

## 09. *Clostridium perfringens*

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN  
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi  
Gıda Mühendisliği Bölümü  
GDM310 Gıda Mikrobiyolojisi II Ders notu 09.

### 09.01. Tanımı

*Cl. perfringens* anaerobik, gram pozitif, spor oluşturan çubuk şeklinde bir bakteridir. Mikroskop altında genellikle tek ve ikili olarak görünürler nadiren kısa zincir oluştururlar. Sporları subterminal veya terminal pozisyonda bulunur. Bu bakteri hareketsiz olup, kapsül oluşturur ve jelatini parçalar. Birçok karbohidratı fermente etme yeteneğine sahiptir. Litmuslu sütte asit oluşur, pıhtı yüksek oranda gaz oluşması ile dağılır ve gazlı fermantasyon (stormy fermentation) izlenir. *Cl. perfringens* sülfiti indirgeyen tek *Clostridium* türüdür. Nitratı indirger.

*Cl. perfringens*'in oluşturduğu hastalığa perfringens gıda zehirlenmesi, zehirlenme, gıda kaynaklı hastalık, enfeksiyon ve enfeksiyon tipi gıda zehirlenmesi adları verilmiştir. Bütün bu farklı tariflerin nedeni toksin salgılanmasının *S. aureus* ve *Cl. botulinum*'tan değişik olmasından ötürüdür. Hastalığa ait gerçek rakamların bulunmamasının nedeni, arazların hafif olması ve hastalığın doktor müdahalesine gerek kalmadan kısa sürede geçmesidir. Zehirlenmelere genellikle çok sayıda kişiye hizmet veren kuruluşlarda rastlanır. Genellikle pişirilerek tüketilen gıdalarda yetersiz pişirme, yetersiz soğutma ve tekrar hafifçe ısıtma sonunda bakteri sayısı hızla artar ve hastalığa neden olur. Okullar, hastaneler, bakım evleri, hapishaneler gibi çok sayıda kişiye yemek veren ve servisten bir kaç saat önce pişirilen yemeklerde potansiyel tehlike fazladır. Genel olarak yaşlı ve düşkün kişiler *Cl. perfringens* zehirlenmelerine daha fazla duyarlıdırlar.

*Cl. perfringens*, klinik mikrobiyolojide *Clostridium welchii* adı ile bilinir. Gazlı kangrene neden olan önemli bir patojendir.

### 09.02. Ekolojisi

Doğada insanların, evcil hayvanların ve yabani hayvanların bağırsaklarında bulunur. Sporları toprakta ve sedimentlerde canlılığını sürdürür. Bu bakteriye rastlanması, fekal kontaminasyonun göstergesidir. *Bacillus* türlerinde olduğu gibi hafif bir ısıtma ile sporların çimlenmesi teşvik edilir.

*Cl. perfringens* doğada çok yaygındır. Toprak, toz, hava, su, lağım, insan ve hayvan dışkı ve birçok gıda maddesinin üzerinde bulunur. Hijyenik koşullara dikkat etmeyen ve genellikle yemeklerini büyük topluluklar halinde yiyen kişilerin bağırsaklarında *Cl. perfringens* daha çok bulunur.

### 09.03. Gelişmesi ve Canlı Kalması

*Cl. perfringens* gelişebilmek için 13-14 aminoasit ve 5-6 vitamene gereksinme gösterir. Bu istekleri zehirlenmelerin genellikle proteinli gıdalarda görülmesini bir ölçüde açıklar.

*Cl. perfringens* anaerobik olmakla beraber, aerotoleranttır. Bu nedenle gelişmesi için mutlak anaerobik koşullar gerekmez. Et ürünlerinin redoks potansiyeli bu organizmanın gelişmesi için uygundur. 5,5 ile 8,0 pH arasında gelişme gayet iyidir. pH 5,0 altında veya pH 9,0 ile 8,0

pH arasında gelişme olmaz. Enterotoksin oluşumu için en uygun pH 6,5-7,3 olarak bildirilmiştir.

20 °C ile 50 °C arasında rahatlıkla gelişir. Optimum gelişme sıcaklığı 37 °C ile 47 °C arasındadır. Sporlanma ve toksin oluşumu için en uygun sıcaklık 37 °C'dır. 0,995'in altındaki su aktivitelerinde gelişme hızı azalır. Gelişme için minimum  $A_s$  çözünen maddeye, sıcaklık derecesine, pH'ya ve diğer faktörlere bağlıdır. Yemek (tipik olarak et) pişirildiği zaman oksijen uzaklaşır ve ortam anaerop hale geçer. Pişirme işlemi sporlanmayı da teşvik eder. Soğutma sırasında sporlar germine olur ve hızla çoğalır. *Cl. perfringens* 15-50 °C arasında ve optimum olarak 43-47 °C arasında çoğalır. Generasyon süresi 12 dakikaya kadar düşer. Bu nedenle  $10^6$  sayıda bakteri vücuda girdiğinde bunlar ince bağırsağa ulaşınca kadar sayılarını zehirlenmeye neden olacak düzeye çıkartırlar.

Sıcaklık derecesindeki ani düşmelerde hücreler üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. Gelişme dönemindeki hücrelerde çevre sıcaklığı 37 °C'tan 4 °C'a düştüğünde %96'lık bir ölüm oranı saptanmıştır. 4 °C'ta 90 dakika tutma sırasında %38'lik bir azalma daha olarak toplam ölüm oranı % 99,9'a ulaşmıştır.

Eteri olgunlaştırmada kullanılan sodyum nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının çok üstündeki konsantrasyonlarda dahi gelişebilirler.

#### 09.04. Özellikleri

Tespit edilen dört ana tip ekzotoksin mevcuttur. Bunlara alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), epsilon ( $\gamma$ ) ve iota ( $\sigma$ ) adları verilmiştir. Bunların oluşturulma durumuna bağlı olarak *Cl. perfringens* suşları 5'e ayrılmış ve A, B, C, D, E adları verilmiştir.

<u><i>Cl. perfringens</i> Tipleri</u>	<u>Oluşturulan Ana Toksinler</u>
A	Alfa
B	Alfa, Beta, Epsilon
C	Alfa, Beta
D	Alfa, Epsilon
E	Alfa, İota

Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan temel tip A'dır. Bazı hallerde C tipinin de zehirlenmelere neden olduğu belirtilmektedir. Bütün A tipleri toksin oluşturmadığı gibi gıda zehirlenmesine neden olan gıdalardan izole edilenler de bu özelliklerini laboratuvarında besiyerine transfer edilince yitirmektedir.

#### 09.05. Patojenitesi

Oluşturduğu hastalık perfringens gıda zehirlenmesi olarak tanımlanır ve yaygın şekliyle karın krampları ve ishal ile görülür. Zayıf bünyeli kişilerde sıklıkla halsizlik de olur. Bulantı ve kusma nadirdir, yüksek ateş yoktur. Gıda zehirlenmesine neden olan toksini üretebilen çok sayıda *Cl. perfringens* içeren gıdanın tüketiminden 8-15 (bazı kaynaklara göre 8-22) saat sonra hastalık başlar ve genellikle 24 saat içinde kendiliğinden biter. Rehidrasyon yaşlılarda ve zayıf bünyelilerde gerekebilir. Bazı hastalarda hastalık daha sert geçer ve 1-2 hafta kadar sürer. Dehidrasyon ve diğer komplikasyonlara bağlı olarak bir kaç ölüm olayı bildirilmiştir. Hastalığın ortaya çıkması için  $10^8$  sayıda canlı hücrenin bağırsağa ulaşması ve toksin oluşturması gerekir.  $10^6$  sayıda bakterinin gıda ile alınması halinde sindirim sistemine ulaşınca kadar bu sayı  $10^8$ 'e ulaşmaktadır. En önemli iki belirti isal ve karın kramplarıdır. Bazı hallerde baş dönmesi ve baş ağrısı görülebilir. Ateş, kusma, sersemlik ve kanlı dışkı

görülebilir. Gençlerde hastalık hafif geçer, yaşlı ve hasta kişilerde daha şiddetli cereyan edebilir. Başka hastalıklarla komplikasyon halinde nadiren ölüm vukua gelir.

Hastalığın etiyolojik ajanı *Clostridium perfringens* enterotoksini olarak adlandırılmıştır. *S. aureus* ve *Cl. botulinum* toksinlerinin aksine *Cl. perfringens* enterotoksinine normal olarak gıdalarda rastlanmaz. Bunun yerine toksin bağırsak sisteminde *Cl. perfringens* gelişmesi ve sporlanma ile oluşur. Laboratuvar koşullarında sporlanmayı teşvik eden ortamlarda bakterinin toksin oluşturulması mümkün olmuştur. Enterotoksin proteininin spor kılıfında yapısal bir kısım olduğu ve bazı türlerce aşırı olarak oluşturulduğu ileri sürülmektedir.

Sporlanma ile toksin oluşumu arasında direk bir korelasyon mevcuttur. Sporlanmanın engellendiği besiyerinde enterotoksin oluşmamakta, sporlandırma besiyeri kullanıldığında toksin sentezlenmektedir. Enterotoksin ancak spor yapan hücrelerin lize olması ile ortama yayılmaktadır. Spor kılıfının (coat) oluşumu sporlanmanın ilk basamaklarındandır, nitekim enterotoksin de spor oluşumunun başlangıcından 4 saat sonra saptanmakta ve 10-11. saatlere kadar birikmeye devam etmektedir. Lizis olayı ile enterotoksin ve olgun sporlar ortama yayılmaktadır. Bununla beraber yapılan son çalışmalar spor oluşturmeyen kültürlerde de toksin saptanmasına bağlı olarak toksin oluşumu ile sporlanma arasındaki ilişkiyi doğrulamamakta, toksin oluşumu ve sporlanmanın benzer çevre koşullarında tesadüfen beraberce olduğu tahmin edilmektedir.

Saflaştırılan toksin protein olup nükleik asit, yağ asidi, fosfotit ve indirgen şekerleri içermez. Hidroliz ile 18 aminoasit elde edilmiştir. En önemlileri aspartik asit, serin, leucin ve glutamik asittir. Molekül ağırlığı 33.000-40.000 dalton arasındadır. İzoelektrik noktası pH 4,3'tedir. Bu enterotoksin ısıya dayanıksız olup 60 °C'de 4 dakikada aktivitesinin %90'ını kaybetmektedir. Protein yapısında olmasından ötürü antijeniktir, ancak şimdiye değin oluşturan organizmanın suşuna bağlı olmayarak sadece bir antijenik enterotoksin tipi saptanmıştır.

Hastalık bir takım olayların bir birini takip etmesiyle oluşur. Gıda organizma ile kontamine olur. Pişirme esnasında vejetatif hücreler ve ısıya hassas sporlar imha olur. Fakat dayanıklı sporlar canlı kalırlar. Pişirme esnasındaki ısıtma canlı kalabilen sporları çimlenme için aktive eder. Eğer gıda gelişme için uygun bir sıcaklıkta tutulursa (10-50 °C) vejetatif hücreler çoğalırlar. Pişmiş tavuk etinde sporların 37 °C'ta çimlenmesi için gerekli süre 10-12 dakika olarak saptanmıştır.

Hastalığa neden olacak *Cl. perfringens* adedi saptanmamış olmakla beraber gıdada  $10^6$ - $10^8$  hücre olması tehlike işaretidir. Organizmalar önce midenin düşük pH'sından geçip bağırsaklara ulaşmak zorundadır. Gelişmeye hazırlanma fazının başlangıcında organizmalar en dayanıksız durumdadır. Dayanıklılık gelişme fazının sonunda maksimuma ulaşır. Tüketilen gıdada proteinlerin bulunması organizmayı mide asitlerine karşı korur. Mide asidinin tüketilen proteinlerle birleşmesi pH'ta genel bir yükselmeye neden olur. Proteinlerin mide asidi üzerindeki bu etkisi bakterilerin korunmasını sağladığından proteinli gıdaların bu hastalığa daha fazla neden olması bundan ileri gelebilir.

Canlı kalan hücreler ince bağırsağa ulaştınca gelişme ve sporlanma için uygun bir ortam bulurlar. Spor yapan hücreler enterotoksin oluşturur ve hücre lizisi sonunda toksin ortama yayılır. Organizma bazı gıdalarda da spor oluşturabilir, fakat gıda toksik bir hale gelene kadar, tüketilemeyecek bir durum alır. Hastalığın ortaya çıkması için gerekli inkübasyon süresi 9-15 saat arasındadır. Organizmanın sporlanma için 7-12 saat gereklidir. Enterotoksinin gıdada daha önce oluşması, çok yüksek sayıda hücrenin gıda ile birlikte alınması, gıdayı tüketen kişinin hassasiyeti inkübasyon süresinin kısalmasına neden olur.

Bulaşık gıdayı tüketen herkes hastalanmayabilir. Mide asitliği yüksek olan bazı kişiler hastalanmadan kurtulabilirler. Daha önce zehirlenmiş olmanın hiçbir koruyucu etkisi yoktur. Hastalık kısa sürer (12-24 saat). İyileşme tam ve herhangi bir belirti bırakmadan olur. Hasta

halsiz kalırsa da kısa zamanda düzelir. Belirtilerin hafif ve kısa süreli olmasından ötürü bir tedavi uygulanmaz.

Toksin kapiler geçirgenliği arttırarak bağırsaklarda aşırı sıvı hareketine neden olur ve isal görülür. Peristaltik bağırsak hareketleri artar. Bağırsak mukozasında *Cl. perfringens*'in yayılıp enfeksiyon yaptığı görülmemiştir, bu nedenle etkinin sadece toksinden ileri geldiği kabul edilmiştir. Toksin, villi tip'lerde epitel hücrelere zarar verir. Bu zarar glikoz absorpsiyonunu inhibe eder ve buna bağlı olarak Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> ve suyun dışarı akımına neden olur. Bu durum ise lümeninde aşırı sıvı hareketi ve diyareye yol açar.

Daha ciddi fakat daha nadir olan bir hastalık ise *Cl. perfringens*'in C tipleri tarafından oluşturulan necrotican (çürütücü) hastalığıdır. Son zamanlarda A tipinin de bu hastalığa yol açtığı saptanmıştır. "Pig-bel" ve "necrotic perfringens" olarak da bilinen bu hastalık sıklıkla öldürücüdür. Çok sayıda bakterinin vücuda alınması ile başlar ve bağırsak duvarına yapışarak β toksin oluşturur, bağırsakta enfeksiyon ve septisemiye yol açan ve tedavi edilmez ise bağırsak nekrozu (çürüme) kangrene kadar gider ve sonunda ölüm görülür. ABD'de çok nadir görülen bu hastalık ilk kez 1949 yılında Almanya'ta görülmüştür. Papua Yeni Gine'de çok yaygın iken aşılama ile kayda değer ölçüde azaltılmıştır.

#### 09.06. Enfeksiyon Aracı Olan Gıdalar

Bu zehirlenmeye genellikle proteinli gıdalar yol açar. Izgara, kaynatılmış veya hafif kızartılmış et veya tavuk etleri, et suyu, soslar, çorbalar, etli börekler ve salatalar en önemli gıdalardır. Zehirlenmeye neden olan gıdalar öncelikle, bir iki gün önce pişirilip buzdolabında tutulmuş ve yeniden ısıtılarak tüketilenlerdir. Etler büyük parça halinde pişirildiğinde, ısının transferi ve piştikten sonraki soğuma yavaş olduğundan, ısıtma ile ortamdaki oksijenin uzaklaşması ile oluşan anaerobik koşullar ortamı *Clostridium* gelişmesine ideal bir hale getirir.

*Cl. perfringens* kaynaklı hastalık, et veya tavuk gibi gıdalarda pişirildikten sonra yeteri kadar soğutulmayan ya da servis öncesi yeteri kadar ısıtılmayan gıdalarda görülür. *Cl. perfringens*, çiğ et, tavuk, kurutulmuş çorbalar ve soslar, çiğ sebze ve baharatta doğal olarak az sayıda bulunabilir. Bazı suşlarının sporları 100 °C gibi yüksek sıcaklıklara 1 saat kadar dayanıklı olduğu için gıdalarda *Cl. perfringens* varlığı bir anlamda kaçınılmazdır. Ayrıca, pişirme sırasında azalan oksijen miktarı anaerob karakterli olan *Clostridium* türlerinin gelişmesine olanak sağlar. Pişirme sırasında canlı kalan sporlar, pişirme sonrası yeterli soğutma sağlanmazsa çimlenip hızla çoğalırlar. Böylece, klinik ve epidemiyolojik veriler, *Cl. perfringens* kaynaklı gıda hastalıklarında 10<sup>5</sup> KOB/g ya da fazla sayıda bakterinin varlığını göstermiştir.

*Cl. perfringens*'in gastrointestinal hastalıklara yol açtığı 1890'lı yıllardan beri bilinmektedir. Dünya üzerinde en yaygın gıda zehirlenmesi etmenleri arasındadır. 1980'li yıllarda gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklar arasında ABD'de 3., İngiltere'de 2 sırada yer almıştır. ABD'de *Cl. perfringens* zehirlenmeleri en sıklıkla kayda geçen gıda zehirlenmeleri arasındadır. 1981 yılında ABD'de 28 salgında 1162 vaka bildirilmiştir. Yine ABD'de yılda ortalama 10-20 salgın ve her salgında onlarca hatta yüzlerce vaka bildirilir. 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. *Cl. perfringens*, en sık rastlanan patojenlerden birisidir.

Türkiye'de bu konuda yeterli kayıt olmadığından bu tip zehirlenmeler hakkında bilgi vermek olanak dışıdır. Ancak Türk sucuklarında sıklıkla görüldüğü yapılan bir araştırma sonucunda ortaya konmuştur.

### 09.07. Kontrolü

*Cl. perfringens*'ın doğada çok yaygın olması nedeni ile gıdalara bulaşmasının engellenmesi, zehirlenmelerin kontrolü için yeterli değildir. Buna rağmen sanitasyonun tam anlamıyla uygulanmasının ihmal edilmemesi gereklidir. Eğer bu konuda dikkatli davranılırsa kontaminasyon oranı asgariye indirilebilir. Kontaminasyon engellenirse, tehlike düzeyi olan  $10^6$ - $10^8$  KOB/g'a ulaşmak uzun sürecektir. Gıdada birkaç *Cl. perfringens* bulunması zehirlenmeye neden olmaz. Bu nedenle sporların germinasyonu ve vejetatif hücrelerin bölünmesi engellenirse tehlike kontrol altına alınabilir. En basit yöntem gıdayı pişirmek ve uzun süre bekletmeden tüketime sunmaktır. Bu mümkün değil ise gıdayı küçük parçalara ayırarak soğukta saklamak gelişmeyi engeller. Gelişme için minimum sıcaklık 15 °C'dır. Çok dolu olmayan her buzdolabında bu kolaylıkla sağlanır.

Sıcaklık 0 °C'a yaklaştıkça popülasyon azalmaya başlar, vejetatif hücreler bu derecelerde stabil değildir. Sporlar bile kısmen hasar görürler. *Cl. perfringens*'in vejetatif hücreleri pişirme ile yok edilir. Fakat ısıya dayanıklı sporlar canlı kalabilir. Sporların öldürücü düzeyin altında ısıya tabi tutulması germinasyonu teşvik eder. Sporların ısıya dayanıklılığı suştan suşa farklılık gösterir. Eğer ısıya dayanıklı sporlar varsa, bunların yok edilmesi için gıdanın ısıtılması uzun süreceğinden arzu edilmeyen organoleptik bozulmalar oluşur.

Piştirildikten sonra bekletilen gıdalar, buzdolabında dahi saklanmış olsalar, tüketilmeden önce mutlaka ısıtılmalıdır. Salçalı yemekler 10-11 dakika kaynatılmalı tavuk etleri mutlaka 80 °C'a kadar ısıtılmalıdır.

### 09.08. Analizi

Hastalığın teşhisinde *Cl. perfringens* toksininin serolojik analizler ile dışkıda saptanması gerekir. Buna paralel olarak şüpheli gıda ve dışkıda rutin bakteriyolojik kontroller de yapılır.

*Cl. perfringens*, dondurulmuş gıdada ya da özel önlemler alınmadan uzun süre buzdolabında tutulan gıdalarda canlılığını kaybeder. Bakterinin canlılığındaki bu kayıp, hastalığın *Cl. perfringens* ile ilişkilendirilmesini zorlaştırır hatta olanaksız kılabilir. Şüpheli gıda hemen analiz edilmelidir. Buzdolabında vejetatif hücrelerde %90, dondurma ile %99 oranında bir azalma görülür.

*Cl. perfringens* analizinde önemli bir sorun homojenizasyon amacıyla blender kullanılmasıdır. Organizma, aerotolerant olmasına rağmen blenderde yüksek devirde karıştırılma sırasında yüksek oranda oksijen ile temas olumsuz etki yapar. En uygun yöntem stomacher kullanılması, bu olanak yoksa analiz edilecek örneğin steril kum yardımıyla bir havan içinde seyreltme çözeltilisine alınmasıdır. Blender kullanılacaksa düşük hız ve bir dakika süre uygulanmalıdır.

### Yararlanılan ve okunması önerilen Kaynaklar

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

Karagözlü N. 2010. Gıda Kaynaklı Toksikofeksiyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi Ed. O. Erkmen. Eflatun Basım Dağıtım Yayıncılık Ltd., Ankara, 552 s.

Kuleaşan H. 2000. *Clostridium perfringens*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası, Ankara, 522 s.

McClane BA. 1997. *Clostridium perfringens*. Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers. Eds. MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville. American Society for Microbiology, Washington, USA, 768 pp.

McLane BA. 2000. The Action, Genetics and Synthesis of *Clostridium perfringens* Enterotoxins. 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.

Rhodehamel EJ, Harmon SM, Bennett RW. 2001. *Clostridium perfringens*. 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.