

08. *Clostridium botulinum*

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü
GDM310 Gıda Mikrobiyolojisi II Ders notu 08.

08.01. Tanımı

Diğer mikroorganizmalardan farklı olarak *Cl. botulinum*, tek bir bakteri türü değildir. Botulinum nörotoksini (botulin) olarak adlandırılan karakteristik proteini üreten tüm mikroorganizmalar *Cl. botulinum* olarak tanımlanır. Bu mikroorganizmalar önceden *Bacillaceae* familyası içinde sınıflandırılırken, yeni taksonomik çalışmalar sonunda Clostridia sınıfı, *Clostridiales* takımı *Clostridiaceae* familyası altına alınmıştır. Gram pozitif, çubuk şeklinde, sporlu, anaerob bir bakterilerdir. Sporları terminal ya da subterminal formda bulunur.

Protein yapısında olan botulin, bugün için bilinen en kuvvetli biyolojik toksinler arasındadır. Bu toksinin yapmış olduğu botulizm, kayıtlara geçmiş en eski hastalıklardan birisidir. Bizans İmparatoru Leo VI (886-912), botulizm olarak tanımlanmış olmasa da kan sosilerinin o tarihte üretimi ve tüketimini yasaklamıştır. Kan sosisi, kesilen havyanın kanından yapılan bir çeşit sosistir. Tıbbi kayıtlara 18. YY sonunda geçmiştir. 1793 yılında Güney Almanya'da kan sosisinden 13 kişinin hastalanması ve 6'sının ölmesi üzerine dikkatler kan sosisi üzerinde yoğunlaşmış, Almanya'da 1817-1822 yılları arasında 230 vaka belirlenmiştir. Son olarak 1895 yılında Belçika'da 34 kişinin hastalanması sonrasında Ghent üniversitesi bakteriyoloji profesörü Emile Pierre van Ermengem tarafından etmen saptanmıştır.

Gıda kaynaklı botulizm, yara botulizmi, bebek botulizmi şeklinde görülebilir. Yara botulizmi ise çok sıklıkla uyuşturucu kullananlarda enjeksiyon bölgesinde ya da kokain çekenlerde burun ve sinüslerde görülmektedir.

Toksin, sabotaj ya da biyolojik silah olarak da kullanılabilir. Havaya aerosol olarak salınan toksinin 1 gramının 1,5 milyon kişiyi öldürmeye yeterli olduğu bildirilmektedir. Soluma ile alınacak toksinin öldürücü dozunun 0,7-0,9 ng olduğu tahmin edilmektedir.

Su kaynakları, sabotaja karşı açık olmakla birlikte, suların dezenfeksiyonu için kullanılan klor, toksini kolaylıkla parçalamaktadır.

Botulin, bugün için bilinen en tehlikeli toksinlerden birisi olmakla beraber, bazı kas hastalıklarının tedavisinde A tipi botulin kullanılmaktadır. Özellikle aşırı kas kasılması nedeni ile göz kapaklarının açılmaması, çeşitli kramplar ve kas kasılmaları, tik, diş sıkma gibi hastalıkların tedavisinde kullanılması üzerinde çalışılmakta ve oldukça tatmin edici sonuçlar alınmaktadır.

Yüz kaslarında zayıflama sağlayarak kırışıklıkların önlenmesi (botox) ise FDA tarafından yasaklanmıştır.

08.02. Ekolojisi

Toprak kökenli ve sporlu bir bakteri olması nedeni ile toprağa yakın olarak yetiştirilen sebzelerde ve tozda (havada) doğal olarak spor formunda bulunur. Tatlı ve tuzlu sularda da (okyanuslar ve göller) görülür. Spor formunda iken, rüzgârla her yere taşınabilir.

08.03. Gelişmesi ve Canlı Kalması

Cl. perfringens gibi aerotolerant anaerop değil, obligat anaeroptur. Buna bağlı olarak, gelişmesi için anaerop koşulların sağlanmış olması gerekir. Bu gereksinmeye gıda mikrobiyolojisi açısından bakıldığında, kapalı ortamda oksijen bulunmaması gerekir.

Sebze konserveleri üretiminde, tepe boşluğunda hava çıkarma işlemi sırasında mevcut hava, su buharı ile yer değiştirilir ve *Cl. botulinum* gelişmesi için yeterince oksijensiz bir ortam sağlanmış olur. Ayrıca, kapalı bir ortamda önce aerop bakterilerin gelişerek oksijeni bitirmeleri de *Cl. botulinum* gelişmesi için ortam sağlayabilir.

Üretilen nörotoksinler serolojik olarak A'tan G'ye kadar olmak üzere (C grubu C₁ ve C₂ şeklinde 2 alt grup olmak üzere) 8 gruba ayrılır. Bunlardan A, B, E ve çok nadir olmak üzere F tipleri insanlarda, C ve D tipleri memeli hayvanlarda ve kanatlılarda botulizm olarak adlandırılan hastalığa neden olur. C₁ nörotoksin olmakla beraber C₂ nörotoksin değildir. G tipinin insan veya hayvanlarda hastalık yaptığı bugüne kadar belirlenmemiştir. 1899-1990 yılları arasında kapsayan 90 yıllık dönemde ABD'de belirlenen 2320 vakanın 1036'sı (%44,7) ölüm ile sonuçlanmıştır. Bunların 384'ü A, 106'sı B, 105'i E ve 3'ü F tipidir. 2 vakada ise A ve B tipleri beraberce görülmüştür.

E tipine daha ziyade okyanus ve göllerde rastlanır. Buna bağlı olarak E tipi toksin, balık ve diğer su ürünlerinde görülür.

Cl. botulinum, birbirlerinden fizyolojik olarak ayrılabilen, DNA homolojisi ve 16S ile 23S gen sekans analizleri ile kendi içlerinde yüksek düzeyde ilişkide, ancak diğer gruplar ile uzak ilişki içinde olan ve I, II, III, IV olarak adlandırılan 4 gruba ayrılır. Bu ayrıma göre bütün A tipi ile B ve F gruplarının proteolitik olan suşları I, bütün E tipi ile B ve F gruplarının proteolitik olmayan suşları II, C ve D suşları III, G tipi ile yeni bir bakteri olan *C. argentinense* IV nolu grupta toplanır. Bu grupların karakteristik özellikleri aşağıda verilmiştir.

Özellik	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Nörotoksin tipi	A, B, F	B, E, F	C, D	G
Gelişme Sıcaklığı				
Minimum (°C)	10	3,3	15	?
Optimum (°C)	35-40	18-25	40	37
Minimum pH	4,6	5,0	?	?
NaCl inhibisyonu (%)	10	5	?	?
Minimum A _s	0,94	0,97	?	?
D ₁₀₀ (spor)	25	<0,1	0,1-0,9	0,8-1,2
D ₁₂₁ (spor)	0,1-0,2	<0,001	?	?

?: Bilinmiyor

Buna göre grup III ve IV insanlarda botulizme neden olmayan gruplardır. Her ne kadar grup II, proteolitik enzimlerden yoksun olan suşları içermekte ise de, kültürlerin tripsin ile muamelesi ile toksisite artar. Bu durumda insanlarda hastalık yapması açısından sadece I ve II. gruplar önemlidir.

Çizelgeden de görüldüğü gibi grup I'e giren suşlar, grup II suşlarından daha yüksek NaCl direnci, daha düşük pH ve daha düşük su aktivitesi değerlerinde gelişebilmekte, sporlarının ısıtma işlemi çok daha yüksek direnci ile ayrılmaktadır. Grup II suşları ise sadece daha düşük minimum gelişme sıcaklığı ile optimum gelişme sıcaklığında hem daha düşük hem de daha geniş bir sınırdaki gelişebilme özellikleri ile grup I'e üstünlük sağlamaktadır.

Mezofilik bir mikroorganizmadır ancak tiplere göre sıcaklık istekleri değişir. Tip A ve B için gelişme sıcaklıkları optimum 37 °C, minimum 10-12,5 °C ve maksimum 47,5-50 °C'dir.

E tipi optimum olarak 30 °C de gelişir. F tipi psikrotrof olup, çok düşük derecelerde bile uzun sürede toksin oluşturabilir. *C. botulinum*, optimum olarak pH 6.0-7.5 arasında gelişir. pH 4,5 altında gelişemez. Sporlarının çimlenmesi için minimum sıcaklık ve pH istekleri bakterinin gelişebilmesi için gerekli minimum değerlerden biraz daha yüksektir. Sporların çimlenebilmesi için en düşük sıcaklık 15 °C ve en düşük pH 5,0-5,1 olarak belirlenmiştir. Genel olarak pH'nın spor çimlenmesi ve gelişme için optimum oluşu toksin oluşumunu destekler. Toksin oluşumunda minimum su aktivitesi değeri; A ve B için $A_s= 0,94$, E tipi için $A_s= 0,97$ 'dir. Sıcaklığa dirençleri; A ve B tipleri için $D_{121} 0,2$ dakika F tipi için $D_{121} 0,17$ dakika olarak belirlenmiştir. % 10 oranında tuz ve % 60 oranında sakkaroz ortamlarında toksin oluşturmaz. Tuzun daha düşük konsantrasyonları (% 3,0-3,5), eğer beraberinde koruyucu teknolojik bir işlem (tütsüleme, ısıl işlem uygulaması) varsa toksin oluşumunu engeller. Gıdalara katılan nitratlar da gelişmeyi ve toksin oluşumunu engeller.

Proteolitik suşların gelişme ve toksin üretimi için optimum sıcaklık 35 °C, proteolitik olmayanlar için 26-28 °C'dır. Proteolitik olmayan B, E ve F tipleri düşük sıcaklıklarda (3-4 °C) toksin üretebilir. Bunlar, tripsin ile aktive edilmezlerse, hastalığın oluşması için yeterli toksisiteye sahip değillerdir. Proteolitik olanlar ise zaten aktif toksin üretirler.

08.04. Özellikleri

İlk kez 1800'lü yılların sonunda belirlendikten sonra *Cl. botulinum*, gıda mikrobiyolojisinin en önemli bakterilerinden birisi olmuştur. Neden olduğu botulizm, diğer patojenlerin neden olduğu hastalıklara oranla oldukça nadir görülmekle beraber, ölüm oranı diğer patojenler ile kıyaslanmayacak kadar yüksektir. Bugün düşük asitli olarak tanımlanan gıdaların ısıl işlem ile korunmasında temel olarak *Cl. botulinum* sporlarının imhası esas alınmakta ve buna uygun olacak şekilde ısıl işlem uygulanmaktadır.

A tipi toksin yapanlar ile B ve F tipi toksin yapanların bir kısmı proteolitik özelliktedir. Proteolitik aktivite göstermeyen grupta; E tipinin tüm suşları ile B ve F tipi toksin yapanların proteolitik olmayanları yer almaktadır. C ve D tipi *C. botulinum* suşları da proteolitik değildir, her iki tip de ortak metabolik sisteme sahip olduğundan ayrı bir grupta toplanmıştır. Proteolitik suşlardaki endojen proteazlar veya refakatçi flora olarak bulunan proteolitik suşların proteazları *C. botulinum* toksininin aktivitesini artırmada rol oynar.

Enterotoksinleri, suda çözünebilen, asitlere dirençli yüksek moleküllü proteinlerdir. A tipi toksinin toksisitesinin B tipi toksinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Nörotoksik protein 150 MDa büyüklükte tek bir polipeptit zincirden oluşur. Bu polipeptit yapı; proteolitik olan A, B, F tiplerinde endojen proteazlar aracılığıyla, proteolitik olmayan B, E, F tiplerinde ise ekzojen proteazlar yardımıyla iki zincire parçalanır ve buna bağlı olarak toksisite artar. Toksin, organizmanın logaritmik gelişme evresinde sentezlenip hücre içinde birikir ve logaritmik gelişme döneminin sonunda ortama salınır.

C. botulinum toksinleri ısıya duyarlıdır. Kaynama derecesinde birkaç saniyede tahrip olurlar. 80 °C'de 6 dakikada, 72 °C'de 12 dakikada tamamen inaktif hale geçerler. Bu durum özellikle tekrar ısıtılarak yenilen gıdalarda toksin riskini azaltmaktadır.

08.05. Patojenitesi

C. botulinum tarafından oluşturulan hastalık, fark edilemeyecek kadar yumuşak geçebileceği gibi, 24 saat içinde ölüme neden olabilir. Genel olarak nörotoksin içeren gıdanın tüketiminden 12-36 saat sonra semptomlar görülmekle beraber, semptomların birkaç saat içinde görülmesi ya da 14 saat içinde görülmemesi de mümkündür. Genellikle ilk semptom mide bulantısı ve kusma olup, bunu takiben görme bozuklukları (çift görme, net görememe, genişlemiş göz

bebeği), ağız ve gırtlak fonksiyonlarında kayıp (konuşma ve yutkunmada zorluk, ağız, boğaz ve dilde kuruma), genel bitkinlik ve kas koordinasyon kaybı ile solunumda zayıflama görülür.

Karın ağrısı, ishal ya da kabızlık şeklinde diğer gastrointestinal semptomlar da görülebilir. Mide bulantısı ve kusma A tipine oranla B ve E tipi toksinlerde daha fazla yaygın iken, yutkunma güçlüğü ve kas zayıflamaları tip E'ye göre A ve B tiplerinde daha yaygındır. Ağız, dil ve gırtlakta kuruma ise B tipi vakalarda daha yaygındır. Solunum yetersizliği ve solunum yolları tıkanması botulizmden kaynaklanan ölümlerin başlıca nedenidir. Bu nedenle ölüm oranı 20. Yüzyılın ilk yarısında yaklaşık %50 (bazı kaynaklara göre 1910-1919 yılları arası %70) iken, antiserum ve solunum destek sistemlerindeki gelişmelere bağlı olarak bu oran yaklaşık %10'a (bazı kaynaklara göre 1980'li yıllarda %9'a ve 1993'de %2'ye) kadar düşmüştür. Botulizm, karbon monoksit zehirlenmesi ve özellikle *Campylobacter jejuni*'nin de etmeni olduğu Guillain-Barré sendromu ile karıştırılabilmektedir.

0,1-1 µg toksinin öldürücü olduğu bilinmektedir. Buna göre LD₅₀ değeri 0,001 µg/kg (1 ng/kg) olarak verilmektedir.

Gıda ile alınan toksin ince bağırsağa ulaştıktan sonra burada absorbe olur ve lenf sistemi yolu ile kana karışır. Ardından sinir sistemine ulaşan toksin burada belirli noktalara bağlanarak sinirlerin komuta ettiği kaslara komutların gönderilmesini engelleyerek kasların paraliz (felç) olmasına neden olur. Nörotoksik etkili proteinin, sinir düğüm ve kavşaklarında uyarı mesajlarının iletilmesini bloke ettiği, bunun sonucu olarak da sinir uçlarında asetilkolinin serbest hale geçmesinin engellendiği bilinmektedir.

Botulizmin klinik tanısı en etkin hastanın kan, dışkı ya da kusmuğunda botulinal toksin belirlenmesi ile yapılır.

08.06. İntoksikasyona Aracı Olan Gıdalar

Botulizme neden olan gıdaların başında, yeterli ısı işlem görmeden yapılan ve tüketim öncesi pişirilmeden yenilen sebze konserveleri başta gelir. Salata olarak kullanılan ev yapımı bezelye konservesi tipik bir örnektir. Yine evlerde; tuz-sirke karışımına yatırılarak ve baharatla çeşnilendirilerek hazırlanan sebzeler, çiğ jambon, tütsülenmiş veya fermantasyon yolu ile lezzetlendirilmiş balıklar, buharla az pişirilen balıklar, salamura et ürünleri, ciğer ezmesi, çeşitli salata sosları, vb yiyecekler botulizme aracı olan gıdalardır. Özellikle uzak doğu ve İskandinav ülkelerinde aracı gıdalar olarak balık önemli görülmektedir. Botulizmde ABD'de ev tipi konserveler, Avrupa'ta ise et ürünleri öne çıkmaktadır.

Bir gıdada, canlı *Cl. botulinum* bulunması, o gıdanın botulin içerdiği anlamına gelmez. Bakteri gelişemez ise toksin üretimi de olmaz. Çoğu gıda, *Cl. botulinum* için yeterli besin içerse de, bunların tümü gelişme için gerekli olan anaerobik koşulları sağlamaz. Hem besin içeriği hem de anaerobik koşullar pek çok konserve gıdada ve et ürününde sağlanır. Gıdada, asitlik yüksek ve/veya nem düşük ve/veya tuz yüksek ise *Cl. botulinum* gelişmesi olmaz. 3 °C altında tutulmadıkça, soğutma proteolitik olmayan suşlar için toksin oluşumunu engellemez. Sadece bozulmayı önlemek için işlenmiş ancak soğutulmamış gıdalara, botulizm vakalarında sıklıkla rastlanır.

08.07. Bebek Botulizmi

Arılar, çiçeklere rüzgâr ve tozlarla doğal olarak bulaşan *Cl. botulinum* sporlarını kovana taşırlar. Bu sporlar da doğal olarak bala geçerler. Bu, tümüyle doğal bir kontaminasyon olup, tarımsal üretim/ gıda teknolojisi hijyen eksikliği değildir.

Cl. botulinum'un spor varlığının ballarda gösterilmesi tüm gıdalar içerisinde üstünde en fazla durulan konudur. Süt emmekte olan bebeklerde spontan olarak ortaya çıkan bebek botulizmlerine *Cl. botulinum* sporları neden olur.

Sporların germinasyonu ile bağırsakta gelişen *Cl. botulinum* vejetatif hücreleri, toksin oluşturarak bebek botulizmlerini yaratır. 6 hafta-1 yaş grubunda, ancak ağırlıklı olarak 2-3 aylık bebeklerde görülen bu botulizm türü, ilk kez 1976 yılında belirlenmiştir.

Asıl olarak A ve B tipi ve nadiren diğer tiplerin yol açtığı bebek botulizmi, Afrika dışında diğer kıtalarda görülmüştür.

Kabızlık, bebek botulizminde nöromusküler paraliz (sinirlerin, kasları etkilediği felç), çok sıklıkla birkaç gün ya da hafta önce görülür. Bebek botulizmi çok geniş bir aralıkta seyredir. Bazı bebekler sadece hafif bir güçsüzlük, uyuşukluk, azalan süt emme davranışı gösterirken, çoğu daha ciddi olarak süt emmede ve yutkunmada zorluk, sürekli ağlama, genel kas zayıflamasına bağlı olarak başını kaldıramama gibi semptomlar gösterirler. Hastanelik olan bazı vakalarda solunum durması görülmekle birlikte, etkin bir solunum desteği ile çoğunun kurtarıldığı bildirilmiştir. Bebek botulizminde ölüm/ vaka oranı %2 ile oldukça düşüktür.

Dünyadaki bebek botulizmlerinin %90 kadarına ABD'de rastlanmaktadır. ABD'deki bebek botulizmi sıklığı 100bin bebekte 2 olarak verilmektedir.

Bal, bebek botulizminin bilinen kaynaklarından birisidir. ABD'de yapılan araştırmalar balların %13 kadarında *Cl. botulinum* sporu olduğunu göstermiştir. Buna bağlı olarak FDA, CDC ve Amerikan Pediatri akademisi, 1 yaş altındaki bebeklere bal verilmemesini önermektedir.

1 yaş üzeri insanlarda bağırsaklar yeteri kadar geliştiği için bebek botulizmi olarak bilinen hastalık çok nadir olarak görülür.

Yapılan araştırmalar ballarda 1-10 spor/kg düzeyinde *Cl. botulinum* sporu olduğunu göstermekte, ancak bebeklerde botulizme neden olan ballarda bu sayının 10^4 /kg olduğunu belirtmektedir.

Mısır şurubu ve pirinç içeren bebek mamalarında da *Cl. botulinum*'a rastlanmakla beraber, bunlardaki *Cl. botulinum* sayısı baldaki sayıya göre çok daha düşük olduğu için bu tip gıdalara balda olduğu gibi potansiyel tehlike olarak bakılmamaktadır.

Cl. botulinum sporlarının havadaki toz ile solunup, tükürükle karışarak mideye ve bağırsaklara ulaştığında burada çimlenip geliştikten sonra özellikle bebeklerde zehirlenmelere yol açabildiği de belirtilmektedir.

08.08. Toksin Testleri

A, B, E ve F tipi botulin oluşturan bakteriler ve toksinlerinin belirlenmesi için hızlı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Kültür ortamında üretilen toksinler DIG-ELISA ve amp-ELISA gibi ELISA teknikleri kullanılarak belirlenebilmektedir. Analiz, toksin antijenini belirlediği için biyolojik aktif olan ya da olmayan toksinler bu yöntemlerle belirlenebilmektedir.

ELISA testlerinin analizi bir gün gerektirir. Canlı organizmaların toksin geni, vejetatif hücre ya da sporun 1 gecelik inkübasyonundan sonra PCR tekniği kullanılarak 1 gün içinde analiz edilebilmektedir.

Cl. botulinum analizi standart bir mikrobiyolojik kalite kontrol laboratuvarında yapılmamalıdır. Gelişmiş ülkelerde bu bakterinin analizinin yapılabilmesi için özel güvenlik önlemlerinin

alındığının belgelendirilmesi gereklidir. Bu kısıtlamanın nedeni gıdaların *C. botulinum* açısından analizinde pozitif sonuç koşulunda laboratuvarda, botulin içeren bir gıdanın içerdiği toksine oranla binlerce kat daha fazla miktarda toksin olmasıdır.

Bu analizin yapıldığı laboratuvarlarda en azından belirli antitoksinlerin sürekli ve taze olarak bulundurulması, nasıl kullanıldığı tatbikat yapılarak personele öğretilmiş ve acil olarak kullanılması gereken portatif solunum destek cihazlarının el altında ve işler halde tutulması, analiz sonrası kullanılan besiyerlerinin ve çalışma ortamının sterilizasyonu/ dezenfeksiyonu, laboratuvar kapısına botulin ile çalışıldığını uyarı levhaları asılması, tercihen bağımsız bir laboratuvarın ya da laboratuvarında özel bir bölmede bu analizlerin yapılması, hafta sonları ve/veya çalışma saatleri dışında yalnız çalışılmaması gibi ayrıntılar sadece iyi ve doğru laboratuvar uygulama (GLP; good laboratory practice) kurallarının sağlanması değil, bunun ötesinde özel olarak yasal denetlemeleri de gerektirmektedir.

Bir gıdada canlı *C. botulinum*'a rastlanılmış olması o gıdanın botulizm açısından mutlak tehlikeli olacağını göstermez. Zehirlenme için bakterinin gelişmesi ve toksin oluşturması gerekir. Bu nedenle gıdanın botulizm açısından gerçek kontrolü canlı hücre aranması/ sayılması yerine toksin varlığının belirlenmesi şeklinde olmaktadır. Bu analiz izolata uygulanabileceği gibi, gıda maddesinde önceden oluşmuş toksin olduğu tahmin ediliyor ise izolasyon aşaması atlanarak doğrudan gıda maddesine de uygulanabilmektedir.

08.09. Fare Testleri

Basit olarak izolat ya da doğrudan şüpheli gıdanın farelere intraperitoneal (karın altı) olarak enjekte edilmesi ve farelerde botulizm semptomlarının izlenmesidir. İzolat ile yapılan denemede tripsin uygulanmış ve uygulanmamış kültürler kullanılır. Gıdada analizi yapılacaksa homojenizasyondan sonra gıda santrifüjlenir, süpernatant gerekirse filtreden geçirilerek kaba parçacıklardan arındırılır. Kültürde olduğu gibi tripsin uygulanmış ve uygulanmamış gıda kullanılır.

-Tripsin uygulanmış ve uygulanmamış örnekler jel fosfat tampon ile 1:5; 1:10 ve 1:100 oranında seyreltilir. Seyreltme yapılmamış örnek de dahil olmak üzere 4 örnek 0,5'er ml intraperitoneal olarak farelere ayrı ayrı steril şırınga ile verilir. Her grupta 20-25 g ağırlığında 2 fare kullanılır.

-Tripsin uygulanmamış örnekten 1,5 ml alınıp, 100 °C'ta 10 dakika ısıtılır ve buradan yine 0,5 ml alınarak aynı şekilde fareye aşılanır. Bir anlamda kontrol olan bu fare deneme sonunda canlı kalmalıdır.

-48 saat süresince farelerde botulizm belirtileri izlenerek belirtiler ve ölümler kaydedilir. Botulizmin tipik belirtileri ilk 24 saatte fare derisinin buruşmasıyla başlar. Solunum güçlüğü, kol ve bacaklarda güçsüzlük, felç ve son olarak solunum yetersizliği ve ölüm gerçekleşir. Botulizmin, klinik belirtileri olmadan ölen fareler enjekte edilen örneğin botulin toksini içerdiğini göstermeye yeterli değildir. Nadiren ölüm enjekte edilen sıvıdaki diğer kimyasallardan meydana gelebilir.

-Analiz edilen kültürde/ gıdada botulin toksinin varlığı belirlenirse bu kez, A, B, E, F monovalent antitoksinleri kullanılarak, hangi tip toksin olduğu saptanır. Bu amaçla antitoksinler farelere toksinli örnek enjeksiyonundan 30-60 dakika önce aynı şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilir.

Yararlanılan ve Okunması Önerilen Kaynaklar

Dodds KL, Austin JW. 1997. *Clostridium botulinum*. Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers. Eds. MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville. American Society for Microbiology, Washington, USA, 768 pp.

Doğan HB, Çakır İ, Halkman AK. 2000. *Clostridium botulinum*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

Erol İ. 2007. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti, Ankara, 392 s

Hannah MH. 2005. Botulism Health Article. <http://health.yahoo.net/galecontent/botulism-3>

Oguma K, Fujinaga Y, Inoue K, Yokota K. 2000. Mechanism of Pathogenesis and Toxin Synthesis in *Clostridium botulinum*. In, Microbial Foodborne Diseases; Mechanism of Pathogenesis and Toxin Synthesis. Eds. JW Cary, J: Linz, D. Bhatnagar. Technomic Publishing Co Inc, Pennsylvania, USA, 550 pp.

Onderdonk AB, Allen SD. 1995. *Clostridium*. In, "Manual of Clinical Microbiology, 6th Ed. Ed in chief P.R. Murray. ASM Press, Washington D.C., 1482 pp.

Solomon HM, Lilly Jr T. 2001. *Clostridium botulinum*. in; Bacteriological Analytical Manual; BAM.

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>

Tunail N. 2000. Mikrobiyel Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.