sayıda etken ile kontamine gıda ve su örneklerinde *Cl. perfringens*'in kontaminasyon düzeyinin belirlenmesinde zenginleştirme işlemine dayalı klasik kültür yöntemleri de kullanılmaktadır. Zenginleştirme işleminde kullanılan besi yerleri aşağıda verilmiştir (Sarigüzel, 2005).

Chopped Liver Broth

- Trypticase Pepton Glucose Yeast Extract Broth (TPGY)
- Lactose Sulphite Medium (LS)

- Rapid Perfringens Medium (RPM)
- Perfringens Enrichment Medium (PEM: Fluid Thioglycollate Medium + D-cycloserine)
- Iron Milk Medium

***Cl. perfringens*'in izolasyon amacıyla kullanılan bazı katı besi yerleri:**

- Sulphite–Polymyxin–Sulphadiazine (SPS) Agar
- Tryptone–Sulphite–Neomycin (TSN) Agar
- Shaidi–Ferguson–Perfringens (SFP) Agar
- Oleandomycin–Polymyxin–Sulphadiazine Perfringens (OPSP) Agar
- Blood Free Pyruvate Clostridium Perfringens (BCP) Agar
- Tryptose Sulphite Cycloserine Egg Yolk (TSC) Agar
- Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar
- Sulphite Cycloserine Azid (SCA) Agar
- Bismuth Iron Sulphite Cycloserine (BISC) Agar

Cl. perfringens'in izolasyonu amacıyla kullanılan zenginleştirme besi yerlerinden RPM; Neomycin ve Polymyxin B Sulphate, PEM'de D-cycloserine gibi supplementler içerdiğinden gıdalarda *Cl. perfringens* dışındaki bazı anaerob veya fakültatif anaerobların gelişimi engellenmektedir. Zenginleştirme işlemi 46⁰C'de 20 saat gibi kısa bir inkübasyon süresinde anaerob koşullarda gerçekleşmektedir. Muhtemel *Cl. perfringens* varlığında tüplerde laktoz fermentasyonu sonucunda bulanıklık ve gaz oluşmaktadır. Son yıllarda *Cl. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyonunda egg yolk içermeyen Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) agar tercih edilmektedir. Bu besi yerinde ferric ammonium citrate ve sodium metabisulphite yer aldığından diğer katı besi yerlerinden farklılık göstermektedir. Sülfid bakteri tarafından sülfide indirgenir. Besi yerindeki demir III amonyum sitratın demir sülfid oluşturmasına bağlı olarak siyah koloniler meydana gelmektedir. Ayrıca TSC agara *Clostridium*'lar dışında sülfid indirgeyen bakterilerin inhibe edilmesi

amacıyla D-cycloserine ilave edilmesinin gerekli olduğu bildirilmiştir. Gıdalarda *Cl. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyonunda DNA hibridizasyonu kullanılmakta olup bu hızlı yöntemler içerisinde PCR tekniğinin gıdalardan 10 kob/g dan daha düşük düzeydeki *Cl. perfringens*'in saptanmasında başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir. Gıdada ve hastalarda aynı suşun varlığının identifikasyonunda ve suşlar arası yakınlığın saptanmasında Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) kullanılmaktadır. *Cl. perfringens* şüpheli gıda infeksiyonlarının teşhisinde ve serotiplendirilmesinde Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) yönteminin de hızlı ve hassas bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Sarıgözel, 2005).

1.7. Korunma ve Kontrol

Cl. perfringens toprak, su, süt, toz, lağım suları hayvan ve insanların bağırsak floraları gibi çok farklı ortamlarda bulunabilmektedir (Brynestad ve Granum 2002). *Cl. perfringens* pişirilmiş et ve tavuk ürünleri, et içeren gıdalar ile soslarda oldukça ciddi halk sağlığı sorunları oluşturmaktadır. *Cl. perfringens* zehirlenmeleri soğutma, soğukta muhafaza, yeniden ısıtma ve yeterli ısıl işlem uygulamaları ile önlenmektedir (Anon, 2006c). Özellikle kırmızı ve beyaz et ve et ürünleri *Cl. perfringens* ile sıklıkla kontamine olabilmektedir. *Cl. perfringens*'in ısıya direnci *Salmonella* ve *Listeria*'dan daha yüksektir. Bu nedenle pişirilmiş etlerde de bulunabilmektedir. Pişirme sırasında oluşan anaerobik koşullarda sporlar vegetatif forma dönüşmekte ve yeterli ısı işlemi uygulanmaz ise, gıdadaki mikroorganizma oranı tehlikeli düzeylere ulaşabilmektedir (Huang, 2003).

Taze etler donma sıcaklığının hemen üzerindeki sıcaklıklarda muhafaza edilmelidir. Soğutma ne kadar çabuk yapılırsa mezofilik bakterilerin gelişmesi o ölçüde önlenmiş olur. Etlerin muhafazasında -1⁰C ile +2⁰C arasındaki sıcaklıklar önerilmektedir. Sığır etleri bu koşullarda 30 gün kuzu ve koyun etleri ise 1-2 hafta süre ile muhafaza edilebilir. İngiltere gıda güvenliği bildirisinde, 90 dakikalık pişirme işleminde 15–55⁰C arasında hızlıca ısıtılması gerektiğini, önceden pişirilmiş

yemeğin 70⁰C'nin altında ısıtılmamasını, toksin formlarının veya patojenlerin artmasını önlemek amacıyla gıdaların 8⁰C'nin altında veya 63⁰C'nin üstünde saklanması gerektiği bildirilmektedir (Hobbs ve Roberts, 2007). Sosis ve salam gibi bazı et ürünleri 65–75⁰C' de pastörize edilir. Bu işlem bakteri, maya ve küflerin vejetatif hücreleri ile birçok virüsü öldürür. Ancak bu şekilde işlem görmüş et ürünlerinde bazı ısıya dirençli *Micrococcus*, *Lactobacillus* ve *Streptococcus* türlerinin vejetatif hücreleri ile *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinin sporları canlı kalır. Bu nedenle de bu tür ürünlerin soğukta muhafaza edilmesi gerekir. Pastörize et ürünlerinin raf ömrü uygulanan ısısal işlemine ve işlem sonrası meydana gelebilecek kontaminasyona bağlı olarak değişir (Erol, 2007).

Personel eğitimi ve HACCP kurallarına uyularak gıda kaynaklı zehirlenmelerin azaltılabileceği belirtilmektedir (Soriano ve ark., 2002). Gıda kaynaklı enfeksiyonların ve intoksikasyonların önlenmesinde, ısı işlemlerindeki sıcaklıklarına dikkatle uyulması, çiğ gıdalardan pişmiş gıdalara çapraz kontaminasyonun engellenmesi ve yeterli ısı işlemi uygulamalarının gerçekleşmesi gerekmektedir. Bunlara ek olarak, özellikle anaerob ortamın olduğu konserve gıdalarda ısıl işleme çok dikkat edilmesi, şüphelenilen konservelerin imha edilmesi ve ev konservelerinden kaçınılması önemlidir. Ayrıca, bu bakterinin gelişimini inhibe edecek şekilde pH, tuz, kimyasal koruyucu (et ürünlerinde sodyum nitrit ve nitrat uygulamaları) ve benzeri diğer antimikrobiyal uygulamaların yapılması koruyucu önlemler arasında yer almaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Yetersiz ısıl işlemi, uygun olmayan depolama şartları, etlerin veya gıdaların yeniden ısıtılmaması gibi işlemler sporların vejetatif hale geçmesini sağlamaktadır (Rood, 1998). *Cl. perfringens* sporlarının D₉₅ değerinin 200 dakika olduğu belirtilmektedir (Brynstad ve Granum 2002). Sporların vejetatif hale geçmesini engellemek için gıdaların taşınması, depolanması, pazarlanmasında soğuk muhafaza ve tüketimi öncesinde buzdolabı sıcaklığında saklanması önerilmektedir (Junega ve ark., 2006).

Gıda güvenliğinin sağlanması ve halk sağlığının korunması ile gıda kayıplarının en az düzeye indirilmesi için, üretimden tüketime kadar olan tüm aşamalarda uygun hijyenik ve teknolojik koşulların sağlanarak istenilen kalitede üretimin yapılması, tüketicinin bilinçlendirilmesi ve uluslar arası düzeyde yasa ve yönetmelikler çerçevesinde gıda kontrol mekanizmalarının en etkin şekilde çalıştırılması gerektiği bildirilmektedir (Erol, 2007). Zehirlenme riski taşıyan gıda alımından kaçınılması (örneğin orman mantarı, açıkta satılan süt), kullanılan su kaynaklarının dezenfekte edilmesi, çocuklara pastörize edilmemiş süt, süt ürünü, çiğ ya da iyi pişirilmemiş yumurta, et, et ürünü (özellikle hamburger) yedirilmemesi, el yıkama, özellikle çiğ etle temas eden yüzey ve aletlerin temizlenmesi, çiğ ve pişmiş ürünlerin birbirine temas ettirilmemesi, pişirme koşullarına dikkat edilmesi (ette pembe alan kalmamalı), besinlerin saklama koşullarına dikkat edilmesi ($<4^{\circ}\text{C}$ - $>70^{\circ}\text{C}$), bir kereden fazla ısıtma yapılmaması sayılabilir (Besli ve Ergüven 2009).

Sığır etleri çoğunlukla $\frac{1}{4}$ çeyrek gövde halinde, askıya alınmadan ve herhangi bir koruyucu kılıf (stokinet, polietilen torba) geçirilmeden sevk edilmektedir. Yapılan araştırmalar, kontaminasyonda mezbaha hijyeninin birinci sırada yer aldığını ve bunu etlerin çekilmesi, karıştırılması ve parçalanması gibi işlemler sırasında kullanılan satırların, bıçakların, tezgahların ve çalışan personelin hijyenik durumlarının rol oynadığını ortaya koymuştur. Tüketime kadar olan diğer aşamalar esnasında, başlangıçta kontamine olmuş mikroorganizmalar etin bozulmasına sebep olabilecekleri gibi, tüketiciler için de gıda zehirlenmelerinde potansiyel bir risk kaynağıdır. Et kalitesi ve güvenliğinde, karkası kontaminasyondan korumak için kesim işlemi oldukça önemlidir (Grace ve ark., 1999; Sancak ve ark., 1993).

Gıda kaynaklı zehirlenmelerin ve dolayısı ile hastalık yükünün azaltılmasına yönelik araştırma – geliştirme çalışmalarının bölgesel, ulusal ve uluslararası bir şekilde düzenli halde gıda güvenliği için yapılması gerekmektedir. Bu teknolojinin geliştirilmesinde hükümetler arası çalışmanın ve uluslar arası standartların oluşturulması önemlidir (Quested ve ark., 2010).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada, 2011 yılının Nisan, Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında Afyonkarahisar'ın değişik kasap ve şarküterilerinden satın alınan 100 (50 tavuk kıyma ve 50 sığır kıyma) örnek materyal olarak kullanılmıştır. Örnekler soğuk zincir altında laboratuara getirilerek analizleri yapılmıştır. Örneklerdeki *Cl. perfringens* kontaminasyonu EMS yöntemi (En Muhtemel Sayı Yöntemi) kullanılarak belirlenmiştir (Labbe, 1989).

2.1.1. *Cl. perfringens*' in izolasyonu ve identifikasyonunda kullanılan besi yerleri ve ayıraçlar

Perfringens Enrichment Medium (Thioglycollate Medium) (Oxoid CM0173)

Bileşimi

Yeast extract	5.0 g
Tryptone	15.0g
Glucose	5.5g
Sodium thioglycollate	0.5 g
Sodium chloride	2.5 g
L-cystine	0.5 g
Resazurin	0.001g
Agar	0.75g
Distile su	1000 ml
pH	7.1 ± 0.2

Hazırlanışı

Hazır besi yerinden 29.5 g tartılarak 1 litre distile suda çözündürülüp pH sı 7.1 e ayarlandı ve 121⁰C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra 50⁰C’ye kadar soğutuldu. 500 ml hazırlanarak soğutulan PEM’e steril şartlarda sulandırılan 1 vial Perfringens (TSC) Supplement (Oxoid SR 0088E) ilave edilerek karıştırıldı.

Perfringens (TSC) Selective Supplement (Oxoid SR 0088E)

Vial içeriği:

D-cycloserine 200 mg.

(her bir vial 500 ml besi yeri için standart olarak hazırlanmıştır)

Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar (Oxoid CM 0587)

Bileşimi

Tryptose	15.0 g
Soya peptone	5.0g
Yeast extract	5.0 g
Sodium metabisulphite	1.0g
Ferric ammonium citrate	1.0g
Agar	19.0g
pH	7.6 ±0.2

Hazırlanışı

Hazır TSC agardan 23 g tartılarak 500 ml distile su içerisinde çözündürülüp, sıcak su banyosunda eritildi. 121⁰C’de 10 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra besi yeri 50⁰C’ye kadar soğutuldu. Bu sıcaklıkta hazırlanan besi yeri içerisine steril şartlarda Egg Yolk Emulsiyon (500 ml’ye 25 ml) ve Perfringens Supplement (TSC) (Oxoid SR 0088)’den 1 vial 2 ml steril distile su ile eritilip besi yerine ilave edilerek karıştırıldı. Ardından steril petrilere döküldü.

Egg Yolk Emulsiyon (Oxoid SR0047C)

Columbia Blood Agar Base (Oxoid CM 0331)

Bileşimi

Special peptone	23.0g
Starch	1.0g
Sodium chloride	5.0g
Agar	10.0g

Hazırlanışı

Bu hazır besi yerinden 39 g tartılarak 1 litre distile suda çözüldürüldü ve sıcak su banyosunda tamamen eritildi. 121⁰C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra 50⁰C kadar soğutuldu ve üzerine sağlıklı koyundan alınan % 7’lik steril defibrine kan ilave edildi. Homojen şekilde karıştırıldıktan sonra besi yeri steril petrilere döküldü.

Lactose Gelatin Medium (FDA, Bacteriological Manual, 2001)

Bileşimi

Tryptose	15.0 g
Yeast extract	10.0 g
Lactose	10.0 g
Gelatine	120 g
Phenol red (%95 ethanolde, % 1’lik çözeltisi)	5 ml
Distile su	1000 ml
pH	7.5 ± 0.2

Hazırlanışı

Jelatin hariç diğer bileşenler 1 litre distile suda çözündürülüp pH değeri 7.5'e ayarlandıktan sonra jelatine ilave edilerek su banyosunda eritildi. Tüplere 10'ar ml konularak 121⁰C'de 15 dakika otoklavda steril edildi.

Motility Nitrate Medium (Fluka, 14305)

Hazır besi yerinden 23.5 g tartılarak 1 litre distile suda çözündürüldü ve üzerine 5 ml gliserin ilave edildi. pH değeri 7.3 ± 0.1'e ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda iyice eritildi. Daha sonra tüplere paylaştırılarak 121⁰C'de 15 dakika otoklavda steril edildi.

Nitrate reagent (A) (Remel, 21239)

% 0.8 sulfanilid acid

Nitrate reagent (B) (Remel, 21242)

%0.5 α naphthylamine

Asit Fosfataz Testi

Cl. perfringens için selektif katı besiyeri olarak kullanılan TSC Agar Base (Oxoid CM0173) katkısı olan ve her şişesinde 200 mg D-Cycloserine; 50 mg 4-methylumbelliferyl-phosphate disodium salt bulunan *Clostridium perfringens* supplementi'nden (Merck HC082943-1.00888.0010) 500 ml besi yeri için 1 vial kullanıldı. Hazırlanan MUP supplementli TSC Agara özeyle geçilen koloniler 46⁰C'de 24-48 saat anerob koşullarda inkübe edildi. Daha sonra petriyer uzun dalga boylu UV lamba altında tutuldu. Floresan ışığa verenler pozitif olarak kabul edildi. D-Cycloserine refakatçi florayı baskılayıp kolonilerin daha küçük kalmasını sağlarken, aynı zamanda *Cl. perfringens* kolonilerinin etrafında siyahlaşmaya neden olur. 4-Methylumbelliferyl phosphate (MUP) alkali ve asit fosfataz için florojenik bir bileşiktir. Asit fosfataz *Cl. perfringens* için yüksek düzeyde spesifik olup, MUP'u uzun dalga boylu UV lambası altında floresan ışığa veren 4-methylumbelliferone'a parçalar ve böylece *Cl. perfringens* kolaylıkla belirlenir.

Katalaz Testi

%3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) (Merck 8597) ile hazırlandı

Gas Generating Kit (Oxoid Anaerobic System BR0038B)

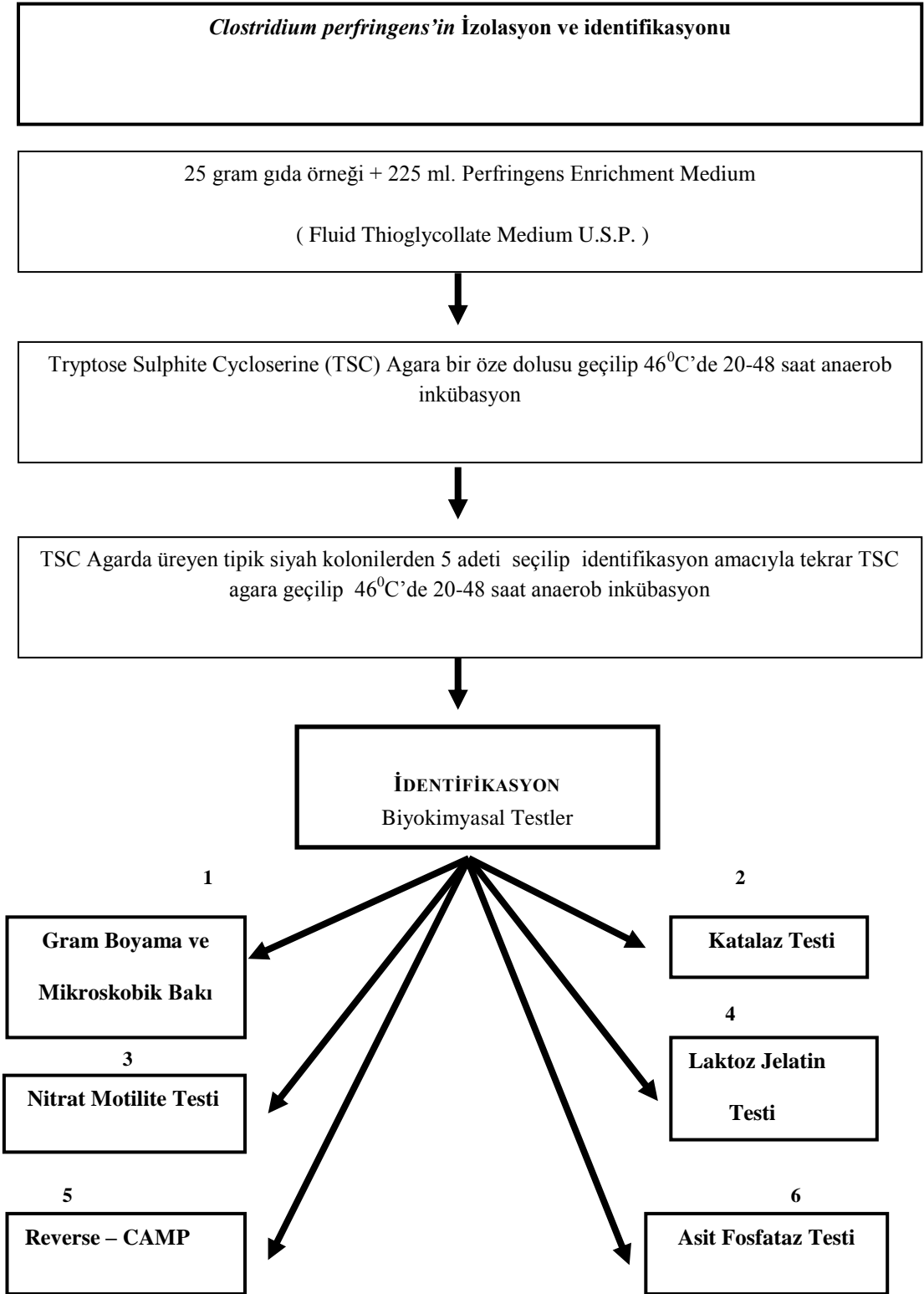
Test Suşu

Reverse-CAMP testinde *Streptococcus agalactiae* B (Ref.No: 0439P) ve *Clostridium perfringens* (Ref. No: ATCC 13124) suşları kullanıldı.

2.2. Yöntem

En muhtemel sayı yönteminin prensibi, ardışık 3 seyreltiden sıvı besi yerlerine ekim yapıp inkübasyon sonunda gelişme olanları pozitif olarak değerlendirmek ve istatistik yöntemlerle elde edilmiş tablolardan yararlanılarak örnekteki sayıyı hesaplamaktır. Yöntemin “En Muhtemel Sayı” (Most Probable Number; MPN) olarak adlandırılma nedeni yukarıda da belirtildiği gibi örnekteki mikroorganizma sayısının istatistik şekilde elde edilmiş tablolardan yararlanılarak hesaplanmasıdır. Yöntemin uygulanışı basit olarak ardışık 3 seyreltiden 3'er adet 10 ml besi yerine 1'er ml ekim yapılması olarak tanımlanabilir. EMS yönteminde ardışık seyreltilerden 3'er besi yeri tüpüne ekim yapıldıktan sonra tüpler aranacak mikroorganizma için optimum sıcaklıkta ve gereken sürede inkübe edilir. Bu sürenin sonunda her seyreltide kaç tüpte pozitif sonuç alındığı kaydedilir (Ayanoğlu, 2008). *Cl. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyonu Tablo 2.1.' de verildiği gibidir.

Tablo 2.1. *Cl. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyon şeması (Sarigüzel., 2005).



Farklı kasap ve şarküterilerden aseptik koşullarda alınan 250'şer gram kıyma örnekleri (tavuk ve sığır) soğuk zincir altında laboratuvara getirildikten hemen sonra *Cl. perfringens* yönünden analiz edildi. Kıyma örneklerindeki *Cl. perfringens*'in varlığı En Muhtemel Sayı Yöntemine göre tespit edildi.

Yöntem gereğince kıyma örnekleri aşağıda anlatıldığı gibi sırasıyla zenginleştirme işleminden sonra katı besi yerine geçildi ve kolonilerin değerlendirilmesi yapıldı. *Cl. perfringens*'in izolasyon ve identifikasyonu Şekil 2.1.'de, identifikasyon için uygulananda testler ise Tablo 2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. *Cl. perfringens*'in identifikasyonunda uygulanan biyokimyasal testler (Labbe, 1989)

ETKEN	Gram boyama	Katalaz	Reverse-CAMP testi	Asit fosfataz	Hareket	Nitrat	Laktöz	Jelatin
<i>CL. PERFRİNGENS</i>	+	-	+	+	-	+	+	+

2.2.1. Zenginleştirme

Her bir örnek 25 gram tartılarak, içinde 225'er ml Perfringens Enrichment Medium (PEM: Thioglycollate Medium + Perfringens (TSC) Supplement Oxoid SR0088E) bulunan steril poşetler içerisinde stomacher (Interscience Bag Mixer) da homojenize edildi (25g numune + 225 ml PEM). Her bir örnekten, içinde 9'ar ml Perfringens Enrichment Medium (Fluid Thioglycollate Medium-TGM) bulunan 4 tüpe 1'er ml geçildi. Tüplerden 3'ü MPN için ayrılırken, 1'i ikinci basamak için sulandırma tüpü olarak kullanıldı ve bu tüpten alınan 1'er ml homojenat 9'ar ml TGM bulunan 4 tüpe aktarıldı (0.1 g örnek + 9 ml TGM). Üçüncü basamakta da ikinci basamaktaki sulandırma tüpünden 1'er ml homojenat alınarak 9'ar ml TGM bulunan 3 tüpe

geçildi (0.01 g + 9 ml TGM). Bu şekilde MPN için 3 x 1 g, 3 x 0.1 g ve 3 x 0.01 g zenginleştirme tüpleri oluşturuldu. Tüplerin üzeri steril parafinle kapatılarak 46⁰C'de 20-48 saat anaerob koşullarda inkübe edildi. Resim 2.1.'de *Cl. perfringens*'in TGM'de gaz oluşturan tipik görünümü verilmiştir.



Resim 2.1. *Cl. perfringens*'in TGM'de gaz oluşturan tipik görünümü.

2.2.2. Katı Besi Yerine Ekim

Zenginleştirme sonrası bulanıklık ve durhaim tüplerinde gaz oluşan tüplerden bir öze dolusu homojenat alınarak Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) agar (Oxoid CM0587) yüzeyine çizme plak yöntemi ile ekim yapıldıktan sonra plaklar anaerob koşullarda (Gas generating kit Oxoid BR0038B) 46⁰C'de 20-48 saat inkübe edildi (Resim 2.2. ve Resim 2.3.).



Resim 2.2. *Cl. perfringens* kolonilerinin TSC agardaki tipik görünümü



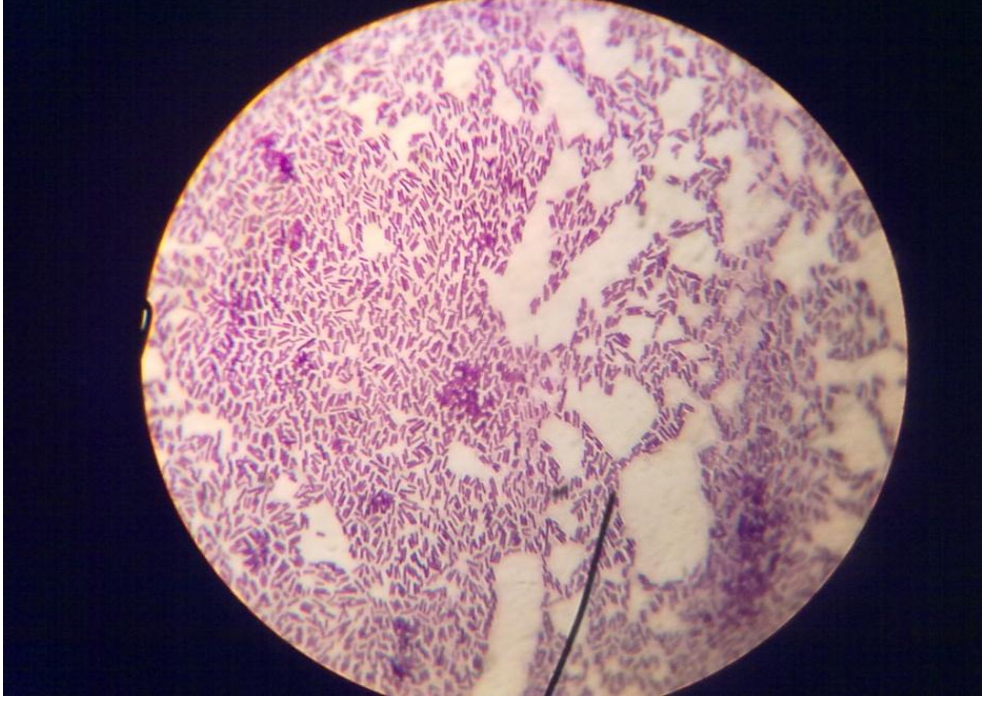
Resim 2.3. *Cl. perfringens* kolonilerinin TSC agardaki tipik görünümü

2.2.3. *Cl. perfringens* 'in İdentifikasyonu

TSC agarda 46⁰C'de anaerob koşullarda 20-48 saat inkübasyon sonucunda üreyen siyah renkli *Cl. perfringens* şüpheli kolonilerden (Resim 2.2 ve Resim 2.3) tipik 5 koloni seçilerek identifikasyon için yeniden TSC agara geçildi ve plaklar 46⁰C'de anaerob koşullarda 20-48 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işlem sonunda biyokimyasal testler yapılarak *Cl. perfringens*'in identifikasyonu gerçekleştirildi. Test sonuçlarına göre Gram (+), katalaz (-), laktoz (+), jelatin (+), hareket (-), nitrat (+), reverse-CAMP testi (+) ve asit fosfataz testi (+) reaksiyon veren koloniler *Cl. perfringens* olarak değerlendirildi.

2.2.3.1. Gram Boyama ve Mikroskopik Bakı

Şüpheli *Cl. perfringens* kolonilerden Gram boyama yapıldı. Mikroskopun (Olympos E A100 1.25 oil 160/-) immersiyon objektifinde mavi-mor renkli çubuk formunda görülen mikroorganizmalar Resim2.4.'deki görüntüyü verdi ve Gram pozitif olarak değerlendirildi.



Resim 2.4. *Cl. perfringens*' in mikroskoptaki tipik görüntüsü

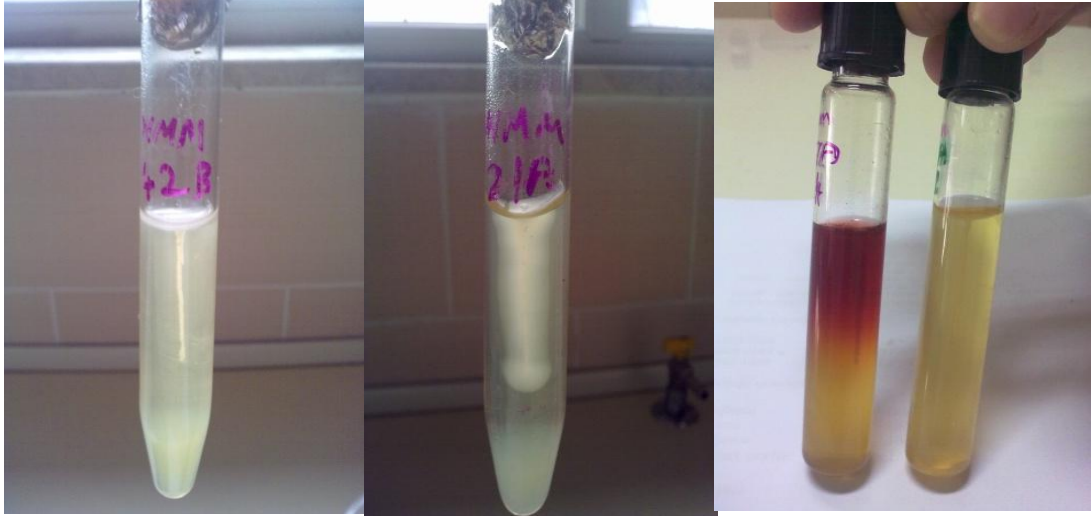
2.2.3.2. Katalaz Testi

Bu amaçla, önceden hazırlanmış olan % 3'lük H₂O₂ solusyonundan bir öze dolusu bir lam üzerine alınarak, üzerine öze yardımı ile şüpheli *Cl. perfringens* kolonisinden konulup karıştırıldı. 1-2 sn içerisinde köpürme şeklindeki gaz oluşumunun görülmemesi katalaz negatif olarak değerlendirildi.

2.2.3.3. Nitrat- Motilite Testi

TSC agardan alınan şüpheli koloniler içerisinde Motility Nitrat Medium bulunan tüplere inokule edilerek kapakları kapatıldı ve 46⁰C'de 24 saat aerob koşulda inkübe edildi. Yalnızca inokulum yapılan hatta meydana gelen üreme hareket negatif olarak değerlendirildi. İnkübasyon süresinden sonra aynı besi yerine nitrat ayırıcının (Nitrate reagent (A) % 0.8 sulfanilid acid ve Nitrate reagent (B) %0.5 α

naphthylamine) damlatılmasından 2 dakika sonra kırmızı-mor rengin oluşumu nitratın nitrite indirgenliğini gösterdiğinden nitrat pozitif, herhangi bir renk oluşmaması ile nitrat negatif olarak değerlendirildi. Resim2.5., Resim2.6. ve Resim2.7.'de elde edilen sonuçlar görülmektedir.



Resim 2.5.

Hareket (-)

Resim 2.6.

Hareket (+)

Resim 2.7.

Nitrat (+)

Nitrat (-)

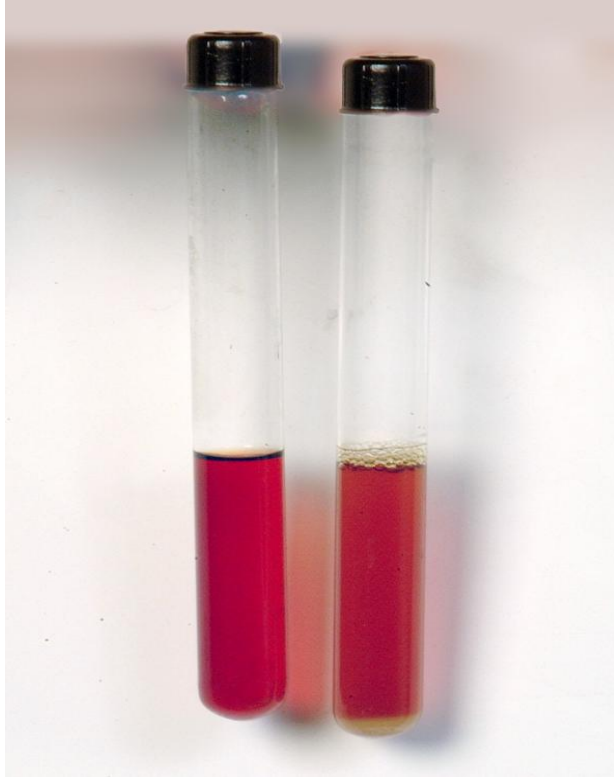
Resim 2.5. *Cl. perfringens*' in Nitrat Motilite Medyumdaki tipik görüntüsü (hareket negatif)

Resim 2.6. *Cl. perfringens*'in dışında bir mikro organizmanın Nitrat Motilite Medyudaki görüntüsü (hareket pozitif)

Resim 2.7. *Cl. perfringens*' in Nitrat Motilite testi pozitif ve negatif örnekleri

2.2.3.4. Laktoz Jelatin Testi

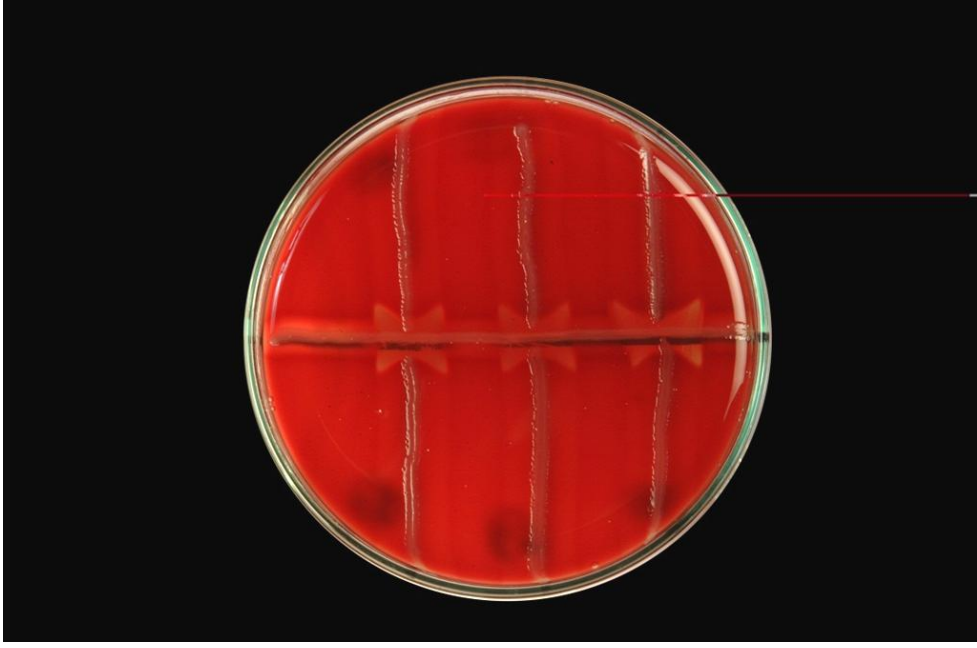
İçerisinde eşit miktarda laktoz jelatin medium bulunan tüplere şüpheli koloniler inokule edilerek 35–37 °C'de 24–48 saat aerob koşulda inkübe edildi. Gaz kabarcıklarının meydana gelmesi (Resim 2.8.) ve öze hattı boyunca kırmızıdan sarıya renk değişikliğinin oluşması laktoz pozitif olarak değerlendirildi. İnkübasyondan sonra tüpler 4°C'de 1 saat bekletildiğinde jelatin sıvı halde ise bu koloni pozitif olarak değerlendirildi.



Resim 2.8. Laktoz fermentasyon ve jelatini sıvılaştırma testi

2.2.3.5. Reverse-CAMP Testi

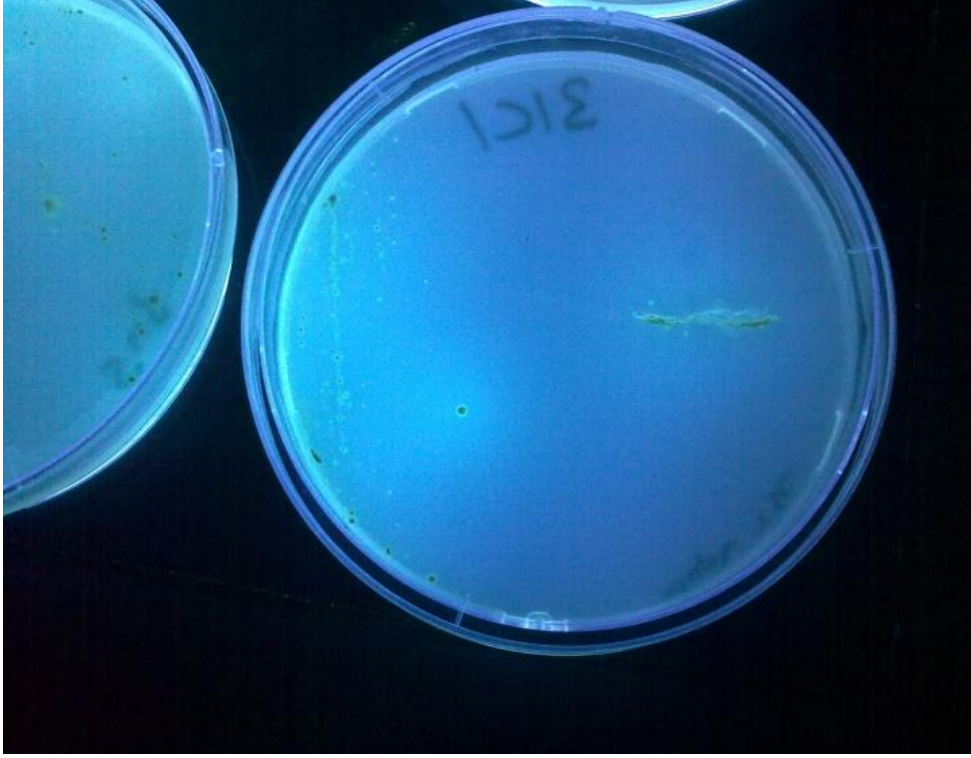
Bu test için *Str.agalactiae* suşu belirleyici mikroorganizma olarak kullanıldı. Columbia Blood Agar'ın (CBA) ortasına referans *Str.agalactiae* suşu bir hat şeklinde baştan sona geçildi. Şüpheli *Cl. perfringens* suşları birbirine paralel 2 cm aralıklarla ve geçilen *Str.agalactiae*'den 1 mm uzaklıkta dikey olarak geçildi ve 46⁰C'de 24-48 saat anaerob ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda referans suşa yakın yerde yarım ay şeklindeki zon Reverse-CAMP testi pozitif olarak değerlendirildi. Resim 2.9.'daki gibi görüntüler elde edildi.



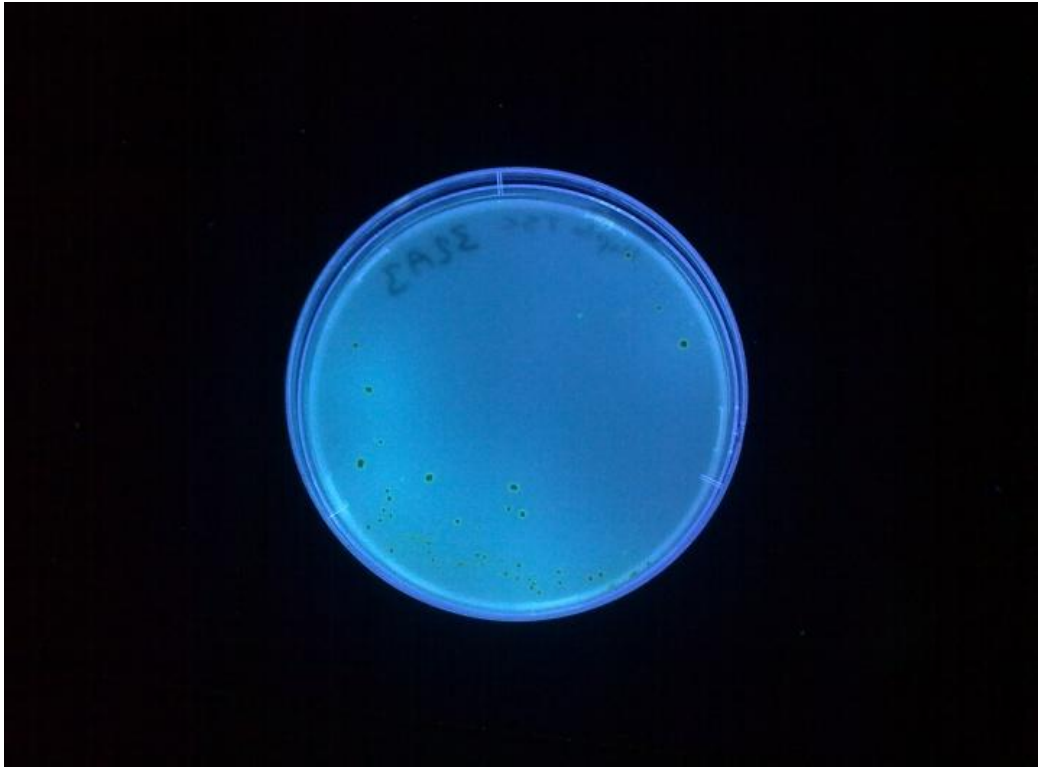
Resim 2.9. Reverse – CAMP Testi

2.2.3.6. Asit Fosfataz Testi

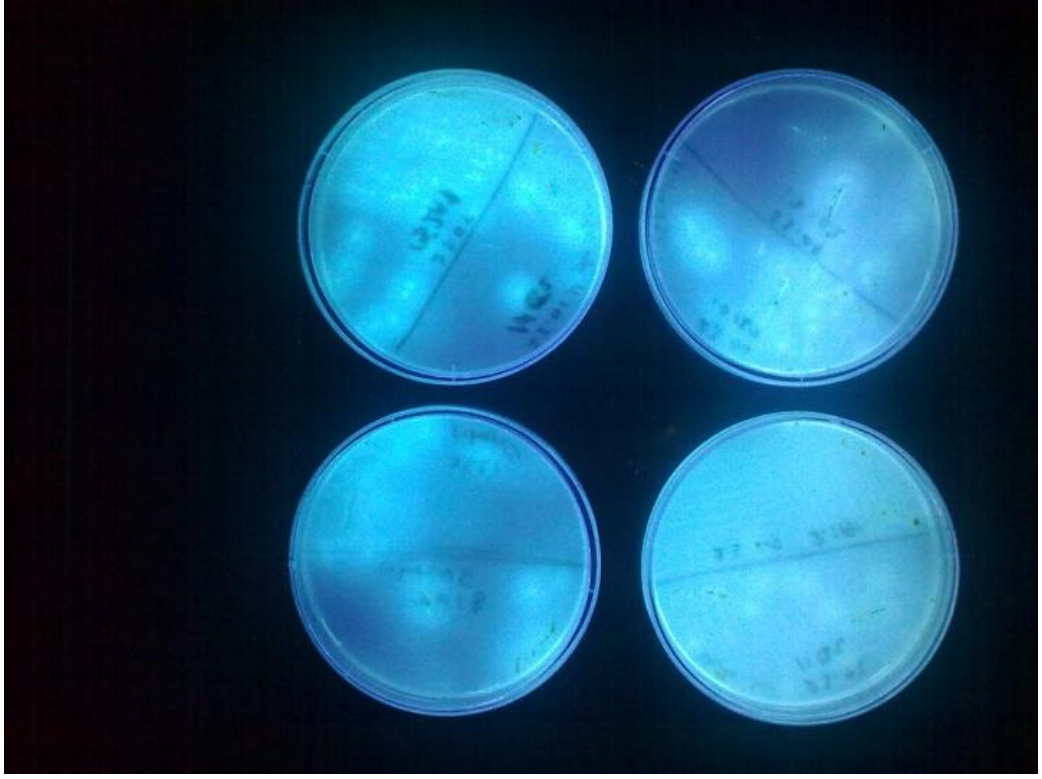
Cl. perfringens için selektif katı besiyeri olarak kullanılan TSC Agar Base (Oxoid CM0587) içerisine *Cl. perfringens* selective supplementi'nden (Merck HC082943) (D-Cycloserine 200mg; 4-Methylumbelliferyl phosphate di sodium salt 50mg) 500 ml besi yeri için 1 vial kullanıldı. Hazırlanan MUP supplementli TSC Agara özeyle geçilen koloniler 46⁰C'de 24-48 saat anerob koşullarda inkübe edildi. Daha sonra petriler uzun dalga boylu UV lamba altında tutuldu. Floresan ışımaya verenler pozitif olarak kabul edildi. D-Cycloserine refakatçi florayı baskılayıp kolonilerin daha küçük kalmasını sağlarken, aynı zamanda *Cl. perfringens* kolonilerinin etrafında siyahlaşmaya neden olur. 4-Methylumbelliferyl phosphate (MUP) alkali ve asit fosfataz için florojenik bir bileşiktir. Asit fosfataz *Cl. perfringens* için yüksek düzeyde spesifik olup, MUP'u uzun dalga boylu UV lambası altında floresan ışımaya veren 4-methylumbelliferone'a parçalar ve böylece Resim 2.10., Resim 2.11., Resim 2.12.'deki gibi *Cl. perfringens* kolaylıkla belirlenir.



Resim 2.10. *Cl. perfringens*' in UV lambası altındaki tipik görüntüsü



Resim 2.11. *Cl. perfringens*' in UV lambası altındaki tipik görüntüsü



Resim 2.12. *Cl. perfringens*' in UV lambası altındaki tipik görüntüsü

3. BULGULAR

Bu çalışmada, Nisan 2011–Temmuz 2011 tarihleri arasında Afonkarahisar ilinde tüketime sunulan çeşitli market ve kasaplardan satın alınan 50 sığır kıyma, 50 tavuk kıyma olmak üzere toplam 100 adet kıyma örneğinde *Cl. perfringens* varlığı araştırılmıştır. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda toplamda 50 sığır kıyma örneğinin 34’ünde (%68) (ortalama 4.9 MPN/g), 50 tavuk kıyma örneğininde 27’sinde (%54) (ortalama 3,5 MPN/g) olmak üzere, 100 örneğin 61’inden (%61) (ortalama 4.2 MPN/g) *Cl. perfringens* tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak yapılan ki-kare (chi square) testlerinde aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

Tablo 3.1. Örneklerin Alındığı Yer ile *Cl. perfringens* Bulunma İlişkisi

		<i>Cl. perfringens</i>			p-değeri
		Var(+)	Yok (-)	Toplam	
Alındığı Yer	Kasap	Sayı(f)	21	12	33
		Yüzde(%)	63,6	36,4	100,0
	Şarküteri	Sayı(f)	40	27	67
		Yüzde(%)	59,7	40,3	100,0
	Toplam	Sayı(f)	61	39	100
		Yüzde(%)	61,0	39,0	100,0

(f): örnek sayısı

p-değeri: anlamlılık değeri

Tablo 3.1. incelendiğinde kasaptan alınan örneklerin %63,6’sında (f=21) *Cl. perfringens* izole edilmiş, %36,4’ünde (f=12) ise *Cl. perfringens* saptanmamıştır. Aynı şekilde şarküteriden alınan örneklerin %59,7’sinde (f=40) *Cl. perfringens* saptanmış, %40,3’ünde (f=27) ise *Cl. perfringens*’e rastlanmamıştır. Örneğin alındığı yer ile *Cl. perfringens* bulunma arasında istatistiksel olarak bir ilişki bulunmamıştır ($p^* > 0,05$). Fakat toplam örnekler üzerinden değerlendirildiğinde, kasaptan toplanan örneklerin şarküteriden toplananlara göre daha kontamine olduğu saptanmıştır.

Tablo 3.2. Örneklerin Türü ile *Cl. perfringens*'in Bulunma İlişkisi

		<i>Cl. perfringens</i>			p-değeri
		Var(+)	Yok (-)	Toplam	
Et Türü	Tavuk Kıyma	Sayı(f)	27	23	50
		Yüzde(%)	54,0	46,0	100,0
	Sığır Kıyma	Sayı(f)	34	16	50
		Yüzde(%)	68,0	32,0	100,0
	Toplam	Sayı(f)	61	39	100
		Yüzde(%)	61,0	39,0	100,0

(f): örnek sayısı

p-değeri: anlamlılık değeri

Tablo 3.2.'deki verilere bakıldığında; tavuk kıymaların %54'ünde (f=27) *Cl. perfringens* saptanmış, %46'sında (f=23) *Cl. perfringens* saptanmamıştır. Aynı şekilde sığır kıymaların %68'inde (f=34) *Cl. perfringens* belirlenirken, %32'sinden *Cl. perfringens* izole edilmemiştir. Örneğin türü (tavuk kıyma ya da sığır kıyma) ile *Cl. perfringens* bulunma arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p^* > 0,05$). Fakat bütün örnekler üzerinden değerlendirildiğinde, sığır kıyma örneklerinden daha yüksek oranda *Cl. perfringens* izole edilmiştir.

Tablo 3.3. Örneklerin Alındığı Zaman ile *Cl. perfringens* 'in Bulunma İlişkisi

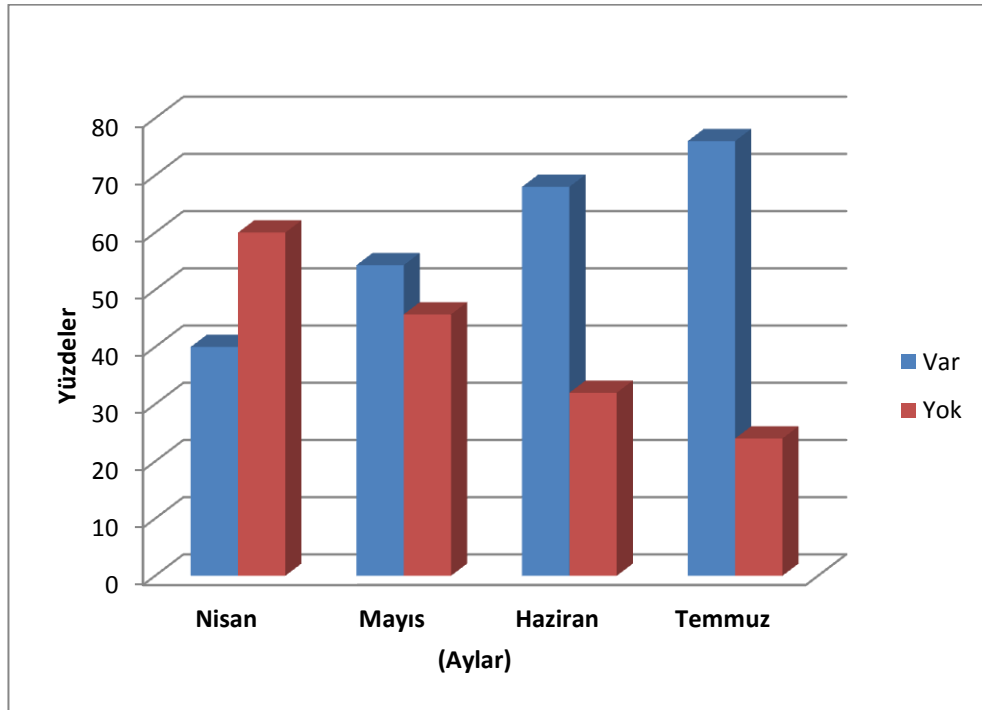
		<i>Cl. perfringens</i>			p-değeri
		Var(+)	Yok (-)	Toplam	
Toplandığı Ay	Nisan	Sayı(f)	6	9	15
		Yüzde(%)	40,0	60,0	100,0
	Mayıs	Sayı(f)	19	16	35
		Yüzde(%)	54,3	45,7	100,0
	Haziran	Sayı(f)	17	8	25
		Yüzde(%)	68,0	32,0	100,0
	Temmuz	Sayı(f)	19	6	25
		Yüzde(%)	76,0	24,0	100,0
	Toplam	Sayı(f)	61	39	100
		Yüzde(%)	61,0	39,0	100,0

(f): örnek sayısı

p-değeri: anlamlılık değeri

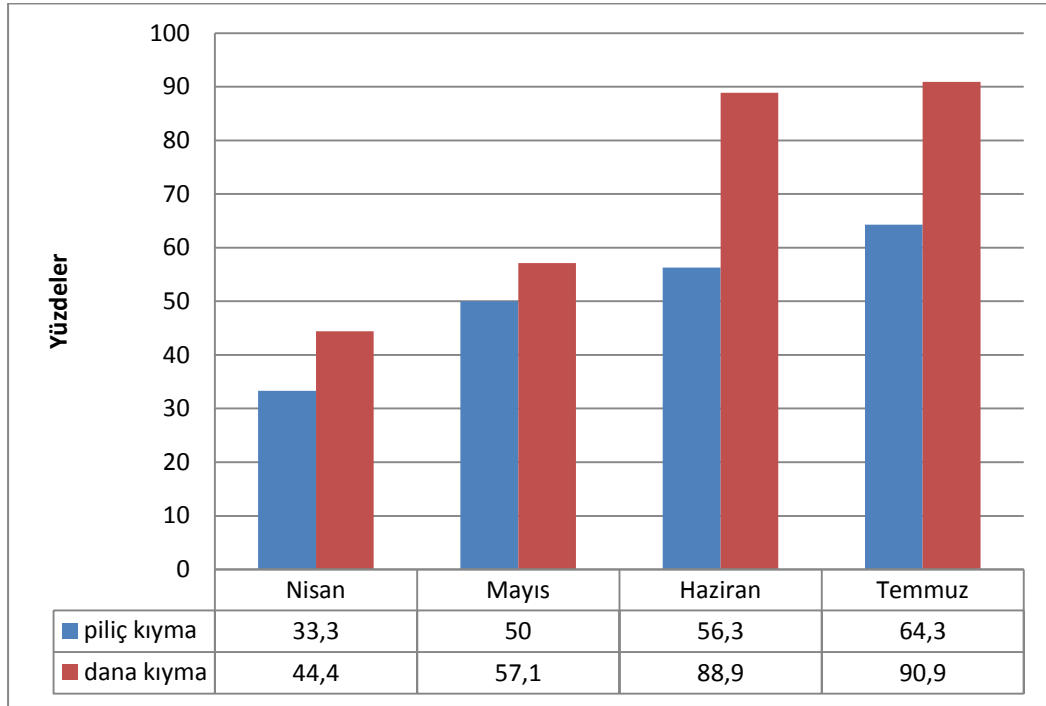
Nisan ayında alınan toplam örnek sayısı f=15'tir. Bu örneklerin %40'ında (f=6) *Cl. perfringens* bulunurken, %60'ında (f=9) *Cl. perfringens* saptanmamıştır. Mayıs ayında alınan örneklerin (f=35) %54,3'ünden (f=19) *Cl. perfringens* izole edilirken % 45,7'sinden (f=16) edilmemiştir. Haziran ayında toplam örneğin (f=25) %68,0'ından *Cl. perfringens* saptanmış olup %32,0'ında *Cl. perfringens*'e rastlanmamıştır. Temmuz ayında ise; elde edilen örneklerin (f=25) %76,0'ından *Cl. perfringens* bulunmuş, %24,0'ından *Cl. perfringens* izole edilmemiştir. Tablo3.3 ve Tablo 3.4. incelendiğinde *Cl. perfringens*'in örneklerin alındığı aylara göre bulunma yüzdesi Nisan ayından Temmuz ayına doğru düzenli bir şekilde artmıştır. Microsoft Excel 2010'da yapılan tabloda da görüldüğü üzere, bu artışın nedeninin, Nisan ayından Temmuz ayına kadar olan sıcaklık artışı olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 3.4. Aylara göre kıyma örneklerinde *Cl. perfringens* bulunma yüzdeleri



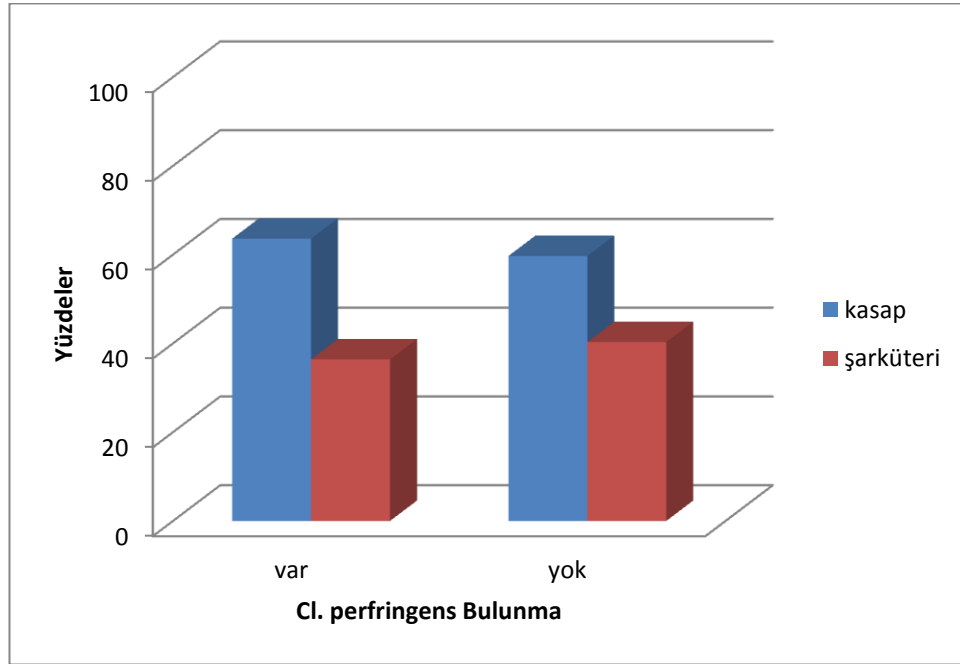
Elde edilen bulgular doğrultusunda toplam yüz kıyma örneğindeki *Cl. perfringens* varlığı Nisan ayında %40, Mayıs ayında %54,3, Haziran ayında %68, Temmuz ayında ise %78'dir. Tablo 3.4.'te de görüldüğü gibi hava sıcaklıkları arttıkça aylara bağlı olarak *Cl. perfringens* düzeyinde de artma gözlenmiştir.

Tablo 3.5. Aylara göre kıyma örneklerinde *Cl. perfringens* bulunma yüzdeleri



Tablo 3.5. incelendiğinde, Nisan ayında tavuk kıymalarının %33.3'ünde, sığır kıymalarının %44.4'ünde, Mayıs ayında tavuk kıymalarının %50'sinde, sığır kıymalarının %57'sinde, Haziran ayında tavuk kıymalarının %56.3'ünde, sığır kıymalarının %88.9'unda, Temmuz ayında tavuk kıymalarının %64.3'ünde, sığır kıymalarının ise %90,9'unda *Cl. perfringens* varlığı görülmektedir. Aylara paralel olarak *Cl. perfringens* düzeyinde artış gözlenmiştir. Sığır kıymalarındaki artış oranının, tavuk kıymalarındaki artış oranından daha fazla olduğu saptanmıştır.

Tablo 3.6. *Cl. perfringens*'in kasap ve şarküterilerdeki bulunma yüzdeleri



Tablo 3.6. 'dan da anlaşılacağı üzere, kasaptan alınan 33 örneğin %63'ünde *Cl. perfringens* bulunurken, şarküterilerden alınan 67 örneğin % 59.7'sinde *Cl. perfringens* saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, Afyonkarahisar'daki kasap ve şarküteriler arasında büyük bir fark bulunmamakla beraber kasapların hijyenik kurallara daha elverişsiz olduğu ortaya çıkmaktadır.

Aylara göre farklılıktan kaynaklanan düzeyler incelendiğinde, Nisan ayında alınan 15 örneğin 6'sından (%40), Mayıs ayında alınan 35 örneğin 19'undan (%55.28), Haziran ayında alınan 25 örneğin 17'sinden (%68), Temmuz ayında alınan 25 örneğin 19'undan (%80) *Cl. perfringens* izole ve tanımlanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda, farklı aylardaki sıcaklık artışına paralel olarak *Cl. perfringens*'in izolasyon ve tanımlanmasında artış olduğu, yüzdelerin artarak değiştiği tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Geçtiğimiz birkaç on yılda işlenmiş ve çiğ sığır ile kanatlı etlerindeki *Cl. perfringens*'in insidensine ilişkin birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalarda sığır ve kanatlılarda bu mikroorganizmanın yaygın bir şekilde varolduğu bildirilmektedir (Çakmak ve ark, 2006; Labbe, 2000; Labbe, 1989). Kanatlıların bağırsaklarında bulunan bu enteropatojenlerin varlığı, kesim prosesi sırasında karkasların kontamine olması ile son ürünün de kontamine olması ile sonuçlanmaktadır (Miwa ve ark., 1997).

Afyonkarahisar'da 2011 yılının Nisan, Mayıs, Haziran, Temmuz aylarında halka açık kasap veya şarküterilerden alınan herbiri farklı 50 tavuk kıyma, 50 sığır kıyma olmak üzere toplam 100 örnek incelenmiştir. Her örnek soğuk zincir altında laboratuvara getirilip hemen işleme alınmıştır. 50 tavuk kıyma örneğinin 27'sinden (% 54) (3,5 MPN/g), 50 sığır kıyma örneğinin 34'ünden (% 68) (4.9 MPN/g) *Cl. perfringens* izole ve tanımlanmıştır. Bu durum tüm kıyma örneklerinden 61'inin (% 61) (4.2 MPN/g) *Cl. perfringens* ile kontamine olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, tavuk kıyma ve sığır kıyma örneklerinin 3.0 ile 20.0 MPN/g arasındaki düzeylerde *Cl. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmıştır.

Kamber ve ark., (2007) Kars'ta yerel marketlerden ve kasaplardan topladıkları 96 sığır kıyması örneğinde (16'sı marketlerden, 80'i kasaplardan) *Cl. perfringens* ve toksininin varlığını ELISA yöntemiyle araştırmışlardır. İncelemeleri sonucunda örneklerin 31'inden (%32) *Clostridium* spp. izole ettiklerini ve bu 31 örnekten 17'sini de (%55) *Cl. perfringens* (2'si marketlerden, 15'i kasaplardan) olarak izole ettiklerini, bildirmişlerdir.

Erol ve Çakmak'ın (2000) yaptığı çalışmada, Ankara'nın değişik semtlerindeki marketlerden ve kasaplardan alınan kıyma örneklerinde *Cl. perfringens* düzeyinin

belirlenmesi amacıyla MPN tekniği kullanılmış ve analiz bulguları sonucunda toplam 80 hazır sığır kıyması örneğinin 52'sinin (% 65) ortalama 2.51 MPN/g (0.30 – 1.5 x10¹ MPN/g) düzeyinde *Cl. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmıştır. *Cl. perfringens* izole ve identifiye edilen 52 örneğin 28'inin (% 53.8) marketlerden, 24'ünün (% 46.1) kasaplardan alınan örneklere ait olduğu bildirilmiştir. *Cl. perfringens* izole edilen 52 örnekten 35'inin (% 67.3) Haziran – Eylül dönemini kapsayan sıcak aylardan, 17'sinin de (% 32.7) relatif soğuk aylarda (şubat – Mayıs) alınan örneklere ait olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında incelenen sığır kıymalarının önemli bir bölümünün *Cl. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmışlardır. Örneklere *Cl. perfringens* ile kontaminasyon düzeyinin düşük olmasına karşın, kıyma tüketiminden kaynaklanabilecek halk sağlığı riskinin önlenmesi bakımından, kıyma üretiminde gerekli tüm hijyenik ve teknik koşulların sağlanması gerektiğine dikkat çekilmektedir (Erol ve Çakmak, 2000).

Ali ve ark., (1991) yaptıkları çalışmada, 118 sığır kıyması örneğinin 64'ünden (%54), *Cl. perfringens* izole ettiklerini kaydetmişlerdir. Yine aynı yıl Ali ve Fung (1991) 55 hindi kıyması örneğinin 40'ında (% 73) *Cl. perfringens* saptadıklarını bildirmişlerdir. Tekinşen ve ark., (2001) nın Ankara' da yaptıkları araştırmada ise; marketlerden topladıkları 20 kıyma örneğinin % 35'inde *Cl. perfringens* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Gönülalan ve Köse (2002) Kayseri'de piyasada satılan 100 kıyma örneğinin %61'inde *Cl. perfringens* bulmuşlardır. Çon ve ark., (2002) Afyonkarahisar'da inceledikleri 30 sucuk örneğinin % 6.67'sinde 10¹ kob/g düzeyinde *Cl. perfringens* bulunduğu bildirilmiştir. Sancak ve ark., (1993) Van illinde, kasap ve marketlerde tüketime sunulan 100 adet sığır ve 100 adet koyun olmak üzere toplam 200 kıyma örneğini incelemiş, sığır kıyma örneklerinin % 15'inin, toplam et örneklerinin ise % 42 oranında *Cl. perfringens* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir (Sancak ve ark., 1993).

Çakmak ve ark., (2006) yaptıkları çalışmada, kesimhanelerinden alınan 40 donmuş tavuk kıyması ve 40 tavuk burger örneğinden 40 tavuk kıyması örneğinin 28'inden (% 70,0) ortalama 2,6 MPN/g düzeyinde, 40 tavuk burger örneğinin

yalnızca 1'inden (% 2,5) 0,36 MPN/g düzeyinde *Cl. perfringens* izole edildiğini bildirmişlerdir. Sarıgüzel (2005), Ankara'da tüketime sunulan değişik firmalara ait 100 hindi kıyması örneğinin 58'inden (%58.0) *Cl. perfringens* izole ve idendifiye edildiğini bildirmiştir.

Kalender ve Ertaş (2004), Elazığ ilinde yaptıkları araştırmada, 8 işletmeye ait 160 adet tavuğun bağırsak içeriğini incelemiş ve örneklerin 8'inden (%5) *Cl. perfringens* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Elde edilen izolatların 6'sı tip A olarak tiplendirilmiştir. *Cl. perfringens* tip A insanlarda gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olması sebebiyle, bu araştırma tavukların *Cl. perfringens* tip A yönünden halk sağlığı için önem taşıdığını göstermiştir.

Miwa ve ark., (1998) Japonya'da, her birinden 50 örnek olmak üzere sığır, domuz ve tavuk etlerinde enterotoksijenik *Cl. perfringens* varlığını ve miktarını araştırdıkları çalışmalarında, *Cl. perfringens* oranının; sığır etlerinde % 16, domuz etlerinde % 10 ve tavuk etlerinde ise % 84 olduğunu; enterotoksijenik *Cl. perfringens* kontrol yüzdesi ise; sığır etinde % 2, kanatlı etinde % 12 ve domuz etinde % 0 olduğunu saptamışlardır (Miwa ve ark., 1999; Miwa ve ark., 1998). Hall ve Angelotti (1965), 262 sığır eti ve ürünlerinin 113'ünden (%43.1) *Cl. perfringens* saptadıklarını, 50 sığır eti örneğinin 35'inden (%70), 26 tavuk örneğinin 15'inden (%58) oranında *C. pefringens* saptadıklarını kaydetmişlerdir.

Stagnitta ve ark., (2002) Arjantin'in San Luis eyaletinde; enterotoksijenik *Cl. perfringens*'in yaygınlığını araştırmak üzere yapılan çalışmada, 100 kıyma örneğinin 24'ünden (%24), 100 hamburger örneğinin 19'undan (%19), 315 taze sosis örneğinin 83'ünden (%26.35) ve toplamda 126 örnekten (% 24.46) *Cl. perfringens* izole ettiklerini, 126 örneğin 9'unun (%7.14) enterotoksijenik olduğunu bildirmişlerdir.

Singh ve ark., (2005) yaptıkları çalışmada, 70'i manda eti, 70'i keçi eti ve 71'i kanatlı eti olmak üzere 211 örnekte *Cl. perfringens* varlığı araştırmışlardır.

İncelemeleri sonucunda; keçi etinde % 91.4, kanatlı etinde % 70.4, manda etinde % 65.7 oranında *Cl. perfringens* izole etmişlerdir.

Cohen ve ark., (2008) yılında sığır kıymaları ve taze sosislerin mikrobiyel kalitesi üzerine yapılan bir çalışmada, kasap, süpermarket ve fast-food restoranlarından toplanan 150 sığır kıyması ve 100 sosis örneği incelenmiş, *Cl. perfringens*'in, baharatsız örneklerde % 8.7, baharatlı örneklerde ise % 29.6 oranında izole edildiği bildirilmiştir (Cohen ve ark., 2008). Arjantin'de yerel dükkanlarda satılan baharat örneklerinde *Cl. perfringens* varlığının araştırıldığı bir başka çalışmada, 115 örneğin 14'ünde (% 12.7) *Cl. perfringens* izole etmişler ve bu örneklerinde 4'ünün (%28.6) enterotoksijenik *Cl. perfringens* olduğu tespit edilmiştir (Aguilera ve ark., 2005). Craven (2001), kanatlı kesimhanesindeki broiler karkaslarının rinse örneklerinin %67'sinden *Cl. perfringens* izole edildiği kaydetmiştir.

Wen ve McClane (2004), yaptıkları çalışmada, ABD'de satışa sunulan gıdalar arasında 147 tavuk örneğinin 56'sından (%38), 68 hindi örneğinin 19'undan (%28), 83 sığır eti örneğinin 17'sinden (%21), 108 sığır kıyma örneğinin ise 25'inden (%23) sırasıyla 2-5 MPN/g, 1-19 MPN/g, 1-10 MPN/g, 3-32 MPN/g düzeylerinde *Cl. perfringens* ile kontamine olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular (% olarak); Kamber ve ark., (2007), Erol ve Çakmak (2000), Ali ve ark., (1991), Ali ve Fung (1991), Sarıgüzel (2005), Çakmak ve ark., (2006), Craven (2001), Hall ve Angelotti (1965) ve Singh ve ark., (2005)'nin yaptığı çalışmalar ile paralellik gösterirken, Tekinşen ve ark., (2001), Çon ve ark., (2002), Sancak ve ark., (1993), Kalender ve Ertuş (2004), Miwa ve ark., (1998), Stagnitta ve ark., (2002), Cohen ve ark., (2008) ve yaptıkları çalışmalarda elde edilen sonuçların bu çalışmanın sonuçlarından daha düşük olduğu görülmüştür. Bu farklılıkların; analizi yapılan materyallerin (kanatlı bağırsak içeriği, kanatlı prosesi rins örneği, sucuk, hindi eti, kanatlı eti, sığır eti v.b) farklı olması, örnek sayısı, kullanılan izolasyon metodları (ELISA, PCR, klasik kültür tekniği, MPN v.b),

kullanılan besi yerleri ve zenginleştirme brotları, örneklerin çalışıldığı dönem, örneklerin toplandığı yer, ürün ve üretim prosesindeki hijyenik şartlarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada MPN tekniği ile belirlenen *Cl. perfringens*'in ortalama düzeyleri, diğer araştırmacıların bildirdiği düzeylerden yüksek bulunmuştur. Craven (2001), kanatlı karkas rins örneklerinden (%67) ortalama *Cl. perfringens* sayısını MPN log₁₀ 1.20 olarak, benzer şekilde Lin ve Labbe (2003)'de tavuk örneklerinden (karkas, but, boyun) 3.05 ve >1.100 MPN/g arasındaki düzeylerde *Cl. perfringens* saptadıklarını bildirmişlerdir. Buna ek olarak, Miwa ve ark., (1998) tavuk eti örneklerinden < 10² ve 10⁴ MPN/100g (25 örnekte <10², 11 örnekte 10²-10³ ve 6 örnekte 10³-10⁴ MPN/100g) düzeyinde *Cl. perfringens* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen MPN/g düzeyleri (50 tavuk kıyma örneği: 3,5 MPN/g; 50 sığır kıyma örneği: 4.9 MPN/g; tüm örneklerde: 3.0 ile 20.0 MPN/g) Wen ve McClane (2004)'in çalışması (147 tavuk örneği: 2-5 MPN/g; 83 sığır eti örneği: 1-10 MPN/g; 108 sığır kıyma: 3-32 MPN/g) ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada, hava sıcaklığının artması ile *Cl. perfringens* oranının arttığı, sıcak aylarda %61 oranında saptandığı, ayrıca sığır kıyma örneklerindeki *Cl. perfringens* oranı (%68), tavuk kıyma örneklerinden (%54) yüksek olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, Krause ve ark (1972) (%90), Sarıgüzel (2005) (%78.3), Çakmak ve ark (2006)'da (%67.9) sıcak aylarda *Cl. perfringens* kontaminasyon düzeyinin arttığını kaydetmişlerdir.

Besleyici değeri yüksek ve pahalı ürün olan sığır ve tavuk kıymaları her türlü ticari hileyi gizleyebildiğinden sık sık eleştirilere hedef olmaktadır. Sağlıklı hayvanlardan elde edilen etlerin iç kısımlarında mikroorganizma yükü daha az iken, kıyma haline getirilmeleri ve satış yerlerindeki bekletme süresinin az ya da çok olmasına göre kontaminasyon yoğunluğu değişmektedir. Bu yoğunluğun en büyük sebebinin de etlerin kıyılması esnasında yapılan işlemler olduğu kaydedilmiştir (Müslüm ve ark., 1997).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışmada Afyonkarahisar’da değişik firmalardan alınan 50 tavuk kıyma ve 50 sığır kıyma olmak üzere toplam 100 kıyma örneğinden 62’sinin (%62) 3.0-20 MPN/g düzeyleri arasında *Cl. perfringens* ile kontamine olduğu saptanmıştır. Kıyma örneklerinin büyük bir kısmının kontamine olması demek, tüketici sağlığı açısından potansiyel tehdit anlamına gelmektedir. Çiğ veya yetersiz pişirilmiş kıyma tüketiminin ve hatta ısıya dirençli *Cl. perfringens* suşlarından kaynaklı gıda infeksiyonları halk sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir.

Dünyada ve ülkemizde *Cl. perfringens* kaynaklı zehirlenmelerle oldukça sık karşılaşıldığı saptanmıştır (Junega ve ark., 2006; Riley ve ark., 1999). Son zamanlarda gıda kaynaklı hastalıkların artmasıyla birlikte, gıdalarda görülen patojen mikroorganizmalar ön plana çıkmıştır (Ekici ve ark., 2008). Çeşitli türde mikroorganizmaların üreyip gelişmeleri için elverişli bir ortama sahip olan tavuk eti ve sığır kıyma, kolaylıkla bozulduğu ve önemli mikroorganizmalarla kontamine olabildiği için halk sağlığı açısından büyük sorunlar oluşturabilmektedir (Gracey ve ark., 1999). Halk sağlığını tehdit eden böylesi bir unsur için yapılabilecek iyileştirme çalışmalarına önem vermek gerekmektedir. Tüm kıyma ve kıyma ürünlerinden kaynaklanabilecek gıda infeksiyon ve intoksikasyonlarının en aza indirilmesi için, dünyanın ve ülkemizin uygun gördüğü standartların baz alınması, HACCP konseptinin uygulanması, sağlıklı hayvan sürülerinin veteriner hekim kontrolünde şartlara uygun kesilmesi, tüm kontaminasyonların önlenmesi, işçilerin temiz ve bilinçli çalışmaları, soğuk zincirin sürekliliğinin sağlanması, kıyma makine ve işleme ortamının hijyen kurallarına uygun olması gerekmektedir. Böylece, halk sağlığının korunmasıyla beraber ekonomik kayıpların azaltılması, hasta sayısında düşüşlerin görülmesi, kasap ve şarküterilere olan müşteri güveninin artması sağlanmış olur. Bunun için, öncelikle personelin ve tüketicinin bilinçlendirilmesi gerekmekte ve dünya ile ülkemizin öngördüğü birtakım normların yerine getirilmesi ayrıca bilim

adamlarının aralıksız araştırma ve istatistiki çalışmalarla katkıda bulunmaları gerekmektedir.

Türkiye’de analiz edilen et ve et ürünlerinin değişik mikroorganizmalar ile kontaminasyon düzeyinin çok yüksek olduğu, gıda infeksiyon ve intoksikasyonları oluşturabilecek patojen mikroorganizmaları içerdiği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Ekici ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda mezbaha ve et işletmelerinde sanitasyon ve hijyenik koşulların yeterli düzeyde olmadığı, etlerin çekilmesi, karıştırılması ve parçalanması gibi işlemler sırasında kullanılan ekipman ve çalışan personelin özellikle kıymaların çapraz kontaminasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (Anon, 2006e). Personel, alet ve ekipman hijyeninin yeterli olmadığı kesimhane ve et işletmelerinde, insan ve hayvan bağırsak florasında bulunan *Cl. perfringens* ile doğal çevrede yaygın olarak yer alan spor formları ürünleri kolaylıkla kontamine ederek gıda kaynaklı infeksiyon oluşum riskini artırmaktadır.

Etlerin kıyma haline getirilmesi, kas dokusuna ait doğal engellerin yok olmasına ve mikroorganizmaların etin her tarafına dağılmasına neden olmakla birlikte, kaslara ait hücre sıvısının kıyma kitlesine karışmasıyla bakterilerin üreyip gelişmesi için uygun bir ortam hazırlamaktadır. Ette patojen mikroorganizma bulunması ya da işlem sırasında bulaşması (çapraz kontaminasyon) da sağlık sorunlarının doğmasına neden olabilmektedir (Tunail, 2000).

Sağlıklı et ve et ürünü üretimini sağlayabilmek amacıyla, öncelikle kesimde sağlıklı ve veteriner hekim kontrolünden geçmiş kesim hayvanlarının kullanılması, kesim işleminin asgari hijyen şartlarına sahip ve teknik özellikleri yeterli olan mezbahalarda gerçekleştirilmesi, dağıtım ve pazarlama süresince soğuk zincirin kırılmasını önleyen tedbirlerin alınması ile tüm aşamalarda görevli personelin eğitimi ve tüketicinin bilinçlendirilmesiyle birlikte, yasal denetimlerin etkinleştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Kıyma haline getirilmiş etler, işlenmemiş etlere göre mikrobiyal kontaminasyona daha müsaittir. Etlerin kıyma şekline getirildiği yerin

hijyenik durumuyla birlikte, kesilen hayvanın türü de kıymanın kontaminasyon düzeyini etkilemektedir (Gönülalan ve Köse, 2002).

Hijyen kurallarına mezbahadan başlayarak titizlikle uyulması, kıymaların önceden büyük miktarda hazırlanmaması veya hazır olarak satışa sunulmaması ve mümkün olduğunca kısa süre muhafaza edilerek yeterli ısı işleminden sonra tüketilmesi önerilebilir. Asıl önem olarak; ürüne ait bir HACCP programı geliştirilmesi, patojenlerin elemine edilmesinde veya kabul edilebilir seviyeye düşürülmesinde yararlı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- ADAMS, M.R., MOSS, M.O. (1995). Bacterial agents of foodborne illnesses. In: *Food Microbiology*, The Royal Society Of Chemistry, Cambridge. 177 – 181.
- AGUILERA, M.O., STAGNITTA, P.V., MICALIZZI, B., GUZMÁN, A.M.S. (2005). Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in Argentina. *Anaerobe*. **11(6)**: 327 - 334.
- ALI, M.S, FUNG, D.Y.C. (1991). Occurrence of *Clostridium perfringens* in ground beef and ground turkey evaluated by three methods. *Journal Food Safety*. **11**: 197 - 203.
- ALPHONS, J.A.M, ASTEN, V., NİKOLAOU, G.N., GÖNEA., A. (2008). The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the β 2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *The Veterinary Journal*, Utrecht University, Yalelaan. **183(2)**: 135 – 140.
- AL-KHALDI, S.F., MYERS, K.M., RASOOLY, A., CHIZHIKOV, V. (2004). Genotyping of *Clostridium perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. *Molecular and Cellular Probes*. **18**: 359 – 367.
- ANDERSSON, A., RONNER, U., GRANUM, P.E. (1995). What problem does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*. **28**: 145 – 156.
- ANONİM (2011a). Lee, K., Lillehoj, HS., Li, G., Park, MS., Jang, SI., Jeong, W., Jeoung, HY., An, DJ., Lillehoj, EP. Identification and cloning of two immunogenic *Clostridium perfringens* proteins, elongation factor Tu (EF-Tu) and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) of *Cl. perfringens* Erişim adresi: [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii2011>] Erişim tarihi: 25.09.2011.
- ANONİM (2011b). World Health Organisation. Institute of infectious diseases risk assesment of infectious diseases. Erişim adresi: [<http://www.wpro.who.int/nr/rdonlyres/89327fbc>] Erişim tarihi: 24.09.2011.
- ANONİM (2011c). World Health Organisation. Guide to ship sanitation. Third Edition. Geneva. Erişim adresi: [<http://whqlibdoc.who.int/publications/2011>]. Erişim tarihi: 26.09.2011.
- ANONİM (2009a). Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. **58(22)**: 609 – 615.
- ANONİM (2009b). *Clostridium perfringens* Food Poisoning Outbreak in Northeast Kansas-December 2006. Erişim adresi: [http://www.kdheks.gov/epi/download/C_perfringes_state_agency_X_final_report.pdf] . Erişim tarihi: 01.01.2010.
- ANONİM (2008). World Health Organisation. Foodborne disease outbreaks. Guidelines for investigation and control. Erişim adresi [<http://www.who.int/foodsafety/publications>]. Erişim tarihi: 27.09.2011.
- ANONİM (2006a). Center of Disease Control and Prevention. 2006 SummaryStatistics.. Erişim adresi: [http://www.cdc.gov/outbreaknet/pdf/surveillance/2006_linelist.pdf]. Erişim tarihi: 31.12.2009.

- ANONİM (2006b). Food Safety. Erişim adresi: [<http://www.who.int/foodsafety/en/kugvkhgv>]. Erişim tarihi: 04.11.2006.
- ANONİM (2006c). Managing food safety: A regular's manual for applying HACCP principles to risk-based retail and food service inspections and evaluating voluntary food safety management systems. Erişim adresi: [<http://www.fda.gov/downloads/Food/Foodsafety/RetailFoodProtection/ManagingFoodSafetyHACCPPrinciples/Regulators/UC>]. Erişim tarihi: 21.10.2011.
- ANONİM (2006d). The Kansas Department of Health and Environment. Erişim adresi: [<http://www.kdheks.gov/epi/outbreaks.htm>]. Erişim Tarihi: 01.01.2010.
- ANONİM (2006e). Kıyma Makinelerinin Hijyeni. Erişim adresi: [<http://www.ensonhaber.com/Saglik/21800/kiyma-makinelerinin-hijyeni.html>]. erişim tarihi: 08.11.2011.
- ANONİM (2005a). Center of Disease Control and Prevention. 2005 Summary Statistics. Erişim adresi: [http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo2005/2005_Linelist.pdf]. Erişim tarihi: 31.12.2009.
- ANONİM (2005b). United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Science and Technology, Microbiology Division, May 1996, Nationwide Raw Ground Turkey Microbiological Survey. Erişim adresi: [<http://www.meatami.com/ht/a/GetDocumentAction/i/1404>]. Erişim tarihi: 01.01.2010.
- ANONİM (2004). Center of Disease Control and Prevention. 2004 Summary Statistics. Erişim adresi: [http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb/fbo2004/Outbreak_Linelist_Final_2004.pdf]. Erişim tarihi: 31.12.2009.
- ANONİM (2003). Center of Disease Control and Prevention. 2003 Summary Statistics. Erişim adresi: [www.cdc.gov]. Erişim tarihi: 31.09.2011.
- ANONİM (2001a). BAM: Bacteriological Analytical Manual. *Clostridium perfringens*. Erişim adresi: [[www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalytical Man](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalMan)]. Erişim tarihi: 23.10.2011.
- ANONİM (2001b). Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and Management of Foodborne Illnesses: a Primer for Physicians. *MMWR*. 50(2), Erişim adresi: [<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml>]. Erişim tarihi: 05.10.2011.
- ANONİM (2000). Center of Disease Control and Prevention. 2000 Foodborne Disease Outbreak Line Listing. Erişim tarihi: 31.12.2009.
- ANONİM (1996): Microorganisms in foods. Characteristics of microbial pathogens. Great Britain by St. Edurdsbury Press Ltd. ISBN 041247350X. St. Edmunds. Suffolk. **6**: 112 – 126.
- AYANOĞLU, K. (2008). Laboratuara Giriş ders notları eki. Erişim adresi: [www.skaraagacmyo.sdu.edu.tr/lab_dersnot/Laboratuvara_Girisdersnotlari.pdf]. erişim tarihi: 18.07.2011.
- BESLİ, G.E., ERGÜVEN M. (2009). Çocuklarda besin ve mantar zehirlenmeleri. Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Pediatri Kliniği, İstanbul. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi*. **3**: 126 – 131.

- BYRNE, B., SCANNELL, A.G.M., LYNG, J., BOLTON, D.J. (2008). An evaluation of *Clostridium perfringens* media. *Food Control*. **19(11)**: 1091 – 1095.
- BRYNESTAD, S., GRANUM, P.E. (2002) *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*. **74**: 195 – 202.
- CANARD, B., SAINT-JOANIS, B., COLE, S.T. (1992). Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *Clostridium perfringens*. *Molecular Microbiology*. **6**: 1421 – 1429.
- CAROLI, G., ARMANI, G., SCIACCA, A., BARGAGNA, M., LEVRE, E. (1977). Two outbreaks of “*Clostridium perfringens*” food poisoning: epidemiological remarks. *Ann Sclavo*. **19**: 494 – 50.
- CATO, J.C. (1998). Economic values associated with seafood safety and implementation of seafood. Erişim adresi: [<http://www.fao.org/docrep/003/x0465e/X0465E04.htm>]. Erişim tarihi: 01.01.2010.
- COHEN, N., FILLIOL, I., KARRAOUAN, B., BADRI, S., CARLE, I., ENNAJI, H., BOUCHARIF, B., HASSAR, M., KARIB, H. (2008). Microbial quality control of raw ground beef and fresh sausage in Casablanca. *Journal of Environmental Health*. **71(4)**: 51 – 55.
- COLLIE, R.E., McCLAIN, B.A. (1998). Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in *Clostridium perfringens* isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 30 – 36.
- CRAVEN, S.E. (2001). Occurrence of *Clostridium perfringens* in the broiler chicken processing plant as determined by recovery in iron milk medium. *Journal of Food Protection*. **64**: 1956-1960.
- ÇAKMAK, Ö. F., BÜLÜR ORMANCI S., TAYFUR M., EROL, İ. (2006). Presence and Contamination Level of *Clostridium perfringens* in Raw Frozen Ground Poultry and Poultry Burgers. *Türk Journal of Veterinary Animal Science*. **30**: 101-105.
- ÇON, A.H., DOĞU, M., GÖKALP, H.Y. (2002). Afyon’da büyük kapasiteli et işletmelerinde üretilen sucuk örneklerinin bazı mikrobiyolojik özelliklerinin periyodik olarak belirlenmesi. *Türk Journal of Veterinary Animal Science*. Tübitak. **26**: 11 – 16.
- DIANE, G.N., KOOPMANSB, M., VERHOEFB, L., DUIZERB, E., AIDARA-KANEC, A., SPRONGB, H., OPSTEEGHB, M. (2010). Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*. **139(1)**: S3 – S15.
- DORMAN, V., ASLAN, S., CEYLAN, A., NACAR, K.S., GÜNEL, A., SARI, H., YAŞLI, N., YALIM, D. (2010). Aynı fabrikadan yemek alan iki inşaat firması işçilerinde meydana gelen toplu besin zehirlenmesi. *Dicle Tıp Dergisi*. **37(3)**: 248 – 253.
- EISGRUBER, H., SCHALCH, B., SPERNER, B., STOLLE, A. (2000). Comparison of four routine methods for the confirmation of *Clostridium perfringens* in food. *International Journal of Food Microbiology*. **57**: 135 – 140.
- EROL, İ., ÇAKMAK, Ö. (2000). Ankara’da tüketime sunulan sığır kıymalarında *Clostridium perfringens*’in varlığı ve kontaminasyon düzeyi. Yüksek lisans tezi.

- EKİCİ, L., TELLİ, R., YETİM, H. (2008). Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyon bakterileri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. **2**: 29 – 42.
- EROL, İ. (1999). GIDA HİJYENİ. Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Besin Hijyeni ve Tek. Anabilim Dalı, Ankara Üniv. Basımevi.
- EROL, İ. (2007). GIDA HİJYENİ ve MİKROBİYOLOJİSİ. Ankara. Pozitif Matbaacılık. 154 – 161.
- FACT, P., POPOFF, M.R. (1997). Detection of enterotoksigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. *Applied and Environmental Microbiology*. **63(11)**: 4232 – 4236.
- FDA (2001). Food Drug and Administration. Bacteriological Manual. *Clostridium perfringens*.
- FRAZIER, W.C., WESTHOFF, D.C. (1989). Food-borne illness: Bacterial in: Food Microbiology. McGraw Hill Book Co., Singapore. 401 – 427.
- FUKUSHIMA, H., HOSHINA, K., NAKAMURA, R., ITO, Y. (1987). Raw beef, pork and chicken contaminated with *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica* and *Clostridium perfringens* comparative study. *Zbl. Bakt. Hyg. B*. **184**: 60 – 70.
- GÖNÜLALAN, Z., KÖSE, A. (2002). Kayseri ilinde satışa sunulan sığır kıymalarının mikrobiyolojik kalitesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. **17(1)**: 49 – 53.
- GRACEY, J., COLLINS, D., HUEY R. (1999). FOOD HYGIENE (10th edition), Harcourt Brace Company.
- GRANUM, P., (1990). *Cl. perfringens* toxins involved in food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*. **10**: 101 – 112.
- GROSS, T.P., KAMARA, L.B., HATHEWAY, C.L., POWER, P., LIBONATI, J.P., HARMON, S.M., ISRAEL, E. (1989). *Clostridium perfringens* food poisoning: Use of serotyping in an outbreak setting. *Journal of Clinical Microbiology*. **27(4)**: 660 – 663.
- GÜNEŞ V., Ünver A., Çitil M., Erdoğan H.M., (2004) . Kars Yöresi Neonatal Buzağı İshallerinde E.coli Serotip O157 ve *Clostridium perfringens* TipA a-Toksini. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **10(1)**: 41 – 45.
- HALL, G., KIRK, M.D., BECKER, N., GREGORY, J.E., UNICOMB, L., MILLARD, G., STAFFORD, R., LALOR, K., OZFOODNET WORKING GROUP. (2005). Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. *Emerging Infectious Diseases*. **11**: 1257 – 1264.
- HALL, H.E., ANGELOTTI, R. (1965). *Clostridium perfringens* in meat and meat products. *Applied Microbiology*. **13(3)**: 352-357.
- HALL, H.E., ANGELOTTI, R., LEWIS, K., FOTER, M. (1962). Characteristics of *Clostridium perfringens* strains associated with food and food-borne disease. *Journal of Bacteriology*. **85**: 1094 – 1103.
- HANS P Blaschek (1999). Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois, Urbana, USA. 431 – 670 .

- HARDY, S.P., PAREKH, N., DENMEAD, M., GRANUM, P.E. (1999). Cationic currents induced by *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in human intestinal CaCO-2 cell. *Journal of Medical Microbiology*. **48**: 235 – 243.
- HOBBS, C.B., ROBERTS, D. (2007). Food poisoning and food hygiene. 7th. Edward Arnold London. **4**: 59 – 92 .
- HOBBS, C.B., ROBERTS, D. (1993). Food poisoning and food hygiene 6 th ed. Edward Arnold, London. **29**: 80 – 127.
- HUANG, L., (2003). Estimation of growth of *Clostridium perfringens* in cooked beef under fluctuating temperature conditions. *Food Microbiology*. **20**: 549 – 559.
- HUNTER, S.E., BROWN, E.J., OYSTON, P.C.F., SAKURAI, J., TITBALL, R.W. (1993). Molecular genetic analysis of b-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with a-toxin, g-toxin and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **61**: 3958 – 3965.
- İNAL, T. (1992). Besin hijyeni, hayvansal gıdaların sağlık kontrolü. İkinci baskı. İstanbul. Final Ofset. 90 – 103.
- İŞERİ, Ö., EROL, İ. (2009). Hindi etinden kaynaklanan başlıca bakteriyel infeksiyon intoksikasyonlar. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **56**: 47– 54.
- JAY, J.M. (2000). Food poisoning caused by Gram-positive sporeforming bacteria. In: MODERN FOOD MICROBIOLOGY. USA: AVI Book. 461 – 485.
- JAY, J.M. (1992). Food poisoning caused by Gram-positive sporeforming bacteria. In: MODERN FOOD MICROBIOLOGY. USA: AVI Book, New York. 479 – 487.
- JOHANSSON, A. (2006). *Clostridium perfringens* the causal agent of necrotic enteritis in poultry. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala 2006.
- JUNEGA, V.K., HUANG, L., THIPPAREDDI, H.H. (2006). Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* in cooked cured pork. *International Journal of Food Microbiology*. **110**: 85-92.
- KALENDER, H., ERTAŞ, H.B. (2004). Tavuklardan *Clostridium perfringens*'in izolasyonu ve Alfa toksin geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 847 – 851.
- KALENDER, H., ERTAŞ, H.B., ÇETİNKAYA, B., MUZ, A., ARSLAN N. (2004). Koyunlarda toksijenik *C.perfringens*'in polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanması. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu. Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu. Elazığ. Proje no: VHAG-1864 (102V005).
- KAMBER, U., GÖKÇE, H.I., ELMALI, M. (2007). *Clostridium perfringens* and its toxins in minced meat from Kars, Turkey. *Food Additives and Contaminants*. **24(7)**: 673 – 678.
- KARTAL, D. E. 2010. Gıda Kaynaklı İnfeksiyonlar. Osmangazi Üniv. Tıp Fak. İnfeksiyon Hast. Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir. Erişim adresi: [<http://www.uveforum.net/1598-hastaliklar/216977-gida-kaynakli-infeksiyonlar/>]
- KESSEL, A.S., GILLESPIE, I.A., O'BRIEN, S.J., ADAK, G.K., HUMPHREY, T.J., WARD, L.R. (2001). General outbreaks of infectious intestinal disease linked with

- poultry, England and Wales, 1992-1999. *Communicable Disease and Public Health*. **4**: 171 – 177 .
- KRAUSE, P., SCHMOLDT, R., TOLGAY, Z., YURTYERİ, A. (1972). Mikrobiologische und serologische Untersuchungen an Lebensmitteln in der T.rkei. *Fleischerei*. **1**: 83-86.
- LABBE, R.G., (1989). *Clostridium perfringens*. In: Foodborne Bacterial Pathogens, M.P. Doyle (Ed). Marcel Decker Inc., Newyork and basel, ABD, ISBN:0-8247-7866-9. 191 – 227, SARIGÜZEL, D. (2005). Ankara’da tüketime sunulan hindi kıymalarında *Clostridium perfringens*’in varlığı ve elde edilen izolatlarda *cpe* geninin saptanması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi’den alınmıştır.
- LABBE, R.G., DUNCAN, CL. (1977). Evidence for stable messenger ribonucleic acid duringsporulation and enterotoxin synthesis by *Clostridium perfringens* type A. *J. Bacteriol.* **12**: 843 – 849, D. (2005). Ankara’da tüketime sunulan hindi kıymalarında *Clostridium perfringens*’in varlığı ve elde edilen izolatlarda *cpe* geninin saptanması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi’den alınmıştır.
- LABBE, R.G. (2000). *Clostridium perfringens*. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. Eds. The Microbiological Safety and Quality of Food. Vol II. Aspen Pub. Gaithersburg, Maryland.; 1110-1135, ÇAKMAK, Ö. F., BÜLÜR ORMANCI S., TAYFUR M., EROL,İ. (2006). Presence and Contamination Level of Clostridium perfringens in Raw Frozen Ground Poultry and Poultry Burgers. *Türk Journal of Veterinary Animal Science*. **30**: 101-105’den alınmıştır.
- LIN, Y.T., LABBE, . R. (2003). Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolated from retail foods in the United States. *Appl. Environ., Microbiol.* **69**: 1642-1646, 2006 ÇAKMAK, Ö. F., BÜLÜR ORMANCI S., TAYFUR M., EROL,İ. Presence and Contamination Level of Clostridium perfringens in Raw Frozen Ground Poultry and Poultry Burgers. *Türk Journal of Veterinary Animal Science’dan alınmıştır*.
- MAHONY, D.E., CLARK, G.A., STRINGER, M.F., MacDONALD, M.C., DUCHES, D.R., MADER., J.A. (1986). Rapid extraction of plasmids from *Clostridium perfringens* type A. *Applied and Anvironmental Microbiology*. **149**: 287 – 293.
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L.F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infec. Diseases*. **5(5)**, 607 – 625.
- McCLANE, B.A. (2001). The complex interactions between *Clostridium perfringens* enterotoxin and epithelial tight junctions. *Toxicon*. **39**: 1781 – 1791.
- McCLANE, B.A., HANNA, P.C., WNEK, A.P. (1988). *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Microbial Pathogenesis*. **4**: 317 – 323 .
- McDONEL, J.L. (1986). Toxins of *Clostridium perfringens* types A, B, C, D, E. In: Pharmacology of Bactetrial Toxins. F. Doner, J. Drews (Eds.). Pergamon Press, Oxford. 477 – 517.
- MENGERT, U., GARCIA – SUAREZ, O., JANETSCHKE, P. (1993). Untersuchungen zur beeinflussung der serologischen aktiviatæet des *Clostridium perfringens* enterotoxins. *Fleischwirtsch.* **73(6)**: 688 – 690.

- MERRIL, G.A., RIVERA, V.R., NEAL, D.D., YOUNG, C., POLI, M.A. (2006). A quantitative electrochemiluminescence assay for *Clostridium perfringens* alpha toxin. *Analytical Biochemistry*. **357**: 181 – 187.
- MIIA L., HEIKINHEIMO, A., LAHTIA, P., KORKEALA, H. (2010). Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiology*. **28**(2): 192 – 198 .
- MIMS, C.A., PLAYFAIR, J.H.L., ROITT, I.M., WAKELIN, D., WILLIAMS, R., ANDERSON, R.M. (1993). Gastrointestinal tract infections. In: Medical Microbiology Mosby, London. 11 – 15.
- MIWA, N., MASUDA, T., TERAJ, K., KAWAMURA, A., OTANI, K., MIYAMOTO, H. (1999). Bacteriological investigation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning caused by Japanese food without animal protein. *International Journal of Food Microbiology*. **49**(1-2): 103 – 106.
- MIWA, N., NISHINA, T., KUBO, S., ATSUMI, M., HONDA, H. (1998). Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. *International Journal of Food Microbiology* **42**(3): 195 - 200.
- 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. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **59**: 557-560.
- MÜSLÜM, A., GÜLMEZ M., KAMBER U., 1997. Kars ilinde tüketime sunulan kıymalarda bazı patojen mikroorganizmaların araştırılması ve kıymaların mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **3**(1): 57 – 65.
- MYERS, G.S.A., RASKO, D.A., CHEUNG, J.K. (2006). Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *C.perfringens* *Genome. Res.* **16**: 1031 – 1040.
- NAKAMURA, M, KATO, A., TANAKA, D., GYOBU, Y., HIGAKI, S., KARASAWA, T., YAMAGISHI, T. (2004). PCR identification of the plasmid-borne enterotoxin gene (cpe) in *Clostridium perfringens* strains isolated from food poisoning outbreaks. *International Journal of Food Microbiology*. **294**: 261 – 265.
- NOVAK, J.S., JUNEJA, V.K. (2002). *Clostridium perfringens*: hazards in new generation foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **3**(2): 127 – 132.
- OJENIYI, B., CHRISTENSEN, J., BISGAARD, M. (2000). Comparative investigations of *Listeria monocytogenes* isolated from a turkey processing plant, turkey products, and from human cases of listeriosis in Denmark. *Epidemiology and Infection*. **125**: 303 – 308.
- OLIVEIRA, T.L.C., SOARES, R.A., RAMOS,E.M., CARDOSO, M.G., ALVES, E., PICCOLI, R.H. (2011). Anti Microbial Activity of Satureja Montana L. Essential *Clostridium Perfringens* type A Inoculated In Mortadella-Type Sausages Formulated With Different Levels Of Sodium Nitrate. *International Journal Of Food Microbiology*. **144**: 546-555.

- OZFOODNET WORKING GROUP. (2004). Burden and causes of foodborne disease in Australia: annual report of the OzFoodNet network, 2005. *Commun Dis Intell.* **30**: 278 – 300.
- OZFOODNET WORKING GROUP. (2004). Reported foodborne illness and gastroenteritis in Australia: annual report of the OzFoodNet network, 2004. *Commun Dis Intell.* **29**: 164 – 190.
- OZFOODNET WORKING GROUP. (2003) Foodborne disease investigation across Australia: annual report of the OzFoodNet network, 2003. *Commun Dis. Intell.* **28**: 359 – 389.
- OZFOODNET WORKING GROUP. (2002). Foodborne disease in Australia: incidence, notifications and outbreaks. Annual report of the OzFoodNet network, 2002. *Commun Dis. Intell.* **27**: 209 – 243.
- QUESTED, T.E., COOK, P.E., GORRIS, L.G.M., COLE, M.B. (2010). Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology.* **139(1)**: S29 – S42.
- RAY, B. (1996). Foodborne Toxicoinfectious, in: FUNDAMENTAL FOOD MICROBIOLOGY. CRC Press. 323 – 327.
- RILEY, A., KANG, D.H., FUNG, D.Y.C. (1999). Comparison of five anaerobic incubation methods for enumeration of *Clostridium perfringens* from foods. *Journal of Food Prot.* **62(9)**: 1041 – 1044.
- ROOD, J.L., COLE, S.T. (1991). Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* **55(4)**: 621 - 648.
- ROOD, J.I. (1998). Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 333 - 360. Gurjar, A.,(2008). Characterization of *Clostridium perfringens* beta2 toxin. The Pennsylvania State University'den alınmıştır.
- SANCAK, Y.C., BOYNUKARA, B., AĞAOĞLU, S. (1993). Van'da tüketime sunulan kıymaların mikrobiyolojik kalitesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* **44**: 73 – 86.
- SARIGÜZEL, D. (2003). *Clostridium perfringens* enterotoksinleri. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilimdalı Semineri.
- SARIGÜZEL, D. (2005). Ankara'da tüketime sunulan hindi kıymalarında *Clostridium perfringens*'in varlığı ve elde edilen izolatlarda *cpe* geninin saptanması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- SAWIRES, Y.S., SONGER, J.G. (2006). *Clostridium perfringens*: Insight into virulence evolution and population structure. *Anaerobe.* **12**: 23 – 43.
- 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*. an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **11**: 255 – 262 . Hans, P., Riemann,H., Dean, O., (2008). Foodborne Infections and intoxications. 110-180 'den alınmıştır.
- 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*, an anaerobic flesh-eater. *PNAS*. **99(2)**: 996 – 1001. Hans, P., Riemann, H., Dean, O., (2008). Foodborne Infections and intoxications. 110-180 ‘den alınmıştır
- SINGH, R.V., BHILEGAONKAR, K.N., AGARWAL, R.K. (2005). Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. *J. Food Safety*. **25(2)**: 146 – 156. 146 – 156. SUN, DA-W., (2005). Handbook of Food Safety Engineering 1-54 ‘den alınmıştır.
- SOFOS, J. N. (2005). İMPROVİNG THE SAFETY OF FRESH MEAT, Washington. Woodhead publishing limited Cambridge england 2005 by taylor&Francis.
- SONGER, J.G., SAWIRES, Y.S. (2005). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. **11**: 262 - 272.
- SORIANO, J.M., RICO, H., MOLTO, J.C., MANES, J. (2002). Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. *Food Control*. **13**: 253 – 261.
- STAGNITTA, P.V., MICALIZZI, B., GUZMÁN, A.M.S. (2002). Prevalence of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Meats in San Luis, Argentina. *Anaerobe*. **8(5)**: 253 - 258.
- STEINTHORSDOTTIR, V., HALLDORSSON, H., ANDRESSON, O.S. (2000). *Clostridium perfringens* b-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. *Microb. Pathog.* **28**: 45 – 50.
- STEVENS, D.L., MITTEN, J., HENRY, C. (1987). Effects of α and θ toxins from *Clostridium perfringens* on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Infect. Dis.* **156**: 324 – 333.
- TAVRIS, D.R., MURPHY, R.P., JOLLEY, J.W., HARMON, S.M., WILLIAMS C., BRUMBACK, C.L. (1985). Two successive outbreaks of *Clostridium perfringens* at a state correctional institution. *American Journal Public Health*. **75(3)**: 287 - 288.
- TEKİNŞEN, OC., YURTYERİ, A., MUTLUAR B. (2001). Ankara’ da Satılan Kıymaların Bakteriyolojik Kalitesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **27**: 45 – 63.
- TEZAGUIC, F., FALLS, R.S.W., HEADLEY, V. (2000). Don’t let the turkey get you down. *Disease Prevention News*. **60**: 1 – 8.
- TODD E.C. Epidemiology of foodborne diseases: a World-wide review. *World Health Stat Q.* (1997). **50**: 30 – 50
- TUNAİL, N. (2000). GIDA MİKROBİYOLOJİSİ VE UYGULAMALARI. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını. Sim Matbaası, Ankara **522(3)**, 5.kısım.
- ÜNLÜTÜRK, A., TURANTAŞ, F. (1998). GIDA MİKROBİYOLOJİSİ 1. Baskı. Isbn: 975-483-383-4. Mengitan Basımevi, Çınarlı, İzmir.
- WEN, Q., McClane B.A. (2004). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* Type A isolates in American retail foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **7(5)**: 2685-2991.

- WESTHOFF, D.; FELDSTEIN, F.(1976). Bacteriological analysis of ground beef, *Journal of Milk and Food Technology*. **39(6)**: 401 – 404
- WILLIAM G., WILSON. (2005). WILSON'S PRACTICAL MEAT INSPECTION, Seventh edition. 433 – 444.
- ZHAOA Y., KANGA, L., GAOA, Shan., ZHAUA, Y., SUB, L., XINA W., SUA Y., WANGA J. (2011). Expression and purification of functional *Clostridium perfringens* alpha and epsilon toxins in *Escherichia coli*. *China* **77**: 207 – 213