



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

KOKORECİN MİKROBİYOLOJİK KALİTESİNİN VE  
*CLOSTRIDIUM DIFFICILE* RİSKİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM KORKMAZER

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. NÜKHET NİLÜFER ZORBA

ÇANAKKALE – 2023





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**KOKORECİN MİKROBİYOLOJİK KALİTESİNİN VE *CLOSTRIDIUM*  
*DIFFICILE* RİSKİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM KORKMAZER

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. NÜKHET NİLÜFER ZORBA

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje  
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FBA-2022-4070

ÇANAKKALE – 2023



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Gizem KORKMAZER tarafından Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA danışmanlığında hazırlanan ve **18/08/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan **“Kokorecin Mikrobiyolojik Kalitesinin ve *Clostridium difficile* Riskinin Belirlenmesi”** başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

(Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi Nesrin ÇAKICI

Dr. Öğr. Üyesi Musa YALMAN

.....

.....

.....

Tez No : .....

Tez Savunma Tarihi : 18/08/2023

Prof. Dr. Ahmet Evren ERGİNAL

Enstitü Müdürü

.../.../2023

## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Gizem KORKMAZER

18/08/2023

## TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde, desteklerini çalışma sũresince benden esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Nũkhet Nilũfer ZORBA'ya, çalışmamın molekũler bũlũmũ için bilgisini ve yardımlarını eksik etmeyen Prof. Dr. Alper AKÇALI'ya, desteklerini ve bilgisini esirgemeyen Doç. Dr. Murat ZORBA'ya, destekleri için TũBİTAK'a ve Çanakkale Onsekiz Mart Őniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi'ne, çalışma sũresince tũm zorlukları benimle gũęũsleyen ve değerli bilgilerini benimle paylaşan çalışma arkadaşlarım Melike Nur TOSUN ve Gizem TAYLAN YALÇIN'a, çalışmalarım boyunca benden desteğini eksik etmeyen ev arkadaşım Beyzanur TUNA'ya, çalışmamın tez yazma aşamasında motivasyonumun yũksek kalmasını sağlayan canım arkadaşım Eylül İNCE'ye, çalışmam sũresinde desteklerini hep hissettiğim, her zaman yanıda olan, manevi ve maddi olarak desteklerini eksik etmeyen ve başarılarımın destekçileri olan annem Gũlin KORKMAZER, babam Gũkhan KORKMAZER, kardeşlerim Gũkтуę KORKMAZER ve Gũrkem KORKMAZER'e, seçmiş olduğum bu yolda çabalarım ve sabrım için kendime, ismini saymadığım çalışmalarım sũresince katkısı olan herkese sonsuz teőekkũrlerimi sunuyorum.

Gizem KORKMAZER  
anakkale, Ağustos 2023

## ÖZET

# KOKORECİN MİKROBİYOLOJİK KALİTESİNİN VE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* RİSKİNİN BELİRLENMESİ

Gizem KORKMAZER

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

18/08/2023, 99

Bu çalışmada kokoreç örnekleri Çanakkale, Bursa, İzmir ve Balıkesir illerinden temin edilmiştir. Çiğ ve pişmiş olarak satılan kokoreçlerden toplam 140 örnek alınmıştır. Kokoreç örneklerinin mikrobiyolojik kalitelerinin (Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB), küf/maya, toplam koliform ve *Escherichia coli*) belirlenmesi, *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Salmonella* patojenleri ile birlikte *Clostridium (Clostridioides) difficile* ve sülfid indirgeyen anaerobik bakterilerin varlığının da araştırılması amaçlanmıştır. Kokoreç örneklerinden elde edilen şüpheli *C. difficile* ve sülfid indirgeyen anaerobik bakteri izolatları RAPID ID 32A ile biyokimyasal olarak tanımlanmıştır. Elde edilen *C.difficile* izolatları qPCR ile doğrulanmıştır. Elde edilen izolatların antibiyotik direnç profili ve biyofilm oluşturma kapasitesi araştırılmıştır.

Çiğ örneklerde en yüksek TAMB yükü (6,18 log KOB/g) Çanakkale ilinden temin edilen örneklerde saptanmıştır. Ayrıca pişmiş örneklerde en yüksek TAMB yükü (5,15 log KOB/g) Bursa ilindeki örneklerde belirlenmiştir. Çiğ ve pişmiş kokoreçlerde en yüksek maya ve küf sayısı Çanakkale ilindeki örneklerde tespit edilmiştir. *E.coli*, çiğ ve pişmiş örneklerin sırasıyla %24 ve %14,81’inde tespit edilmiştir. Çiğ kokoreç örneklerinde muhtemel *B. cereus* sayısı 3,87-5,34 log KOB/g arasında belirlenirken, pişmiş kokoreç örneklerinde bu sayı 3,13-4,88 log KOB/g arasında saptanmıştır. Ayrıca kokoreç örneklerinin hiçbirinde *S.aureus* ve *Salmonella*’ya rastlanılmamıştır. Çiğ kokoreç örneklerinin %20’sinde ve pişmiş örneklerin %11,11’inde sülfid indirgeyen anaerobik bakterilerin varlığı belirlenmiştir. Çanakkale’den alınan pişmiş kokoreç örneklerinin

birinde *C. perfringens* saptanmıştır. Kokoreç örneklerinin hiçbirinde *C. difficile* varlığı belirlenmemiştir. *C. perfringens* olarak tanımlanan izolatın disk difüzyon yöntemine göre meropenem (10 µg), vankomisin (5 µg) ve klindamisin (2 µg) antibiyotik disklerine karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ancak E-test yöntemine göre ise vankomisin ve klindamisine karşı duyarlı ve metronidazole karşı ise dirençli olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu izolatın zayıf düzeyde biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir.

Pişmiş kokoreç örneklerinde *E. coli* ve *C. perfringens* varlığının, kokoreçlerin pişirme süresinin ve sıcaklığının yanısıra hijyen koşullarının yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durumun gıda güvenliği ve tüketici sağlığı açısından risk oluşturabileceği öngörülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, Kokoreç, Antibiyotik direnç, Biyofilm kapasitesi



## ABSTRACT

### DETERMINATION OF MICROBIOLOGICAL QUALITY AND *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* RISK IN KOKOREÇ

Gizem KORKMAZER

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master Science Thesis in Food Engineering

Advisor: Assoc. Professor Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

18/08/2023, 99

In this study, kokoreç samples were obtained from Çanakkale, Bursa, İzmir and Balıkesir provinces. A total of 140 samples were taken from kokoreç sold both raw and cooked. It was aimed to determine the general microbiological quality (total aerobic mesophilic bacteria (TAMB), mold/yeast, total coliform and *Escherichia coli*) of kokoreç samples, and to investigate the presence of *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Salmonella* pathogens as well as *Clostridium (Clostridioides) difficile* and sulphite-reducing anaerobic bacteria. Sulfite-reducing anaerobic bacteria and probable *C. difficile* isolates obtained from kokoreç samples were biochemically identified with RAPID ID 32A. Obtained *C. difficile* isolates were confirmed by qPCR. The antibiotic resistance profile and biofilm forming capacity of the obtained isolates were investigated.

The highest TAMB load (6,18 log CFU/g) in raw samples was found in samples obtained from Çanakkale. In addition, the highest load of TAMB (5,15 log CFU/g) was determined in the samples from Bursa. The highest yeast and mold loads in raw and cooked kokoreç were determined in samples from Çanakkale province. *E.coli* was detected in 24% and 14,81% of the raw and cooked samples, respectively. While the probable number of *B. cereus* was determined between 3,87-5,34 log CFU/g in raw kokorec samples, this number was found between 3,13-4,88 log CFU/g in cooked kokorec samples. In addition, *S.aureus* and *Salmonella* were not found in any of the kokoreç samples. The presence of sulphite-reducing anaerobic bacteria was determined in 20% of the raw kokoreç samples and 11,11% of the cooked samples. *C. perfringens* was detected in one of the cooked kokoreç samples taken from Çanakkale. The presence of *C. difficile* was not

detected in any of the kokoreç samples. It was determined that the isolate, defined as *C. perfringens*, was sensitive to meropenem (10 µg), vancomycin (5 µg) and clindamycin (2 µg) antibiotic discs according to the disc diffusion method. However, according to the E-test method, it was found to be sensitive to vancomycin and clindamycin and resistant to metronidazole. It was determined that this isolate formed weak biofilm.

The presence of *E. coli* and *C. perfringens* in cooked kokoreç samples is thought to be due to the low cooking time and temperature, as well as insufficient sanitary conditions. It is foreseeable that this situation could pose a risk to food safety and consumer health.

**Keywords:** *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, Kokoreç, Antibiotic resistance, Biofilm capacity

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv

## BİRİNCİ BÖLÜM

1

### GİRİŞ

## İKİNCİ BÖLÜM

5

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sokak Yemekleri ve Tüketiciler Tarafından Tercihi.....	5
2.2. Geleneksel Sokak Yemeklerinden Biri Olan Kokoreç.....	6
2.3. Kokorecin Mikrobiyal Kalitesi.....	8
2.4. <i>Clostridium (Clostridioides) difficile</i> .....	12
2.4.1. Hayvanlarda <i>C. difficile</i> Varlığı.....	13

2.4.2. Et ve Et Ürünlerinde <i>C. difficile</i> Varlığı.....	14
2.5. <i>Clostridium perfringens</i> .....	18
2.5.1. Et ve Et Ürünlerinde <i>C. perfringens</i> Varlığı.....	19
2.6. Hayvan Dışkısında <i>C. difficile</i> ve <i>C. perfringens</i> Varlığı.....	21
2.7. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Kapasiteleri.....	25
2.8. <i>Salmonella</i> spp. ....	26

### ÜÇÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL YÖNTEM

3.1. Materyal.....	29
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Örneklerin Hazırlanması.....	31
3.2.2. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB) Sayısının Belirlenmesi.....	31
3.2.3. Küf ve Maya Sayısının Belirlenmesi.....	31
3.2.4. Toplam Koliform ve <i>E. coli</i> Analizi.....	32
3.2.5. <i>Staphylococcus aureus</i> Aranması ve Doğrulanması.....	32
3.2.6. <i>Bacillus</i> spp. Varlığının Belirlenmesi.....	33
3.2.7. <i>Salmonella</i> Varlığının Belirlenmesi.....	33
3.2.8. Sülfid İndirgeyen Anaerobik Bakterilerin Sayımı .....	34
3.2.9. <i>Clostridium difficile</i> Aranması.....	35
3.2.10. Sülfid İndirgeyen Anaerobik Bakteri ve Şüpheli <i>C. difficile</i> İzolatlarının RAPID ID 32A ile Tanımlanması .....	36
3.2.11. <i>C. difficile</i> İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması.....	37

DNA Ekstraksiyonu .....	37	
<i>C. difficile</i> İzolatlarında <i>tpi</i> (trioz fosfat izomeraz) Gen Varlığının Belirlenmesi.....	37	
3.2.12 Elde Edilen İzolatların Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	40	
3.2.13 Elde Edilen İzolatların Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi.....	42	
3.2.14 İstatistiksel Analizler.....	43	
<b>DÖRDÜNCÜ BÖLÜM</b>		44
<b>ARAŞTIRMA BULGULARI</b>		
4.1. Kokoreç Örneklerinin Mikrobiyolojik Kalitesi.....	44	
4.1.1. Çiğ Kokoreçlerin Mikrobiyal Kalitesi.....	44	
4.1.2. Pişmiş Kokoreçlerin Mikrobiyal Kalitesi.....	53	
4.2. Kokoreç örneklerinden izole edilen Sülfite İndirgeyen Anaerobik Bakteri ve Şüpheli <i>C. difficile</i> İzolatlarının Tanımlanması.....	63	
4.2.1. Kokoreç Örneklerinden Elde Edilen <i>C. perfringens</i> Suşunun Antibiyotik Direnç Profili.....	69	
4.2.2. Kokoreç Örneklerinden Elde Edilen <i>C. perfringens</i> Suşunun Biyofilm Oluşturma Kapasitesi.....	71	
<b>BEŞİNCİ BÖLÜM</b>		73
<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>		
KAYNAKÇA .....	77	
ÖZGEÇMİŞ .....	I	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AMC	Amoksisilin-klavulanik asit
AMP	Ampisilin
CAZ	Seftazidim
CIP	Siprofloksasin
DA	Klindamisin
LEV	Levofloksasin
P	Penisilin
TE	Tetrasiklin
MAR	Marbofloksasin
MTZ	Metronidazol
MEM	Meropenem
VA	Vankomisin
CDEB	<i>C. difficile</i> Enrichment broth- <i>C. difficile</i> zenginleştirme besiyeri
PCA	Plate Count Agar
DRBC	Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar
TBX	Tryptone Bile X-glucuronide Agar
BPA	Baird Parker Agar
RV	Rappaport-Vassiliadis Enrichment Broth
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate Agar
BSA	Bismuth Sulphite Agar
TSCA	Tryptose Sulphite Cycloserine Agar
BHI	Brain Heart Infusion
CDCC	<i>C. difficile</i> Agar Base
CC	sefoksitin-sikloserin antibiyotik katkısı
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
NaCl	Sodyum klorür
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
TE	Tris-EDTA Buffer
FAA	Fastidious Anaerobe Agar
NCTC	National Collection of Type Cultures
qPCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

DNA	Deoksiribo nükleik asit
EFSA	The European Food Safety Authority- Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
CDC	Centers for Disease Control and Prevention-Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri
FDA	Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ATCC	American Type Culture Collection-Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ISO	International Organization for Standardization
OD	Optik yoğunluk
OD <sub>c</sub>	Negatif OD değerlerinin ortalaması
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute- Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
CDE	<i>C. difficile</i> Enfeksiyonu
KOB	Koloni oluşturan birim
RT	Ribotip
g	Gram
L	Litre
%	Yüzde oranı
V	Hacim
µL	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
Nm	Nanometre
log	Logaritma
mg	Miligram

## TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Hayvan dışkısında <i>C. difficile</i> ve <i>C. perfringens</i> varlığı	23
Tablo 2	Kokoreç örneklerinin temin edildiği bölgeler	29
Tablo 3	<i>C. difficile tpi</i> gen varlığının belirlenmesinde kullanılan plasmid, primer ve proplar	38
Tablo 4	Gerçek zamanlı PCR (qPCR) yöntemine göre <i>tpi</i> geni araştırılması (reaksiyon karışımı)	39
Tablo 5	<i>C. difficile tpi</i> gen belirlenmesinde kullanılan döngü koşulları	39
Tablo 6	Optik yoğunluk değerlerine göre biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi	41
Tablo 7	Çiğ kokoreç örneklerinin TAMB, küf/maya ve <i>Staphylococcus spp.</i> sayım sonuçları	45
Tablo 8	Çiğ kokoreç örneklerinde <i>Salmonella</i> varlığı ve toplam koliform, <i>E. coli</i> , muhtemel <i>B. cereus</i> , sülfite indirgeyen anaerobik bakteri sayım sonuçları	50
Tablo 9	Pişmiş kokoreç örneklerinin TAMB, küf/maya ve <i>Staphylococcus spp.</i> sayım sonuçları	54
Tablo 10	Pişmiş kokoreç örneklerinde <i>Salmonella</i> varlığı ve toplam koliform, <i>E. coli</i> , muhtemel <i>B. cereus</i> sülfite indirgeyen anaerobik bakteri sayım sonuçları	58
Tablo 11	Kokoreç örneklerinden elde edilen şüpheli <i>C. difficile</i> izolat sayısı	63
Tablo 12	Elde edilen izolatların RAPID ID 32A ve qPCR sonuçları	65
Tablo 13	Disk difüzyon ve E-test yöntemi ile belirlenen MİK değerleri	70



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Çiğ kokoreç örneklerinin şehirlere göre yüzdelik dağılımı	30
Şekil 2	Pişmiş kokoreç örneklerinin şehirlere göre yüzdelik dağılımı	30
Şekil 3	Kokoreç örneklerinde <i>Salmonella</i> izolasyonu	34
Şekil 4	Kokoreç örneklerinde sülfite indirgeyen anaerobik bakterilerin sayımı	35
Şekil 5	Kokoreç örneklerinden <i>C. difficile</i> izolasyonu	36
Şekil 6	Standart <i>C. perfringens</i> NCTC 8237 suşunun RAPID ID 32A ile görüntüsü	37
Şekil 7	İzolatlardan DNA ekstraksiyonu ve izolatların <i>tpi</i> gen varlığının belirlenmesi	40
Şekil 8	Elde edilen izolatların biyofilm oluşturma kapasitesinin belirlenmesi	41
Şekil 9	Elde edilen izolatların antibiyotik direncinin belirlenmesi	42
Şekil 10	Antibiyotik diskinin ve E-testin yerleştirilmesi	43
Şekil 11	<i>C. perfringens</i> olarak belirlenen izolatın RAPID ID 32A ile görüntüsü	67
Şekil 12	<i>C. perfringens</i> olarak belirlenen izolatın TSC Agar besiyerindeki görüntüsü (A) ve mikroskopik görüntüsü (B)	67
Şekil 13	<i>C. perfringens</i> olarak belirlenen izolatın disk difüzyon sonuçları	70
Şekil 14	<i>C. perfringens</i> olarak belirlenen izolatın E-test sonuçları	71

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

Sokak yemekleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından “sokaklar ve benzer kamusal alanlarda önceden hazırlanmış ya da satıcı tarafından satış yerinde hazırlanarak sunulan, ek bir işleme gerek kalmaksızın satış anında ya da daha sonrasında tüketilebilen yiyecek ve içecekler” olarak tanımlanmıştır (WHO, 1996). Tüketicilerin yaşam koşullarındaki ve tüketim alışkanlıklarındaki değişiklikler sokak yemeklerinin tüketilme sıklığı açısından önemlidir. Sokak yemekleri uygun fiyatlı, lezzetli, besleyici ve kolay erişim sağlanması nedeniyle sıklıkla tüketiciler tarafından tercih edilmektedir (Akbulut, 2010; Cumhuriyet, 2020). Sokak yemeklerinden biri olan kokoreç, küçükbaş hayvanların (koyun ve kuzu) ince bağırsaklarının temizlenerek şiş etrafına yağlarla birlikte sarılıp pişirilmesi ile elde edilen bir yemek çeşitidir. Kokoreç, pişirildikten sonra kırmızı pul biber, karabiber ve kekik gibi baharatlar eklenerek ekmek arasında tüketiciye sunulmaktadır (Kara vd., 2013; Saygılı vd., 2019). Sokak yemeklerinden biri olan kokorecin özellikleri ve kalitesi hakkında sınırlı çalışmalar bulunurken, tüketiciler tarafından tercih edilme sıklığını araştıran çalışmalar mevcuttur (Canbolat ve Çakıroğlu, 2016; Bilgin vd., 2016; Uz, 2021). Sokak yemeklerinin sevilerek tüketilmesinin yanında hijyen ve sanitasyona dikkat edilmediği durumlarda gıda zehirlenmeleri yaşanabilmektedir (Özmert Ergin ve Güzel, 2018). Bu nedenle sokak yemeklerinden biri olan kokorecin mikrobiyal kalitesinin ve güvenliğinin sağlanması için hammadde kalitesinin yanısıra kokoreç yapımı aşamasında da dikkat edilmesi gereken hususlar mevcuttur. Kokorecin üretimi sırasında bağırsakların temizlenmesi gibi durumlarda hijyen ve sanitasyon koşullarına dikkat edilmesi gerekmektedir.

Kokoreç yapımı aşamasında hayvan bağırsakları su ile temizlenerek şişlerde bulunan yağlar etrafına sarılmakta ve yüksek sıcaklıkta fırınlama işlemi uygulanmaktadır. Fırınlama işleminden sonra şişlere sarılmış kokoreçlere -25°C’de şoklama işlemi uygulanmaktadır. Kokoreçler şoklama işleminden sonra satış yapılacak işletmelere veya kasaplara soğuk zincir altında ulaştırılmaktadır. Fırınlama işlemi kokorecin satış noktalarına ulaştırılmasında mikrobiyal kalitenin sağlanması için önemlidir. Geleneksel ürünlerimizden biri olan kokorecin mikrobiyal kalitesi ile ilgili yapılan çalışmaların birinde pişirilmiş kokoreç örneklerine baharat ilave edilmesi, baharatlardan gelen mikrobiyal

yükün kokoreçte bulunan mikrobiyal yükü arttırdığı bildirilmiştir (Temelli vd., 2002). Çiğ ve pişmiş kokoreç örneklerinin mikrobiyolojik açıdan incelendiği diğer çalışmalarda, pişmiş kokoreç örneklerinde bile patojen bakterilerin varlığı bildirilmiş olup, bu durum tüketici sağlığı açısından risk yaratabilmektedir (Bilgin vd., 2016). Farklı şekillerde pişirilen kokoreç örneklerinde bağırsakların iyi temizlenmemesi, ısıtma işleminin yetersizliği gibi durumlarda mikrobiyal kalitenin düşüklüğü gıda güvenliği ve tüketici sağlığı açısından risk teşkil etmektedir.

İnsan ve hayvanların bağırsaklarında bulunan *Clostridioides (Clostridium) difficile*, Gram pozitif, sporlu, toksin üretebilen ve anaerob koşullarda gelişebilen bir bakteridir (Lawson vd., 2016; Akkaya ve Hampikyan, 2019). *C. difficile*'nin insanlarda psödomembranöz kolit ve ishale neden olduğu bilinmektedir (Lim vd., 2020a). Genellikle uzun süre antibiyotik kullanan kişilerde, yaşlılarda ve hastanede tedavi gören kişilerde *C. difficile* enfeksiyonu (CDE) görülme sıklığı artmaktadır. CDE tedavisinde genellikle metronidazol ve vankomisin gibi antibiyotiklerin kullanılması ve bu antibiyotiklere karşı oluşan direnç yeniden CDE riskini artırmaktadır (Bishara vd., 2006; Alataş ve Güner, 2018). *C. difficile* hastane patojeni olarak bilinmekte olup, hastane çevresinden de (çöp kutusu, komodin, sandalyeler) izole edildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Malamou-Ladas vd., 1983; Bull vd., 2012). Yapılan birçok farklı çalışmada sudan (Janezic vd., 2016), topraktan (Lim vd., 2020b), hayvan dışkılarından (Pirs vd., 2008; Vidal vd., 2019), gübrelerden (Dharmasena ve Jiang, 2018; Frentrup vd., 2021), sebzelerden (Lim vd., 2017), et ve et ürünlerinden (Weese vd., 2009) *C. difficile* izole edildiği vurgulanmıştır.

Hayvanlarda *C. difficile* varlığını araştıran çalışmaların yanı sıra hayvan dışkılarından ve et ve et ürünlerinden de *C. difficile* izole edildiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Hopman vd., 2011; Boer vd., 2011; Rahimi ve Khaksar, 2015). Hayvanların kesimi sırasında iç organların çıkarılması aşamasında bağırsaklarda bulunan mikroorganizmaların karkaslara bulaşması *C. difficile* bulaşında önemli kontaminasyon kaynaklarından biri olarak düşünülmektedir. Hayvanların kesimi sırasında alınan örneklerle yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda sığırların %9,9'undan, tavukların %5'inden, domuzların %28'inden, dana karkaslarının %7,9'undan *C. difficile* izole edildiği bildirilmiştir (Indra vd., 2009; Hopman vd., 2011; Rodriguez vd., 2013).

*Clostridium* cinsi içerisinde önemli bir tür olan ve insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunabilen bakterilerden biri de *Clostridium perfringens*'tir. Gram pozitif,

sporlu, toksin üreten ve anaerob koşullarda gelişebilen bir bakteri olarak bilinen bu bakterinin insanlarda gıda zehirlenmesi, gazlı kangren, ishal ve enterokolite neden olduğu bildirilmektedir (Ohtani ve Shimizu, 2016; Kiu vd., 2018). İnsanlarda gıda zehirlenmesine *C. perfringens*'in A tipinin ürettiği alfa toksininin neden olduğu bilinmektedir (Brynstad ve Granum, 2002). Spor formda yaşamını uzun süre sürdürebilen bir bakteri olan *C. perfringens*, hayvanların kesimi aşamasında ve etlerin işlenmesi bölümünde kontamine olabilmektedir. Bu durum insan sağlığı ve gıda güvenliği açısından risk oluşturmaktadır (Lindström vd., 2011; García ve Heredia, 2011). *C. perfringens*'in sporlarının et ve et ürünlerinin pişirilmesinde bile hayatta kalabildiği ve pişirilmiş yemeklerin 12-50 °C sıcaklıklar arasında tutulduğunda sporların vejetatif forma geçtiği ayrıca tüketilen yiyecekler ile mide asidini canlı olarak geçip bağırsaklara kadar ulaşabildiği bildirilmiştir (García ve Heredia, 2011; Lund ve Peck, 2015). *C. perfringens* ile kontamine olan gıdaların, pişirme işleminin yetersizliği veya yemeklerin uygun koşullarda soğutulmaması durumunda tüketicilerde gıda zehirlenmesine neden olabileceği bildirilmiştir (Allart vd., 2013).

Gıda zehirlenmelerine neden olan patojen bakterilerin gıdalara bulaşmasında biyofilm oluşturabilmeleri de önemli bir problemdir. Biyofilmler, mikroorganizmaların hücre dışı matrisi üretmesi ve içerisinde üreyerek üç boyutlu yapılar meydana getirmesi ile oluşmaktadır. Mikroorganizmalar gelişmelerini etkileyecek fiziksel ve çevresel tehditlere karşı biyofilm oluşturarak uzun süre hayatta kalabilmekte ve dezenfektanlara karşı direnç gösterebilmektedir. Bağırsaklarda anaerob ortam olması nedeni ile *Clostridium* spp.'lerin biyofilm oluşturması ve bu biyofilmlere patojenik *Clostridium* spp.'lerin tutunması mümkün olabilmektedir. Bu nedenle *C. difficile* ve *C. perfringens*'in bu biyofilmleri oluşturması veya oluşan biyofilmler içerisinde tutunması mümkündür. *C. difficile*'ye bağlı enfeksiyonların tekrarlanmasında oluşan biyofilmler önemli bir faktör olabilir (Crowther vd., 2014). *C. difficile*'nin oksijen stresine ve hastane ortamlarında, mezbaha ortamlarında ve endüstride sanitasyon uygulamalarına karşı direncini biyofilmlerin arttırdığı bildirilmiştir (Candel-Pérez vd., 2019).

Çalışmamızda, farklı illerden temin edilen olan çiğ ve pişmiş kokoreç örneklerinin genel mikrobiyolojik kalitesinin (TAMB, Küf/Maya, Toplam Koliform ve *E.coli*) belirlenmesi, *S.aureus*, *B.cereus*, *Salmonella* spp. patojenleri ile birlikte *C. difficile* ve *C. perfringens* varlığının da araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca kokoreç numunelerinden elde

edilecek *C. difficile* ve *C. perfringens* izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesi ve antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmadan elde edilecek sonuçlar ile Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre kokorecin halk sağlığı açısından bir risk taşıyıp taşımadığı ve lkemizde *C. difficile*'nin potansiyel bulaşma kaynakları arasında kokorecin yer alıp almayacağı belirlenmiş olacaktır.



## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Sokak Yemekleri ve Tüketiciler Tarafından Tercihi

Son yıllarda toplumda kadınların iş hayatına daha çok girmesiyle artan aile gelir düzeyi, yoğun çalışma saatleri evde yemek hazırlamak için daha az zamanın kalmasına neden olmuş ve insanları daha çok hazır ve sokak yemeklerini tüketmeye yöneltmiştir. Sokak yemeklerinin tercih edilmesinin nedenleri arasında her kesimdeki insana hitap etmesi, uygun fiyatlı olması, besleyici ve lezzetli olması, her damak tadına uygun olması, kültürel bir gelenek olması ve erişiminin kolay olması gelmektedir (Akbulut, 2010; Altaş ve Varnacı Uzun, 2017; Cumhuriyet, 2020).

Sokak yemekleri sadece sokaklarda değil açık alanlarda, sahillerde, kapalı pazar ve fuarlarda satışı ve tüketimi yapılan yemek ve içecekler olarak tanımlanmaktadır (Akbulut, 2010; Angelidis vd., 2006; Gibbons vd., 2006). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) sokak yemeklerini “sokaklar ve benzeri kamusal alanlarda bir noktada sabit olan ya da seyyar satıcılar tarafından hazırlanarak satılan tüketime hazır yiyecek ve içecekler” olarak tanımlamıştır (FAO, 2009). Sokak yemekleri; ön hazırlanması yapılarak satış alanına getirilen ve servis edilecek gıdalar (börek, poğaç, midye dolma, elma şekeri, dondurma, tulumba vb.), satış yapılacak yerde hazırlanan ve servis edilecek gıdalar (balık ekmek, döner, köfte ekmek, kokoreç, kestane, mısır, kahve, pamuk şekeri vb.) ve pişirme işleminin olmadığı yemeğe hazır gıdalar (salatalar, meyve ve sebze suları, meyveler vb.) olarak sınıflandırılabilir (Malhotra, 2017; Cumhuriyet, 2020).

İstanbul’da bulunan yabancı turistlerin sokak yemekleri tercihi ve sokak yemekleri ile ilgili görüşlerinin incelendiği bir çalışmada; turistlerin %90,47’si (19/21) sokak yemeklerini tüketirken oldukça keyif aldıklarını belirtmişlerdir (Albayrak ve Yıldırım, 2019). Sokak yemeklerinin tüketilme sıklığının belirlenmesinin amaçlandığı bir çalışmada ise, düşük gelire sahip, özellikle genç tüketicilerin sokak yemeklerini daha sık tükettikleri belirlenmiş, bunda en önemli rol oynayan unsurların, sokak yemeklerinin ekonomik, hızlı hazırlanabilen ve kolay erişilebilir olduğu saptanmıştır. Ayrıca tüketicilerin eğitim düzeyi, yaşı ve gelir düzeyi arttıkça sokak yemeklerini daha az tercih ettikleri gözlemlenmiştir (Çakıcı vd., 2019).

Üniversite öğrencilerinin fast-food tüketim alışkanlıklarını araştıran bir çalışmada, 17-29 yaş aralığında 382 kız ve 63 erkek öğrenciyi içeren araştırma yapılmıştır. Öğrencilerin %99,6'sının fast-food tükettiğini belirttiği bildirilmiş olup, %33,6'sının haftada 2-3 defa, %26,2'sinin haftada 1 defa, %16,4'ünün ayda 2-3 defa hızlı hazır yiyecek tükettikleri belirlenmiştir. Öğrenciler daha çok servisin hızlı olması (%8,4), ürün çeşidinin çok olması (%3,8), fiyatların uygun olması (%5,8), sevdikleri için (%39,1) ve zamanlarının olmaması (%29,7) nedeniyle sokak yemeklerini tercih ettiklerini bildirmişlerdir (Canbolat ve Çakıroğlu, 2016).

Yabancı ve yerli fast-food ürünlerinin gençler tarafından tercih edilme nedenleri üzerine Muğla'da yapılan bir çalışmada, 532 öğrenciyeye anket uygulanmıştır. Katılımcıların %66,4'ü (353/532) fast-food türü yiyecek ürünlerini tercih ettiklerini, %33,5'i (178/532) ise bazen fast-food türü yiyecek ürünlerinin tercih ettiklerini belirtmişlerdir (Acar, 2016).

Genel olarak sokak yemekleri uygun maliyetli olması, besleyici özellikte olması, herkes tarafından lezzetli bulunması, erişiminin kolay olması ve kültürel alışkanlık olduğu için insanlar tarafından tercih edilmektedir.

## **2.2. Geleneksel Sokak Yemeklerinden Biri Olan Kokoreç**

Geleneksel Türk mutfağına bakıldığında sakatatların kullanımının önemli bir yere sahip olduğu görülebilmektedir. Tandırlarda veya ateş üzerinde pişirilerek tüketilebilen sakatatlar, proteinler, vitaminler, mineral maddeler bakımından oldukça zengin besin kaynaklarıdır (Küçükkömürler ve Koluman, 2021).

Ülkemizdeki geleneksel ürünlerden biri olan kokoreç, küçükbaş veya büyükbaş hayvanlarının bağırsağı kullanılarak ve birçok farklı baharat eklenerek pişirilen bir sokak yemeği olarak tanımlanmaktadır (Kara vd., 2013; Kılıç, 2016). Sakatat ürünlerinden biri olan kokoreç, kendine has pişirme yöntemi ile yatay ve asılı bir şekilde genellikle odun kömüründe pişirilmektedir (Saygılı vd., 2019). Hayvan bağırsaklarından yapılan kokoreç, küçükbaş hayvanların ince bağırsaklarının mezenterial yağların etrafına sarılması ile yapılan, düşük sıcaklıkta kısa bir ısıl işleme tabi tutulduktan sonra ızgarada pişirilen ve baharatlı veya baharatsız olarak tüketilen bir sokak yemeğidir (Kara vd., 2013).

Sokak yemeklerinden olan kokorecin tüketiciler tarafından tercih edilme sıklığı ve yabancı turistler tarafından beğenilme durumu ile ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur.

Yapılan bir çalışmada 17-29 yaş aralığı baz alınmış olup 445 öğrenciye ulaşılmıştır. Fast-food tüketmeyen 2 öğrenci olduğu belirlenmiş olup 443 öğrenciye hazır yemek olarak kokoreci tercih edip etmedikleri sorulmuştur. Toplam 443 öğrencinin 4'ü (%0,9) kokoreci severek tükettiğini belirtmişlerdir (Canbolat ve Çakıroğlu, 2016).

Çanakkale ilinde sokak yemekleri üzerine yapılan bir araştırmada, genellikle 25-34 yaş arasındaki, cinsiyet ve medeni hallerinin benzer olduğu, genellikle lisans mezunu, farklı mesleklere sahip kişiler ile anketler yapılmıştır. Yapılan anketlerin sonuçlarına göre büyük bir kitle (%92) sokak yemeklerini atıştırmalık bir yiyecek olduğu için tercih ettiklerini bildirmişlerdir. Tüketicilere sokak yemeği olarak neleri tercih ettikleri sorulduğunda, ilk akla gelen yemeğin kokoreç (%13) olduğunu belirtmişlerdir. Tüketicilerin, haftada 1-2 sıklıkla sokak yemeklerini tükettikleri, en çok bilinen sokak yemeğinin kokoreç olduğu, hızlı ve pratik olmasının cazip geldiği belirtilmiştir (Uz, 2021).

Covid-19 pandemisi normalleşme durumunda tüketicilerin yiyecek ve içecek tercihleriyle ilgili yapılan bir araştırmada ev ortamı dışında yemek tüketimi konusunda insanların kendisini tedirgin ve kötü hissettiği, bu dönemde sağlıklı beslenmenin ön plana çıkması ile pandemi sonrasında günlük rutinlerinde önemli bir değişiklik olabileceği belirtilmiştir. Bireylerin yarıdan fazlasının pandemi öncesi sürekli sokak yemeklerini tercih ettikleri (hamburger, pizza, kokoreç ve sakatat vs.) fakat normalleşme sürecinde sokak yemeklerini tercih etmedikleri saptanmıştır (Şahingöz Akar ve Öztürk, 2021).

Muğla'da 532 öğrenciye farklı fast-food ürünlerinin tüketim sıklıkları ile ilgili yapılan anketler sonucunda, günde bir öğünden fazla kokoreç tüketenlerin 1 kişi (%0,2), her gün tüketen 1 kişi (%0,2), üç günde bir tüketen 1 kişi (%0,2), haftada bir tüketmeyi tercih eden 102 kişi (%19,2), nadiren tüketen 255 kişi (%47,9) ve kokoreci tüketmeyi hiç tercih etmeyenlerin ise 172 kişi (%32,3) olduğu belirlenmiştir (Acar, 2016).

Gıda ve mutfak hijyeni ile ilgili, kadınların bilgisi, tutumu ve davranışlarının değerlendirilmesiyle ilgili Burdur ilinde yapılan bir araştırmada, 2013-2018 yılları arasında kadınların gıda zehirlenmesi yaşama durumları değerlendirilmiştir. Katılımcılar son yıllarda gıda zehirlenmesi yaşadığını (%11,9) belirtmiş olup 42 kişinin (%10) kokoreçten zehirlendiği belirtilmiştir (Ergin ve Güzel, 2018).



### 2.3. Kokorecin Mikrobiyal Kalitesi

Severek tüketilen sokak yemeklerinden biri olan kokorecin hammaddesinin mikrobiyal yükünün yüksek olması ve hazırlama aşamasında bağırsağın iyi temizlenememesi, yetersiz pişirme uygulanması sonucunda mikrobiyal kalitenin düşmesi ile tüketici sağlığı açısından potansiyel bir risk yaratabilmektedir (Bilgin vd., 2008). Geleneksel bir ürün olduğundan dolayı kokorecin mikrobiyal kalitesi üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır.

Bursa ilinde 10 adet çiğ, 10 adet pişirilmiş ve 10 adet pişirilmiş-baharatlanmış kokoreçlerin mikrobiyal kalitesi üzerine araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada kokoreç örneklerinde toplam aerobik mezofilik bakteri, *E. coli*, koliform bakteri, *Enterobacteriaceae*, enterokoklar, stafilokok-mikrokoklar, küf/maya, koagülaz (+) *S. aureus* yükü ve *Salmonella* varlığı araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda çiğ kokoreç örneklerinde *Salmonella* ve koagülaz (+) *S. aureus* saptanmamış olup koliform bakteri sayısının  $10^4$ - $10^7$  KOB/g, *Enterobacteriaceae* sayısının  $10^4$ - $10^6$  KOB/g, toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının  $10^5$ - $10^7$  KOB/g, küf/maya sayısının  $10^3$ - $10^6$  KOB/g, enterokokların sayısının  $10^3$ - $10^5$  KOB/g, stafilokok-mikrokokların sayısının  $10^3$ - $10^6$  KOB/g arasında olduğu saptanmıştır. Pişirilmiş örneklerin %20'sinde koliform bakteri sayısı saptama sınırının altında ve %80'inde ise  $10^4$  kob/g düzeyinde belirlenirken, tüm pişmiş kokoreç örneklerinde *E. coli* saptama sınırının altında, toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı  $10^4$ - $10^5$  KOB/g düzeyinde, stafilokok-mikrokoklar  $10^3$ - $10^4$  KOB/g düzeyinde, enterokoklar  $10^2$ - $10^4$  KOB/g düzeyinde, %20'sinde küf ve maya sayısı saptama sınırı altında ve %80'inde ise  $10^3$ - $10^4$  KOB/g düzeyinde, *Enterobacteriaceae* sayısı  $10^2$ - $10^4$  KOB/g düzeyinde tespit edilmiş olup *Salmonella* ve koagülaz (+) *S. aureus* tespit edilmemiştir. Pişirildikten sonra baharat ilave edilen kokoreçlerde ise; *Salmonella* varlığı saptanmamış olup toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı  $10^5$ - $10^6$  KOB/g düzeyinde, koliform bakteri sayısı  $10^4$ - $10^5$  KOB/g düzeyinde, *Enterobacteriaceae* sayısı  $10^3$ - $10^5$  KOB/g düzeyinde, *E. coli* saptama sınırı altında, enterokokların sayısı  $10^2$ - $10^4$  KOB/g düzeyinde, stafilokok-mikrokokların sayısı  $10^3$ - $10^5$  KOB/g düzeyinde, küf ve maya sayısı  $10^2$ - $10^4$  KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Pişirilmiş-baharatlanmış kokoreç örneklerinin %70'inde koagülaz (+) *S. aureus* varlığı saptama sınırının altında, %30'unda ise  $10^2$  KOB/g düzeyinde tespit edilmiştir (Temelli vd., 2002).

Yapılan başka bir çalışmada, Isparta'daki 10 farklı restoranttan toplanan (10 çiğ, 10 pişmiş ve 10 pişmiş-çeşnili) toplam 30 kokoreç örneğinin mikrobiyolojik kalitesi araştırılmıştır. Çiğ kokoreç örneklerinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı  $10^5$ - $10^8$  KOB/g düzeyinde, toplam koliform sayısı  $10^4$ - $10^5$  KOB/g düzeyinde, küf/maya sayısı  $10^3$ - $10^6$  KOB/g arasında belirlenmiştir. Pişmiş kokoreç örneklerinde; toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı  $10^2$ - $10^5$  KOB/g düzeyleri arasında saptanmış olup koliform, maya ve küf sayısı saptama sınırının altında belirlenmiştir. Ayrıca pişmiş-terbiyeli kokoreç örneklerinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı  $10^5$ - $10^6$  KOB/g düzeyinde, toplam koliform sayısı  $10^4$ - $10^5$  KOB/g düzeyinde, küf/maya sayısı  $10^3$ - $10^4$  KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Bu çalışma ile pişirme işleminin mikrobiyal yükü önemli ölçüde azaltmasına rağmen, baharat kullanımının pişmiş kokoreç örneklerinin mikrobiyal yükünde önemli bir artışa neden olduğunun sonucuna varıldığı belirtilmiştir (Kılıç, 2016).

Afyonkarahisar'daki farklı satış noktalarından toplanan 50 adet kokoreç numunesinin mikrobiyal kalitesinin araştırıldığı bir çalışmada, toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB), toplam aerobik psikrofilik bakteri (TAPB), *Enterobacteriaceae*, toplam koliform, *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus/Micrococcus*, *Lactobacillus* spp., ve küf/maya analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda ise; ortalama TAMB sayısı 6,29 log KOB/g düzeyinde, TAPB yükü ortalama 4,60 log KOB/g düzeyinde, *Enterobacteriaceae* yükü ortalama 4,35 log KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Pişmiş kokoreç örneklerinde toplam koliform yükü ortalama 2,43 log KOB/g düzeyinde saptanmış ve *E. coli* sayısı ortalama 2,10 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. *Enterococcus* spp. yükü ortalama 4,17 log KOB/g düzeyinde, *Lactobacillus* spp. sayısı ise ortalama 5,63 log KOB/g düzeyinde, *Staphylococcus/Micrococcus* sayısı ortalama 2,85 log KOB/g düzeyinde ve küf/maya sayısı ortalama 5,89 log KOB/g olarak saptanmıştır. Sonuçlara bakıldığında alınan pişmiş kokoreç örneklerinin mikrobiyolojik kalitesinin düşük olduğu ve tüketici sağlığı bakımından risk taşıyabildiği sonucuna varıldığı belirtilmiştir (Kara vd., 2013).

Tekirdağ'da toplanan 180 kokoreç örneği (60 çiğ, 60 ızgara ve 60 tandır fırınlanmış) farklı satış noktalarından temin edilerek mikrobiyolojik kalitesi incelenmiştir. Çiğ kokoreç örneklerinde; toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısı ortalama  $3,8 \times 10^7$  KOB/g düzeyinde, koliform sayısı ortalama  $2,2 \times 10^4$  KOB/g düzeyinde ve koagülaz (+) *S. aureus* sayısı ortalama  $3,2 \times 10^3$  KOB/g olarak bulunmuştur. Bunların dışında 60 örneğin tamamında *E. coli*, %45'inde *C. perfringens*, %15'inde *E. coli*

O157:H7, %90'ında ise *Salmonella* spp. pozitif bulunmuştur. Izgara ve tandır fırınlanmış örneklerin analiz sonuçlarında ise; sırasıyla TMAB sayısı ortalama  $1,2 \times 10^3$  ve  $2,3 \times 10^4$  KOB/g düzeyinde, koliform sayısı ortalama  $5,7 \times 10^1$  ve  $8,6 \times 10^1$  KOB/g düzeylerinde, koagülaz (+) *S. aureus* sayısı ise ortalama  $1,2 \times 10^2$  ve  $3,1 \times 10^2$  KOB/g düzeylerinde belirlenmiştir. Izgara ve tandırda pişirilmiş kokoreç örneklerinde *E. coli* O157:H7 ve *C. perfringens* saptanmazken, ızgarada pişirilmiş kokoreçlerde %5 oranında *E. coli* ve *Salmonella* spp. saptanmıştır. Tandır fırınlanmış kokoreç örneklerinin %40'ında *E. coli* ve %70'inde ise *Salmonella* spp. belirtilmiştir (Bilgin vd., 2016).

Tekirdağ'da yapılan başka bir çalışmada ise, 20 adet çiğ, 20 adet ızgara ve 20 adet tandırda pişirilmiş olmak üzere toplam 60 adet kokoreç örneklerinin mikrobiyal kalitesini değerlendirmek için analizler yapılmıştır. Çiğ örneklerin hepsinde *E. coli* tespit edilmiş, örneklerin %15'inde *E. coli* O157:H7 ve %45'inde ise *C. perfringens* saptanmıştır. Toplam mezofilik aerobik bakteri sayısının  $1,2 \times 10^6$ - $1,2 \times 10^8$  KOB/g düzeyleri, koliform bakteri yükünün ortalama  $2,2 \times 10^4$  KOB/g düzeyinde ve *S. aureus* yükünün ise ortalama  $3,2 \times 10^3$  KOB/g düzeyinde olduğu bulunmuştur. Tandırda pişirilen örneklerin toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı ortalama  $2,3 \times 10^4$  KOB/g düzeyinde belirlenmiş olup örneklerin %95'inde koliform bakteri ve tandırda pişirilmiş örneklerin hepsinde *S. aureus* saptanmıştır. Tandırda ve ızgarada pişirilmiş örneklerde *E. coli* O157:H7 ve *C. perfringens* saptanamazken, tandırda pişirilen örneklerin %70'inde *Salmonella* spp. ve %40'ında da *E. coli* saptanmıştır. Izgarada pişmiş kokoreç örneklerinde sadece birer örnekte *Salmonella* spp. ve *E. coli*'ye rastlanılmıştır. Izgarada pişirilmiş örneklerin toplam mezofilik aerobik bakteri yükü en yüksek  $5,5 \times 10^3$  KOB/g düzeyinde ve en düşük  $<10^2$  KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Izgarada pişirilmiş kokoreç örneklerinin %20'sinde toplam koliform grubu bakteri belirlenmiş ve %50'sinde de *S. aureus* saptanmıştır (Bilgin vd., 2008).

Elazığ'da yapılan bir çalışmada, sade pişmiş ve baharatlı pişmiş olacak şekilde 96 adet kokoreç örneğinin mikrobiyolojik kalitesi araştırılmıştır. Sade pişmiş kokoreç örneklerinde ortalama TAMB sayısı 3,92 log KOB/g düzeyinde, ortalama toplam aerobik psikrofilik bakteri (TAPB) sayısı 3,12 log KOB/g düzeyinde, ortalama koliform sayısı 2,04 log KOB/g düzeyinde, ortalama *Enterobacteriaceae* sayısı 2,22 log KOB/g düzeyinde, ortalama *Staphylococcus-Micrococcus* sayısı 1,65 log KOB/g düzeyinde tespit edilmiştir. Ayrıca sade pişmiş kokoreç örneklerinde ortalama maya/küf sayısı 1,16 log KOB/g düzeyinde, ortalama *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* sayısı 3,06 log KOB/g

düzeyinde ve ortalama fekal streptokoklar 1,67 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Sade pişmiş kokoreç örneklerinde ortalama *E. coli* sayısı 1,13 log KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Ancak sade pişmiş kokoreç örneklerinde *S. aureus* ve *C. perfringens* tespit edilmemiştir. Baharatlı pişmiş kokoreç örneklerinde ortalama TAMB sayısı 4,03 log KOB/g düzeyinde, ortalama TAPB sayısı 3,38 log KOB/g düzeyinde, ortalama koliform sayısı 2,49 log KOB/g düzeyinde, ortalama *Enterobacteriaceae* sayısı 2,81 log KOB/g düzeyinde, ortalama *Staphylococcus-Micrococcus* sayısı 2,04 log KOB/g düzeyinde tespit edilmiştir. Baharatlı pişmiş kokoreçlerde örneklerinde ortalama maya/küf sayısı 2,10 log KOB/g düzeyinde, ortalama *Lactobacillus-Leuconostoc-Pediococcus* sayısı 3,48 log KOB/g düzeyinde ve ortalama fekal streptokoklar 2,00 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Ayrıca baharatlı pişmiş örneklerde ortalama koagülaz pozitif *S. aureus* sayısı 1,36 log KOB/g düzeyinde tespit edilmiştir. Baharatlı ve pişmiş kokoreç örneklerinin hiçbirinde *E. coli* ve *C. perfringens* varlığına rastlanılmamıştır. Ek olarak sade pişmiş ve baharatlı pişmiş kokoreçlerin pH'ı sırasıyla 6,38 ve 6,27 olarak belirlenmiştir (Akgöl vd., 2023).

İzmir'de yapılan bir çalışmada ise, farklı mezbahalardan çiğ kokoreç ve farklı işletmelerden pişmiş kokoreç örnekleri temin edilmiş ve mikrobiyolojik kalitesi araştırılmıştır. Mezbahalardan alınan çiğ örneklerde TAMB yükü 5-7 log KOB/g arasında belirlenmiş ve çiğ kokoreçlerde *Salmonella* varlığı tespit edilmemiştir. Farklı işletmelerden ızgarada pişirilmiş 25 adet kokoreç örneklerinin %20'sinde *S. aureus*, %20'sinde fekal koliform ve %28'sinde fekal streptokok varlığı saptanmıştır. Benzer olarak pişmiş kokoreç örneklerinden de *Salmonella* tespit edilmemiştir. Ayrıca, çiğ kokoreç örneklerine 4 log *Salmonella* Typhimurium NRRL B-4420 suşu inoküle edilmiştir. Ön pişirme uygulanan kokoreçlere kıyasla geleneksel pişirme işlemlerinin (ızgara, fırın, haşlama) inoküle edilen *Salmonella*'yı inaktive ettiği tespit edilmiştir. Pişmiş kokoreç örneklerinin mikrobiyal kalitesinin düşük olması, pişirildikten sonra çevreden ve personelden kontamine olduğunu göstermektedir. Bu nedenle halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından işletmelerdeki hijyenik önemlerin alınmasının gerektiği düşünülmektedir (Göktan vd., 1991).

Farklı hayvansal gıdalarda (pastörize edilmemiş inek, koyun ve keçi sütü, kıyım, sığır eti, domuz sosisi ve kokoreç) *Escherichia coli* O157:H7'nin varlığı araştırılan bir çalışmada, domuz bağırsaklarından yapılan kokoreçlerin %2'sinde (1/50) *E. coli* O157:H7 varlığı tespit edilmiştir (Dontorou vd., 2003). Yapılan başka bir çalışmada ise, Laguna

şehrinde sıcak şekilde satılan ızgara tavuk bağırsağı örnekleri mikrobiyal kaliteleri açısından incelenmiştir. Izgarada şişlerde kızartılan tavuk bağırsağı örneklerinin birinde (%4) *Salmonella* Typhimurium tespit edildiği bildirilmiştir (Manguiat ve Fang, 2013).

Kokorecin mikrobiyal kalitesi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda çiğ kokoreç örneklerinde insan sağlığına zararı açısından patojen mikroorganizmaların birçoğuna rastlanılmıştır. Farklı pişirme tekniklerine göre pişirilmiş olan kokoreç örneklerinde de yetersiz temizleme ve pişirme işlemleri sonucunda bile mikrobiyal kalite oldukça düşük düzeyde olup bu durum tüketici sağlığı açısından potansiyel bir risk taşımaktadır. Özellikle en sık tüketilen sokak yemeklerinden olması dolayısıyla kokorecin tüketiminden kaynaklanacak risk artmaktadır.

#### **2.4. *Clostridium (Clostridioides) difficile***

Gram pozitif, anaerobik, spor oluşturan ve toksin üretebilen çubuk şeklinde bir bakteri olan *Clostridium (Clostridioides) difficile* (Lawson vd., 2016), ısıya karşı dayanıklı ve çevrede zor koşullarda yaşamını sürdüren spor formda ya da oksijene karşı dayanıklı olmayan vejetatif bir formda bulunmaktadır (Akkaya ve Hampikyan, 2019; Kachrimanidou ve Malisiovas, 2011). İnsanların ve hayvanların bağırsak florasında bulunan *C. difficile*, yenidoğanların dışkısında Hall ve O'Toole tarafından 1935 yılında ilk kez belirlenmiştir (Ghose, 2013; Seekatz ve Young, 2014). 1978 yılında antibiyotik tedavisi görmüş bireylerde psödomembranoz kolit ve ishale neden olduğu tanımlanan *C. difficile*'nin genel olarak hastane kaynaklı bir enfeksiyona neden olduğu belirlenmiştir (Lim vd., 2020a). İnsanlarda ve hayvanlarda görülen bazı *C. difficile* suşları, *tcdA* ve *tcdB* genlerinden salınan Enterotoksin (Toksin A), Sitotoksin (Toksin B) veya ikili toksin olan binary toksin (*cdtA* ve *cdtB*) üretebilmektedir. Üçüncü toksin olan binary toksinin *C. difficile* enfeksiyonlarındaki etkisi ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir. Toksin A, güçlü enterotoksik ve hafif sitotoksik aktiviteye sahiptir. Ancak Toksin B çok güçlü bir sitotoksik aktiviteye sahiptir. (Taylan vd., 2020).

*C. difficile* enfeksiyonlarında antibiyotik kullanımının çeşitli sorunlara neden olabildiği ve enfeksiyonların tekrarlanmasında etkisi olabildiği ifade edilmektedir. Antibiyotik kullanımı sadece bağırsakta bulunan zararlı mikroorganizmaları değil yararlı mikroorganizmalarında yapısını etkilemektedir. Bu durumda kullanılan bazı antibiyotikler (ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler, klindamisin ve linkomisin) bağırsak florasında değişikliğe neden olduğundan *C. difficile*'nin bağırsakta toksin salgılaması ve çoğalmasına

ortam sağlayabilmektedir. *C. difficile* enfeksiyonlarının tedavisinde genel olarak metronidazol veya vankomisin antibiyotikleri kullanılmaktadır. Fakat bu konuda yapılan bazı çalışmalarda *C. difficile* suşlarının vankomisin ve metronidazole karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir (Akkaya ve Hampikyan, 2019; Alataş ve Güner, 2018; Bishara vd., 2006; Peláez vd., 2002). Genellikle uzun süre antibiyotiğe maruz kalan, yaşı ilerlemiş ve hastanede tedavi görmüş kişilerde *C. difficile* enfeksiyonu riski artmaktadır. Tedavi amaçlı klindamisin, sefalosporin, florokinolon antibiyotiklerinin kullanılmasından sonra bağırsak florasının bozulması ve *C. difficile* sporlarının çimlenmesine olanak sağlamakta ve vejetatif hücre formuna dönen bakterinin toksin üretebilmesi için uygun ortam oluşmaktadır. Risk faktörlerinden biri olan yaşlı bireylerin uzun süre hastanede tedavi görmesinin, bağırsağın kolonizasyon direncinin azalmasına neden olduğu belirlenmiştir (Knight ve Riley, 2013). *C. difficile* enfeksiyonu için tedavi gören hastaların %16'sının toplumsal kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Bull vd., 2012). Ayrıca hastanelerde başka hastalıklar için tedavi gören hastalardan (%22,2) ve hastane çevresinden (%4,9) (komodin sandalyeleri, karyolalar, tozluklar ve çöp kutuları gibi) *C. difficile* izole edildiği bildirilmiştir. Dolayısıyla, *C. difficile*'nin başka kaynaklardan da bulaşabilme ihtimalinin var olduğu ifade edilmiştir (Malamou-Ladas vd., 1983).

Gıdalar toplumda olası bir *C. difficile* kaynağı olarak varsayılmıştır. Ancak bu hipotezi onaylayan veya çürüten çalışmaların halen eksik olduğu belirtilmiştir (Primavilla vd., 2019). Yapılan pek çok araştırma; suda (Bazaid, 2012; Kotila vd., 2013; Janezic vd., 2016), toprakta (Janezic vd., 2016; Lim vd., 2020), hayvan dışkısında (Hammit vd., 2008; Pirs vd., 2008; Rodriguez vd., 2012; Vidal vd., 2019), gübrede (Metcalf vd., 2010; Bazaid, 2012; Dharmasena ve Jiang, 2018; Frentrup vd., 2021; Lim vd., 2020b), sebze (Bakri vd., 2009; Han vd., 2018; Lim vd., 2017; Tkalec vd., 2018) ve etlerde (Rodriguez-Palacios vd., 2007; Songer vd., 2009; Weese vd., 2009) *C. difficile* varlığını ortaya koymuştur.

#### **2.4.1. Hayvanlarda *C. difficile* 'nin Varlığı**

*C. difficile* bulaşı kaynaklarından biri olan gıda hayvanlarının kesim işleminde iç çıkarma kısmında bağırsak içeriğinin bulaşması, karkasların kesim sırasında kontaminasyonu veya mezbahada et parçalama sırasında ortama *C. difficile* sporlarının bulaşması durumunda hayvanlardan insanlara taşınabilmektedir. Yapılan çalışmalarda; kesim sırasında iç organ işleme hattında, besi sığırlarının %9,9'unda (Rodriguez vd., 2013), domuzların %28'inde (Hopman vd., 2011), etlik piliçlerin %5'inde (Indra vd.,

2009; Koene vd., 2012), domuz karkaslarının hızlı soğutulmasından sonra %7 oranında ve dana karkaslarının %7,9'unda (Rodriguez vd., 2013) *C. difficile* tespit edildiği belirtilmiştir.

Kuzey İtalya'da bulunan farklı şehirlerden toplamda 2139 hayvan örneği (dışkı, bağırsak içeriği ve karkas sürüntüsü) *C. difficile* varlığı açısından analize alınmıştır. *C. difficile* izolasyonu için domuzlardan toplam 1439 örnek alınırken sığırlardan toplam 700 örnek alınmıştır. Yenidoğan domuzların bağırsak içeriklerinin %29'unda (143/493) yenidoğan sığırların bağırsak içeriklerinin %1,4'ünde (2/140), domuz dışkılarının %14,58'inde (105/720), sığır dışkılarının %3,61'inde (13/360), mezbahalardaki domuzların bağırsak içeriğinin %1,8'inde (2/113) ve sığırların karkas sürüntülerinin %2'sinde (2/100) *C. difficile* varlığı tespit edilmiştir. Toplam 2139 hayvan örneğinin 267'sinde (%12,5) *C. difficile* varlığı tespit edilmiştir. Toplam 267 örnekte toksin gen varlığı araştırıldığında, 252'sinin binary toksin, toksin A ve toksin B genlerini içerdiği, 7'sinin toksin A ve binary toksin genlerini bulundurduğu ve 6'sının ise toksin A ve toksin B genleri açısından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen izolatların metronidazol ve vankomisin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir (Spigaglia vd., 2023).

Çiftlik ve kümes hayvanlarının bağırsak florasında *C. difficile* varlığı, bu hayvanların kesimi ve işlenmesi sırasında etlerin *C. difficile* ile kontaminasyonu riskini artırmaktadır (Rodriguez vd., 2013; Hopman vd., 2011; Indra vd., 2009; Koene vd., 2012).

#### **2.4.2. Et ve Et Ürünlerinde *C. difficile* Varlığı**

Et ve et ürünlerinde *C. difficile* varlığı konusunda yapılan araştırmalar sonucunda farklı hayvanların kıymasında (Bouttier vd., 2010; Rodriguez-Palacios vd., 2007; Visser vd., 2012); tavuk, kuzu, sığır, koyun ve keçi etlerinde (Boer vd., 2011; Rahimi vd., 2014), hamburger (Rahimi ve Khaksar, 2015), köfte (Ersöz ve Coşansu, 2018), salam, sosis ve sucuk (Muratoglu vd., 2020) gibi et ürünlerinde ve modifiye atmosfer paketli (MAP) kuşbaşı etler ve sığır kıymasında (Atasoy ve Gücükoğlu, 2017) *C. difficile* varlığı belirlenmiştir.

2005 yılında Kanada'da yapılan bir çalışmada, 53 sığır kıyması ve 7 dana kıyması *C. difficile* varlığı bakımından analize alınmıştır. 53 sığır kıymasının 11'inden (%20,8) ve 7 dana kıymasının 1'inden (%14,3) *C. difficile* izole edildiği bildirilmiştir. Elde edilen izolatlardan 2'sinin RT077 ribotipini içerdiği ve diğer 1 izolatın da RT014 ribotipini

içerdiği belirlenmiştir. Bu etlerden elde edilen izolatların antibiyotik direnci E-test yöntemi ile ölçülmüş olup metranidazol ve vankomisine duyarlı, levofloksasin ve klindamisine dirençli oldukları belirlenmiştir (Rodriguez-Palacios vd., 2007). Perakende satılan etlerde *C. difficile* kontaminasyonunun araştırıldığı bir çalışmada 149 kıyma ve 65 dana pirzola örneğinde *C. difficile* varlığı sırasıyla %6,7 (10/149) ve %4,6 (3/65) olarak belirlenmiştir (Rodriguez-Palacios vd., 2009).

Çiğ et ürünlerinde *C. difficile* varlığı araştırılan bir çalışmada ise, 26 çiğ kıymanın 13'ünde (%50), 7 adet çiğ dana sosisin 1'inde (%14,3) ve 13 adet çiğ domuz sosisinin 3'ünde (%23,1) *C. difficile* varlığı belirlenmiştir (Songer vd., 2009). Çiğ dana ve domuz kıymasında *C. difficile* varlığı araştırılan diğer bir çalışmada ise, 115 adet dana kıyma örneğinin 14'ünden (%12) ve 115 adet çiğ domuz kıyma örneğinin 14'ünden (%12) *C. difficile* izole edilmiştir (Weese vd., 2009). Bununla birlikte Fransa'da vakumla paketlenmiş çiğ sığır kıymalarında *C. difficile*'nin daha düşük oranda (%1,9) tespit edildiği bildirilmiştir. Kanada'da yapılan başka bir çalışmada ise, sığır etinden yapılmış kıymada %8,3 (2/24) ve domuz etinden yapılmış kıymada ise %4,2 (1/24) oranında *C. difficile* izole edildiği tespit edilmiştir (Visser vd., 2012).

İran'ın İsfahan bölgesinde yapılan bir çalışmada *C. difficile* varlığı araştırılmış olup kıyılmış dana etinde %2,8 (1/35), dana kıymasında %2,1 (1/46), kıyılmış koyun etinde %3,6 (2/55) ve koyun kıymasında %6,2 (4/64) oranında *C. difficile* saptanmıştır (Esfandiari vd., 2014). Fildişi Sahili sokaklarında satılan pişmiş sığır eti ve pişmiş sığır böbreğinde *C. difficile* varlığı araştırılmıştır. 172 adet pişmiş sığır böbreğinin 19'u (%11,04) ve 223 adet pişmiş sığır etinin ise 30'unda (%13,45) *C. difficile* saptanmıştır (Kouassi vd., 2014).

Farklı hayvanlardan elde edilen etlerde *C. difficile* varlığı araştırılan birçok çalışma bulunmaktadır. Kuzu etlerinde %6,3 (1/16) ve tavuk etlerinde %2,7 (7/257) oranında (Boer vd., 2011), sığır etlerinde %1,65 (2/121), koyun etinde %0,67 (1/150) ve keçi etinde %3,26 (3/92) oranında (Rahimi vd., 2014), inek etinde %3,5 (7/200) ve koyun etinde %1 (2/200) oranında (Bakri, 2018) *C. difficile* varlığı rapor edilmiştir.

*C. difficile*'nin hamburger ve kıymada varlığının araştırıldığı başka bir çalışmada, hamburgerde %1 ve kıymada %3,3 oranında *C. difficile* tespit edilmiş olup hamburgerden



izole edilen izolatın ve kıymadan izole edilen 5 izolatın ise 4'ünün toksinojenik suşlar olduğu bildirilmiştir (Rahimi ve Khaksar, 2015).

Ülkemizde et ve et ürünlerinde, karkaslarda *C. difficile* varlığı araştırılmıştır. Köfte ve pişmiş et dönerde *C. difficile* varlığının sırasıyla %5,5 ve %8,3 olarak belirlendiği belirtilmiştir (Ersöz ve Coşansu, 2018). 2020 yılında yapılan bir çalışmada salamda %23,9 (17/71), sosiste %2,0 (1/50), sucukta %5,8 (3/52) ve çiğ olarak satılan köftelerde ise %2,8 (1/36) oranında *C. difficile* varlığı tespit edilmiştir (Muratoğlu vd., 2020). Yapılan bu çalışmalar değerlendirildiğinde hammaddesi bağırsak olan kokoreçte *C. difficile* riskinin olduğu ancak bu üründe *C. difficile* aranmasına dair herhangi bir çalışmanın olmadığı belirlenmiştir.

Suudi Arabistan'da 240 çiğ et örneğinde *C. difficile* aranmasının sonucunda; deve etinin %8,3'ünde (5/60), sığır etinin %13,3'ünde (8/60), koyun etinin %17'sinde (1/60) ve keçi etinin %1,7'sinde (1/60) *C. difficile* izole edildiği bildirilmiştir. Toplam 240 çiğ et örneğinin %6,3'ünde *C. difficile* varlığı Vitek-2 kompakt sistemi ile doğrulanmıştır. Elde edilen *C. difficile* izolatlarında antibiyotik direnç E-test yöntemi ile belirlenmiştir. *C. difficile* izolatların vankomisin ve metronidazol antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu ancak bazı izolatların tetrasiklin, klindamisin veya moksifloksasine değişken derecelerde dirençli olduğu bildirilmiştir (Taha, 2021).

Dana, sığır ve domuz etlerinde *C. difficile* varlığı araştırılan bir çalışmada, toplam 644 çiğ et örneği kullanılmıştır. Genel olarak çiğ örneklerin sadece 10 tanesinden *C. difficile* izole edilmiştir (%1,6). Belirlenen izolatlar toksin A veya B açısından pozitif çıkmıştır. Dana eti örneğinden elde edilen izolatlardan biri ve domuz eti örneğinden elde edilen izolatların biri iki toksin açısından da pozitif çıkmıştır. İzolatlar ribotiplendirildiğinde 5 farklı ribotip çıkmış olup bunlar 027, 106, 131, NS110 ve NS195 olarak belirlenmiştir. RT027 dana etinde, NS110 2 dana eti ve 1 domuz etinde, RT106 3 domuz eti ve 1 dana etinde, RT131 ise 1 dana etinde, NS195 ise 1 domuz etinde tespit edilmiştir. *C. difficile* tespit edilen izolatlara klindamisin, metronidazol, moksifloksasine, rifampin, tigesiklin ve vankomisine karşı antibiyotik direnç testi yapılmış elde edilen izolatların tamamının moksifloksasine dirençli olduğu belirlenmiş ve test edilen diğer antibiyotiklere ise duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tan vd., 2022).

Diğer bir çalışmada, sığır, koyun ve keçi etlerinde *C. difficile* varlığı araştırılmış olup toplam 240 örneğin 7 tanesinde *C. difficile* izole edildiği belirtilmiştir. Disk difüzyon metoduyla *C. difficile* izolatlarına karşı antibiyotik direnç araştırılmıştır. Antibiyotik direnç için sefoksitin (5 µg), kloramfenikol (30 µg), siprofloksasin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), amoksisilin-klavulanik asit (30 µg), ampisilin (10 µg), klindamisin (2 µg), metronidazol (5 µg), rifampisin (5 µg) ve vankomisin (30 µg) antibiyotikleri kullanılmıştır. Genel olarak en yüksek direnç tetrasiklin ve ampisiline karşı oluşmuş olup sırasıyla %85,71 ve %85,71 olarak belirlenmiştir. *C. difficile* izolatları vankomisine ve klindamisine karşı %42,85 oranda dirençli olup en düşük kloramfenikole karşı (%14,28) direnç gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmanın, gıda olarak tüketilen hayvanların özellikle koyun etinden elde edilen örneklerin çeşitli antibiyotiklere karşı dirençli olduğu ve riskli *C. difficile* taşıyıcısı olduklarını doğrulamakta olduğunu belirtmişlerdir (Bacheno vd., 2022a).

Benzer şekilde Kuzey İran'da çiğ et ve karkaslardan alınan sürüntü örneklerinde *C. difficile* varlığı araştırılmış olup toplam 485 numunenin analize alındığı belirtilmiştir. Sığır, koyun ve keçi etlerinden her birinden 80 örnek toplanmış olup sığır karkaslarından 85 numune, koyun karkaslarında 80 ve keçi karkaslarından 80 numune sürüntü alındığı belirtilmiştir. Çiğ et ve karkas sürüntü örneklerinde *C. difficile* rastlanma sıklığı sırasıyla %2,91 ve %4,48 olarak bulunmuştur. En yüksek rastlanma sıklığı çiğ koyun etinde (%5) saptanmıştır. Karkas sürüntü örnekleri arasında en yüksek *C. difficile* varlığı yine (%7,5) koyun karkaslarında belirlenmiştir. Çiğ et ve karkas yüzey sürüntü örneklerinden elde edilen izolatlarda %61,11 oranında A toksini (*tcdA*), %22,22 oranında B toksini (*tcdB*), %44,44 oranında binary toksin A (*cdtA*) ve %16,66 oranında bağlayıcı olan binary toksin B (*cdtB*) belirlendiği tespit edilmiştir. Çiğ et ve yüzey karkas sürüntü örneklerinden elde edilen izolatlarda insanlarda şiddetli *C. difficile* enfeksiyonuna (CDE) neden olan RT027 ribotipine %25 oranda çiğ koyun etinde rastlanmış olup bu 027 ribotipinin sığır karkas yüzeyinden elde edilen izolatların %33,33'ünde ve koyun karkas yüzeyinden elde edilen izolatlarında %33,33'ünde görüldüğü belirlenmiştir. İnsanlarda şiddetli CDE'ye neden olabilecek bir ribotip olan RT078, çiğ koyun etinden elde edilen izolatların %50'sinde, sığır karkas yüzeyinden elde edilen izolatların %66,66'sında ve koyun karkas yüzeyinden elde edilen izolatların %50'sinde saptanmıştır. Elde edilen *C. difficile* izolatlarının Epsilon test (E-test) ile vankomisin, rifampin, eritromisin, moksifloksasin, levofloksasin, siprofloksasin, klindamisin, kloramfenikol, metronidazol, tetrasiklin ve meropenem

antibiyotiklerine karşı direnç profili incelenmiştir. Elde edilen *C. difficile* izolatları en yüksek tetrasiklin, eritromisin, metronidazol, siprofloksasin ve klindamisin antibiyotiklerine karşı direnç göstermiştir. En düşük direnç ise kloramfenikol ve meropenem antibiyotiklerine karşı gözlemlenmiştir. Karkas sürüntü örneklerinde *C. difficile* varlığının yüksek olmasının kesim esnasında mezbaha ortamındaki kontaminasyondan kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir (Bacheno vd., 2022b). RT027 ve RT078 ribotiplerinin, insanlarda şiddetli *C. difficile* enfeksiyonuna (CDE) neden olduğu bilinmekte olup gıda hayvanları ve gıda numunelerinden izole edilenlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Weese, 2010; Janezic vd., 2012).

Yapılan başka bir çalışmada, kıyılmış etlerin güvenliği için önerilen sıcaklıkta (71°C) pişirmenin ve 85°C'de yeniden pişirmenin *C. difficile* sporları üzerindeki etkisi ölçülmüştür. 20 adet *C. difficile* suşu 71°C ve 2 saat pişirilme sonucunda canlılığını koruyabilmiştir. Ancak 85°C'de yeniden ısıtma işlemi uygulandığında 10 dakika içinde %90'ının inhibe olduğu saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda et ve et ürünlerinin pişirme sıcaklığının, *C. difficile* sporlarının ısıl direnci düşünülerek belirlenmesi gerektiği ifade edilmiştir (Rodriguez-Palacios vd., 2010). 63-85°C arasındaki minimum et içi pişirme sıcaklığı, bazı kuruluşlar tarafından *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella* spp. gibi patojenleri kontrol etmek için belirlenmiştir. *C. difficile* sporları bu sıcaklık arasında hayatta kalabildiğinden soğutma aşamasında sporların çimlenip çoğalabilme ihtimalinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Rodriguez-Palacios ve LeJeune, 2011).

Hayvanların kesimi sırasında *C. difficile*'nin ortamı kontamine etmesi, iç organ çıkarma esnasında bağırsak içeriğinin dikkatli çıkarılmaması sonucunda dağılması, mezbaha ortamında *C. difficile* sporlarının birikmesi durumuna ve bu durumda hayvan karkaslarının ve etlerinin tekrar kontaminasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir (EFSA, 2013). *C. difficile*'nin özellikle bağırsaklarda yerleşiyor olması bağırsaktan üretilen kokorecin gıda güvenliği açısından incelenmesinin gerekli kılacaktır.

## **2.5. *Clostridium perfringens***

*Bacillus aerogenes capsulatus*, *Bacillus welchii*, *Bacillus perfringens* veya *Clostridium welchii* gibi eski isimleriyle bilinen *Clostridium perfringens*; Gram pozitif, spor oluşturabilen, anaerobik, çubuk şeklinde bir bakteri olarak bilinmektedir. *C. perfringens*, 1891 yılında ilk kez William H. Welch tarafından 38 yaşındaki bir adamın

otopsisinden izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Kiu vd., 2018). Doğada, toprakta, insan ve hayvanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunan *C. perfringens*, gazlı kangren (klostridial miyonekroz), gıda zehirlenmesi, ayrıca ishal ve enterokolite neden olmaktadır (Ohtani ve Shimizu, 2016). Alfa ( $\alpha$ -), beta ( $\beta$ -), epsilon ( $\epsilon$ -) ve iota ( $\iota$ -) olarak ayrılan 4 ana toksinin üretimine göre A, B, C, D, E, F, G olan yedi toksinotipe ayrılmaktadır (Forti vd., 2020). Moleküler olarak yapılan bazı araştırmalar sonucunda *C. perfringens* izolatlarının %1-5'inin A tipi olduğu ve bu toksinin özellikle gıda zehirlenmesine yol açtığı bilinmektedir (Brynstad ve Granum, 2002).

Isıya dayanıklı sporlar oluşturması ve geniş büyüme sıcaklık aralığı olan *C. perfringens*, oksijen varlığında gelişmemektedir (García ve Heredia, 2011). *C. perfringens*'in vejetatif hücreleri gıda işleme ve muhafaza sırasında oksijenle temasında gelişmemekte fakat spor formları yaşamını sürdürebilmektedir. Enterotoksin içeren *C. perfringens* sporları ile kontamine olmuş gıdalar yavaş yavaş soğutulduğunda ve gıdalar 10-54°C sıcaklık aralığında tutulduğunda *C. perfringens* sporlarının vejetatif forma geçtiği belirtilmiştir (Li ve McClane, 2006; Lindström vd., 2011). Enterotoksijenik bir bakteri olan *C. perfringens*; hayvan karkasları, hayvan dışkısı veya toprakla temas edilmesiyle ya da hayvanların kesimi sırasında ve etlerin işlenmesi sırasında kontamine olabilmektedir. Et ve et ürünleri pişirildiğinde birçok zararlı mikroorganizma ölmektedir. Fakat *C. perfringens* sporları hayatta kalabilmektedir (García ve Heredia, 2011). Pişirme sonrasında pişmiş yiyecekler 12-50°C sıcaklık arasında tutulursa hayatta kalmış olan sporlar çimlenebilmekte ve vejetatif hücreler çoğalabilmektedir. Yiyecekler tüketildiğinde mide asidinden bazı vejetatif hücre ve sporlar canlı olarak bağırsağa ulaşabilmekte ve çoğalıp toksin oluşturarak gastroenterite neden olabilmektedir (Lund ve Peck, 2015). Bu konuda yapılan çalışmalarda, sporların 71°C ve üzeri sıcaklıkta ısıtılmasında hayatta kalabildiği belirlenmiştir (Grant vd., 2008; Sarker vd., 2000).

### **2.5.1. Et ve Et Ürünlerinde *C. perfringens* Varlığı**

Anaerobik bakteri olan *C. perfringens* hayvanların bağırsaklarında normal bir şekilde bulunan, spor oluşturabilen patojenik bir bakteri olarak bilinmektedir. Bağırsaklardaki bakteri popülasyonu belirli bir yoğunluğa ulaştığında toksin üretimi tetiklenmekte ve bu durumda yaygın gıda kaynaklı hastalıklardan birisi olarak ortaya çıkmaktadır (Sawires ve Songer, 2006). Et ve et ürünlerinde *C. perfringens* varlığı konusunda yapılan araştırmalar sonucunda tavuk etinde (Nowell vd., 2010; Hamad vd.,

2020; Jang vd., 2020), tavuk karaciğerinde (Cooper vd., 2013), tavuğun farklı etlerinde (göğüs, but, baget ve kanat bölgesi) (Güran ve Öksüztepe, 2013; Yıldırım vd., 2015), çiğ sığır eti (Öncül ve Yıldırım, 2019) gibi et ve et ürünlerinde varlığı araştırılmış ve değişen oranlarda tespit edilmiştir.

Japonya’da et ve et ürünlerinde *C. perfringens* varlığı araştırılan bir çalışmada sığır etinde %45,7 (16/35), dana kıymada %81,8 (18/22), tavuk kıymasında %100 (22/22), domuz etinde %81,0 (17/21) ve kıyılmış dana domuz karışımında ise %952 (20/21) oranında *C. perfringens* varlığı saptanmıştır (Miki vd., 2008).

Ülkemizde Ankara’daki farklı süpermarketlerden alınan 180 hindi eti örneğinde 22 adet *C. perfringens* tespit edilmiştir. Tespit edilen *C. perfringens* izolatları multipleks PCR kullanılarak, alfa (*cpa*), beta (*cpb*), beta 2 (*cpb2*), epsilon (*etx*), iota (*iA*) ve enterotoksin (*cpe*) toksin genlerinin varlığı açısından analiz edilmiştir. *C. perfringens* izolatlarının tamamında *cpa* (A tipi) bulunmuştur. İzolatlarda *cpb*, *etx*, *iA* veya *cpe* toksin genlerinin saptanmadığı belirtilmiştir (Erol vd., 2008).

Bu konuda yapılan araştırmalardan birinde, Kanada’da çiğ tavuk eti ve dondurulmuş tavuk etlerinde *C. perfringens* varlığına bakılmıştır. Araştırma sonucunda tavuk etinde %66 (42/64) oranında ve dondurulmuş olan tavuk etinde ise %67 (16/24) oranında *C. perfringens* varlığı tespit edildiği bildirilmiştir (Nowell vd., 2010). ABD’de yapılan başka bir çalışmada ise tavuk karaciğerinde %69,6 (16/23) oranında *C. perfringens* varlığı saptanmıştır (Cooper vd., 2013). Mısır’da yapılan bir çalışmada kıyma, sosise ve dana burgerde *C. perfringens* varlığı sırasıyla %16,67, %23,33, %16,67 olarak saptanmıştır (Tawab vd., 2015).

Tavuk eti kısımlarında (göğüs, kanat, baget ve but bölgesi) *Clostridium perfringens* varlığının kültür yöntemleriyle araştırılması ve toksin genlerinin saptanmasıyla ilgili bir çalışmada, her tavuk eti (göğüs, kanat, baget ve but) örneğinden 50’şer adet temin edilmiştir. Kanat örneklerinin %94’ü (47/50), but örneklerinin %80’i (40/50), baget örneklerinin %66’sı (34/50) ve tavukgöğüsü örneklerinin %66’sında (33/50) *C. perfringens* saptanmıştır. Tavuk örneklerinden alınan izolatların *cpa* toksin geni (Tip A) taşıdığı belirlenmiştir (Güran ve Öksüztepe, 2013).

Güney Kore’de tavuk ve sığır etinde *C. perfringens* varlığı üzerine yapılan çalışmada, sığır etinden %10 (5/50), tavuk etinden ise %33 (33/100) oranında *C.*

*perfringens* izole edildiği bildirilmiştir. Elde edilen izolatların toksin türüne bakıldığında tüm izolatların A tipi toksin içerdiği ve alfa (*cpa*) toksin genine sahip oldukları belirlenmiştir. Elde edilen 38 izolatın antibiyotik direnç profilleri araştırılmış ve ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, metronidazol ve imipenem antibiyotikleri arasında izolatların en çok tetrasiklin ve imipeneme karşı dirençli olduğu belirlenmiştir (Jang vd., 2020).

Fildişi sahilinde sokakta pişmiş olarak satışa sunulan böbrek ve sığır etinde *C. perfringens* varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada sığır eti örneklerinin %7,17'sinde ve böbrek örneklerinin %2,32'sinde *C. perfringens* izole edilmiştir. Toplamda 395 örneğin 20'sinde (%5,06) *C. perfringens* varlığı belirlenmiştir. Elde edilen 20 *C. perfringens* izolatı API 20A ve PCR ile tanımlanmış olup bu izolatların disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç profili belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre tüm izolatlar vankomisine karşı duyarlıyken 1 adet izolat penisiline ve 1 adet izolatın da ampisiline karşı dirençli olduğu gözlemlenmiştir (Kouassi vd., 2014).

Yapılan bu çalışmalar sokak yemeklerinin işleme veya satış sırasında çevreden gelebilecek olan kontaminasyona açık olduğunu ve tüketici sağlığı açısından risk oluşturabileceğini ortaya koymaktadır.

## **2.6. Hayvan Dışkısında *C. difficile* ve *C. perfringens* Varlığı**

Anaerobik mikroorganizma olan *C. difficile* ve *C. perfringens*; toprak, su, gıda ve hayvan dışkılarında bulunmaktadır. *C. perfringens* özellikle hayvanların bağırsaklarında yaygın olarak bulunmaktadır. *C. difficile* ve *C. perfringens*'in bağırsaklarda çoğalmasının nedenleri ise; hayvanlara verilen yemlerin kontamine olması, silajların yanlış bir şekilde fermente edilmesi, uygulanan antibiyotik tedavisidir (Gurjar vd., 2008). *Clostridiaceae* familyasından olan bu iki anaerobik ve sporlu bakterinin neden olduğu enfeksiyon hayvanlardan insanlara dolaylı yoldan bulaşabilmektedir. *C. perfringens* ve *C. difficile* bağırsakta çoğalır ve dışarı dışkı yoluyla atıldığından dolayı kesim sırasında hayvanların dokusuna da bulaşabilmektedir (Manteca vd., 2001; Songer, 2010).

Hayvan dışkıları ile ilgili yapılmış olan birçok araştırma bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesinde Avustralya'da koyun ve kuzu dışkılarından örnekler alınıp incelenmiştir. Küçükbaş hayvanlar olan kuzu ve koyunların dışkılarında *C. difficile*'ye rastlanılmıştır. *C. difficile* 156 koyun dışkısı örneğinden 1'inden ve 215 kuzu dışkısı örneğinin ise 14'ünden izole edilmiştir. Küçükbaş hayvanların bağırsaklarından elde edilen 15 adet *C. difficile*

izolatının 14'ü (%93,3) toksin A ve toksin B pozitif çıkmıştır. Bu çalışmada koyunlara göre kuzularda daha yüksek miktarda *C. difficile* saptandığı görülmüştür (Knight ve Riley, 2013). Farklı hayvan türlerinden alınan örneklerin değerlendirildiği birkaç çalışma Tablo 1'de verilmiştir.



Tablo 1

Hayvan dışkısında *C. difficile* ve *C. perfringens* varlığı

Örnek Türü	Ülke	Mikroorganizma	Bulunma Sıklığı	Referans
Süt İneği Dışkısı	ABD	<i>C. perfringens</i>	17/20 (%8.5)	(Dennison vd., 2002)
Domuz Dışkısı	İspanya	<i>C. perfringens</i> ( $\alpha$ -toksin)	152/215 (%71)	
		<i>C. difficile</i> (TcdA)	62/215 (%28.9)	(Vidal vd., 2019)
Domuz Dışkısı	İspanya	<i>C. difficile</i> (TcdB)	73/215 (%34)	
		<i>C. difficile</i> (TcdA/TcdB)	48/215 (%22.3)	
		<i>C. perfringens</i> ( $\beta$ 2-toksin)	164/241 (%68)	
Sığır Dışkısı	ABD	<i>C. perfringens</i> ( $\alpha$ -toksin)	68/241 (%28.2)	(Gurjar vd., 2008)
Manda Dışkısı			65/170 (%38.2)	
Sığır Dışkısı	Hindistan	<i>C. perfringens</i>	194/512 (%37.9)	(Athira vd., 2018)
Keçi Dışkısı	Slovenya	<i>C. difficile</i>	10/109 (%9.2)	(Avberšek vd., 2014)
Koyun Dışkısı			6/105 (%5.7)	
Koyun Dışkısı			2/11 (%18.2)	
Sığır Dışkısı			7/205 (%3.4)	
Domuz Dışkısı	Hollanda	<i>C. difficile</i>	9/136 (%6.6)	(Koene vd., 2012)
Dana Buzağı Dışkısı			6/100 (%6)	
Buzağı Dışkısı			1/56 (%1.8)	
Domuz Dışkısı	Slovenya	<i>C. difficile</i>	133/257 (%51.8)	(Pirs vd., 2008)
Sığır Dışkısı	Belçika	<i>C. difficile</i>	18/220 (%8.2)	(Rodriguez vd., 2012)
Domuz Dışkısı			18/217 (%8.3)	
Koyun Dışkısı	Avustralya	<i>C. difficile</i>	1/156 (%0.6)	(Knight ve Riley, 2013)
Kuzu Dışkısı			14/215 (%6.5)	



Türkiye'nin Kayseri ilinde yapılan çalışmada, 100 sığır dışkısında, 100 sığır karkas yüzey sürüntü örneklerinde, 10 çalışma tablası ve bıçak yüzeylerinde ve 10 adet atık su örneğinde *C. difficile* araştırılmıştır. Toplam 220 örneğin 12'sinde (%5) *C. difficile* tespit edildiği belirtilmiştir. Elde edilen izolatların tamamının toksin A (*tcdA*) ve toksin B (*tcdB*) açısından pozitif olduğu belirlenmiştir. İzolatların disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç profili belirlenmiş olup amoksisilin-klavulanik asit (AMC), ampisilin (AMP), seftazidim (CAZ), siprofloksasin (CIP), klindamisin (DA), levofloksasin (LEV), penisilin (P), tetrasiklin (TE) marbofloksasin (MAR), metronidazol (MTZ), meropenem (MEM) ve vankomisin (VA) antibiyotikleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ise *C. difficile* izolatlarının tamamının AMC , AMP , MEM , MTZ , P, TE ve VA'ya duyarlı, CIP ve LEV'ye dirençli bulunduğu belirtilmiştir (Abay vd., 2022).

Hayvan dışkılarında *C. difficile* varlığı araştırılan bir çalışmada, domuz, sığır, tavuk, koyun, at, kedi, köpek ve tavşanların dışkıları analize alınmıştır. Toplam olarak 559 hayvan dışkısı örneği değerlendirilmiştir. Domuz dışkısında %15 (25/168), sığır dışkısında %4 (10/227), atların dışkısında %14 (7/50), kedilerin dışkısında %10 (5/48) ve köpeklerin dışkısında %8 (4/49) oranında *C. difficile* izole edildiği belirtilmiştir. Ancak tavuk, koyun ve tavşanların dışkılarında *C. difficile* saptanmamıştır. Toplamda 559 hayvan dışkısı örneklerinden 51'inde *C. difficile*'ye rastlanılmıştır (Shaughnessy vd., 2018).

Ülkemizde hayvan dışkılarında *C. difficile* varlığının araştırıldığı başka bir çalışmada ise, yenidoğan buzağılardan, kuzulardan, oğlaklardan ve tavuklardan 50'şer adet dışkı örneği *C. difficile* varlığı açısından analize alınmıştır. Buzağılardan alınan dışkı örneklerinin %70'inden (35/50), kuzulardan alınan dışkı örneklerinin %30'undan (15/50), oğlaklardan alınan dışkı örneklerinin %14'ünden (7/50) ve tavuklardan alınan dışkı örneklerinin %2'sinden (1/50) *C. difficile* varlığı saptanmıştır. Farklı hayvanların dışkılarında alınan 200 adet örneğin 58'inde (%29) *C. difficile* varlığı belirlenmiştir. *C. difficile* olduğu belirlenen örnekler toksinojenik gen açısından değerlendirildiğinde 58 örneğin 28'inde (%48) toksin gen varlığı saptanmıştır. Buzağılardan alınan 22 adet toksin pozitif örneğin 10'u toksin A, toksin B ve binary toksin varlığı açısından pozitif bulunurken, 12'sinin ise toksin B pozitif olarak belirlenmiştir. Kuzu dışkı örneklerinden belirlenen 6 toksin pozitif örneğin 5'i binary toksin pozitif bulunurken birinde toksin B pozitif saptanmıştır. Oğlak ve tavuklardan alınan dışkı örneklerinde ise toksinojenik gen varlığının belirlenmediği bildirilmiştir (Özgen ve Yıldırım, 2021).

Yapılan alışmalar sonucunda kolonize veya enfekte çiftlik hayvanlarının dışkılarıyla gıda kontaminasyonun, *C. difficile*'nin gıda zinciri yoluyla hayvanlardan insanlara bulaşma yollarından biri olabileceği ihtimalini kuvvetlendirmektedir (Taha, 2021). Ayrıca kokorecin özellikle kuzu, koyun vb. gibi kkbaş hayvanların bağırsağından üretiliyor olmasında bu geçişte kokorecinde etkin olabileceğini ortaya koymaktadır.

## 2.7. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Kapasiteleri

Gelişmelerini etkileyecek tehditlere karşı mikroorganizmalar, biyofilm adı verilen özel yapılar üretebilmektedir. Mikroorganizmaların birbirine tutunmasına izin veren ve hücre dışı matris üreten bir yüzeyde gelişen bakteri çoğunluğu biyofilm olarak adlandırılmaktadır (Hall-Stoodley vd., 2004). Bakterilerin oluşturduğu üç boyutlu yapılar olarak bilinen biyofilmler, bakterilerin uzun süre hayatta kalabilmesini sağlayabilmektedir. Bağırsakta bakteriler tarafından oluşan biyofilmler, bağırsağın epitel yüzeyine yakın mukus tabakasında (Macfarlane vd., 2005) veya bağırsak kanalında bulunan besinler üzerinde bulunabilmektedir (Sharp ve Macfarlane, 2000). Bağırsak florasında anaerob koşullar nedeniyle *Clostridium* türleri tarafından biyofilm oluşabilmektedir (Crowther vd., 2014). Bağırsakta oluşmuş biyofilmlere tutunan *C. difficile*, antibiyotiklerin baskısından korunmak için kendine ortam yaratmakta ve aynı zamanda bağırsaktaki varlığını koruyarak enfeksiyonun tekrarını da teşvik edebilmektedir (Vuotto vd., 2018). *Clostridium* türlerinin oluşturdukları biyofilmlerin uygulanan hijyen koşullarına karşı direnç oluşturdukları bildirilmiştir (Candel-Prez vd., 2019).

Bakterilerin birçoğu evre koşullarında hayatta kalabilmek için biyofilm üretebilme kapasitesini geliştirmektedir (Davey ve O'Toole, 2000; Jefferson, 2004). Biyofilm oluşturarak bakteriler, genellikle süspansiyon halinde bulunarak katı yüzeylere tutunabilmektedir. Ayrıca biyofilm oluşturarak fiziksel ve çevresel streslere karşı direnç gösterebilmektedir (Davey ve O'Toole, 2000, Davies, 2003, Hall-Stoodley ve Stoodley, 2009). Donelli vd., (2012)'nin yaptığı çalışmada, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri araştırılmıştır. Gram pozitif bakterilerden olan *C. perfringens*, *C. fallax*, *C. baratii*, *C. bifermentans* ve *Finegoldia magna* suşlarının güçlü biyofilm oluşturduğu ancak *C. difficile* suşunun orta derecede biyofilm oluşturduğu belirtilmiştir. *C. perfringens* tarafından oluşturulan biyofilmin incelendiği diğer bir

çalışmada, biyofilm oluşturan *C. perfringens* hücrelerinin atmosferik oksijene, yüksek konsantrasyondaki antibiyotik çeşitlerine ve antikoksidial ajanlara maruz kaldığında hayatta kalabildiği belirtilmiştir (Charlebois vd., 2014).

Biyofilm oluşturan hücrelerin çoğunun vejetatif formda olduğu bilinmektedir. Ancak biyofilm oluşumu sırasında ve biyofilmin kalıcılığı sırasında spor oluşturan bakterilerde sporlanma olabilmektedir (Đapa vd., 2013). Farklı *C. perfringens* suşlarının (TYJAM-D-66 ( cpe +), CMM-C-80 ( cpe -) ve SDE-B-202 ( cpe +)) biyofilm oluşumu sırasında zamanla spor oluşturma yeteneklerinin ve biyofilm oluşumu sonrasında dezenfektan ve oksidatif strese karşı dirençlerinin araştırıldığı çalışmada, *C. perfringens* suşlarının güçlü biyofilm oluşturdıkları gözlemlenmiştir. *C. perfringens* suşları arasındaki biyofilm oluşturma yetenekleri benzer oranda olmasına rağmen oksijen toleranslarının suşlar arasında farklılık gösterdiği belirtilmiştir. *C. perfringens*'in enterotoksin içeren suşu olan TYJAM-D-66'nın, sodyum hipoklorite (NaClO) karşı hayatta kalma oranının yüksek olduğu bildirilmiştir. Sodyum hipoklorit, gıda endüstrisinde ve yemek servis edilen işletmelerde en çok tercih edilen dezenfektanlardan birisi olmasına rağmen, *C. perfringens* gibi sporlu bakteriler üzerinde kullanıldığında etkisinin düşük olması risk oluşturabilmektedir (Hu vd., 2021).

## **2.8. *Salmonella* spp.**

*Enterobacteriaceae* familyasında bulunan Gram negatif, spor oluşturmeyan fakültatif anaerob ve çubuk formunda bir bakteri olan *Salmonella*, insan vücuduna alındığında enterik ateşe ve gastroenterite neden olmaktadır (Asal Ulus, 2021). Theobald Smith tarafından klasik domuz ateşi ile enfekte olmuş domuzların bağırsaklarından ilk olarak 1855'te keşfedilip izole edildiği belirtilmiştir. 2500'den fazla serotipi bulunan *Salmonella* adını patolog olan Dr. Daniel Elmer Salmon'dan aldığı bilinmektedir (Eng vd., 2015).

*Salmonella* Bongori ve *Salmonella* Enterica olarak iki türe ayrılmaktadır. *Salmonella* Bongori'nin alt türü olmayıp *Salmonella* Enterica ise *Salmonella enterica* subsp. Salamae, *Salmonella enterica* subsp. Arizonae, *Salmonella enterica* subsp. Enterica, *Salmonella enterica* subsp. Diarizonae, *Salmonella enterica* subsp. Houtanae, *Salmonella enterica* subsp. Bongoriv, *Salmonella enterica* subsp. İndica olmak üzere 7 alt türe ayrılmaktadır (Brenner vd., 2000).

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gıda kaynaklı hastalıklar, halk sağlığı ve küresel ekonomi için kabul edilemez bir tehdit oluşturmaktadır. Gıda kaynaklı patojenik bakterilerden biri olan *Salmonella*'nın, Dünya'da birçok kişinin ölümüne ve hastalığa yakalanmasına neden olduğu bilinmektedir (Shen vd., 2021; EFSA, 2010). *Salmonella* Typhimurium'un gıda hayvanları (kümes hayvanları, domuz, koyun ve sığır) ile ilişkiliyken, *Salmonella* Enteritidis'in ise genellikle yumurta ve kümes hayvanları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Carrasco vd., 2012). Ayrıca diğer önemli bir tür olan *Salmonella* Paratyphi'nin bulaşma yollarından birinin de sokakta satılan sokak yemeklerinin tüketilmesi olduğu ifade edilmektedir (Crump ve Mintz, 2010).

*Salmonella* spp.'nin gıda güvenliği ve halk sağlığı bakımından önemli bir patojen olduğu bilinmekte olup, bu bakterinin en fazla toprak, hayvan dışkı, su, fabrika yüzeyleri, çiğ et, çiğ deniz ürünleri ve mutfak yüzeylerinden bulaştığı bildirilmiştir (FDA, 2013). Gıdalarda saklama sıcaklığının yetersiz olması, pişirme işleminin yetersiz olması ve çapraz bulaşma ihtimali salmonelloz salgınlarına neden olabilmektedir (Ryan vd., 1996; Todd, 1997). *Salmonella*'nın ana bulaşma yollarından birinin, dışkı ile kontaminasyona uğramış hayvansal kaynaklı gıdalar olduğu bilinmekte olup, enfekte olmuş hayvanlardan elde edilen etlerde de bulaşma olduğu görülmüştür (Benenson, 1995; Haeghebaert vd., 2003). Yapılan araştırmalar sonucunda et ve et ürünlerinde *Salmonella*'nın varlığına sık rastlandığı, ayrıca kümes hayvanları, ve yumurtaların *Salmonella* ile bulaşmış olabileceği ve bulaşıcı hastalıklara yol açabildiği bilinmektedir (Wilson, 2002; Capita vd., 2003). Ek olarak süt ve süt ürünleri (Gebeyehu vd., 2022; Garbaj vd., 2022), deniz ürünleri (Yang vd., 2022), meyve ve sebzelerde de (Toe vd., 2022; Cao vd., 2023; Sarré vd., 2023) *Salmonella*'ya rastlanıldığı bildirilmiştir.

Balıkesir'de yapılan bir çalışmada market ve restoranlardan temin edilen tüketime hazır gıdalarda (kavurma, et ve tavuk döner, sucuk, peynir, hoşmerim, helva, rus salatası, sebze salatası) *Salmonella* spp. varlığı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda tavuk dönerde %3,3 oranında (1/30), kavurmada %10 oranında (1/10) ve helvada %6,6 oranında (1/15) *Salmonella* spp. varlığı belirlenmiştir. Diğer temin edilen ürünlerde *Salmonella*'ya rastlanılmamıştır. Özellikle tüketime hazır olarak satışa sunulan gıdalarda *Salmonella* spp. gibi patojen bakterilerin var olmasının tüketici sağlığı ve gıda güvenliği bakımından risk teşkil ettiği belirtilmiştir. Tüketime hazır gıdaların üretiminde uygulanan ısı işleminin

yetersiz oluşu ve ürünlerin proses sonrasında oluşabilecek kontamine olma ihtimalinin halk sağlığı açısından tehdit oluşturduğu bildirilmiştir (Gökmen vd., 2016).

Mezbahalarda karkasların kesim sırasında, iç organların çıkarılmasında ve parçalanması sırasında *Salmonella* ile kontamine olabildiği ve hayvan karkaslarından, bağırsaklarından *Salmonella* izole edildiği bildirilmiştir (Küplülü, 1999). Amasya’da market ve kasaplardan 50 adet sığır kıyması ve 50 adet sığır hazır köfte örnekleri temin edilmiştir. Temin edilen toplam 100 örnekte *Salmonella* varlığının araştırıldığı belirtilmiştir. Araştırma sonucunda sığır kıymasında 4 adet pozitif örnek (%8) bulunurken, sığiretinden elde edilen köftede ise 2 adet pozitif örnek (%4) saptandığı bildirilmiştir (Yıldırım vd., 2016). Başka bir çalışmada, İstanbul’da döner servisi yapan lokanta ve büfelerden 30 pişmiş tavuk döner temin edilmiştir. Pişmiş tavuk dönerlerden 1 tanesi *Salmonella* spp. pozitif olarak belirlenmiş olup API 20E test kiti sonucunda *Salmonella* Arizonae suşu olduğunu tespit etmişlerdir (Ünver Alçay, 2019).

Gıdalarda *Salmonella* varlığı, tüketicilerin sağlığı ve gıdaların güvenliği açısından risk oluşturabilmektedir. Tüketime hazır gıdalar *Salmonella* içermemelidir (Anonim, 2022). Bu durumda personel ve gıdaların hazırlandığı ortamın hijyen ve sanitasyon koşullarına uygunluğu oldukça önemlidir.

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

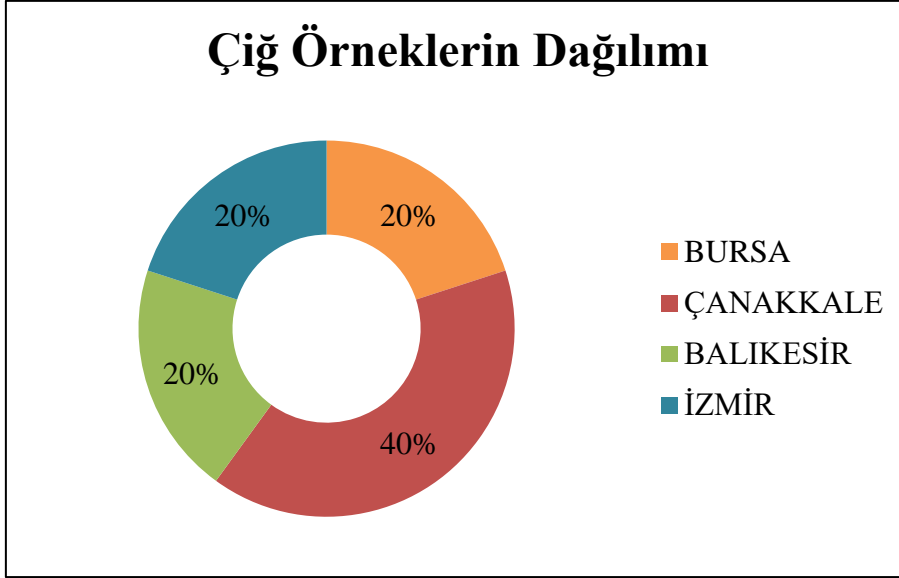
Çalışmamızda kokoreç örnekleri Çanakkale, Bursa, İzmir ve Balıkesir illerinden farklı işletmeler ve kasaplardan temin edilmiştir. Toplam 52 adet farklı işletmeden kokoreç örneği alınmıştır (Tablo 2). Her bir kokoreç örneği soğuk zincir altında hızlı bir şekilde laboratuvara taşınmıştır. Tüm kokoreç örnekleri aynı gün içerisinde paralelli olarak analize alınmıştır. Toplamda 140 adet kokoreç örneği incelenmiştir.

Tablo 2

Kokoreç örneklerinin temin edildiği bölgeler

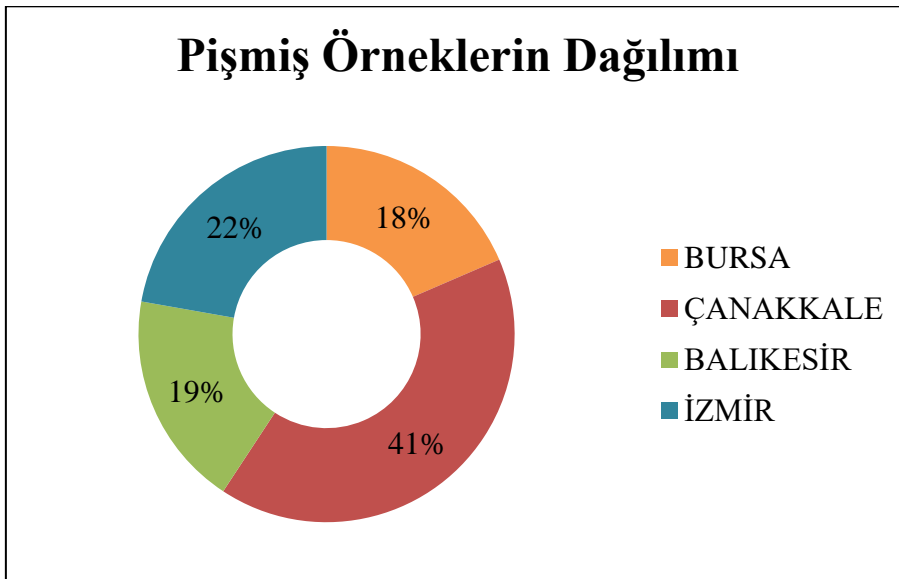
Örnek Kodu	Örnek Türü	Alındığı Yer	Örnek Kodu	Örnek Türü	Alındığı Yer
1	Çiğ	Çanakkale	27	Pişmiş	Balıkesir
2	Çiğ	Çanakkale	28	Çiğ	Balıkesir
3	Pişmiş	Çanakkale	29	Çiğ	Balıkesir
4	Çiğ	Çanakkale	30	Çiğ	Balıkesir
5	Çiğ	Çanakkale	31	Çiğ	Balıkesir
6	Pişmiş	Çanakkale	32	Çiğ	Balıkesir
7	Pişmiş	Çanakkale	33	Pişmiş	İzmir
8	Pişmiş	Çanakkale	34	Pişmiş	İzmir
9	Pişmiş	Bursa	35	Pişmiş	İzmir
10	Pişmiş	Bursa	36	Pişmiş	İzmir
11	Pişmiş	Bursa	37	Çiğ	İzmir
12	Pişmiş	Bursa	38	Çiğ	İzmir
13	Pişmiş	Bursa	39	Çiğ	İzmir
14	Pişmiş	İzmir	40	Çiğ	Çanakkale
15	Çiğ	İzmir	41	Çiğ	Çanakkale
16	Çiğ	İzmir	42	Çiğ	Çanakkale
17	Pişmiş	İzmir	43	Pişmiş	Çanakkale
18	Pişmiş	Balıkesir	44	Pişmiş	Çanakkale
19	Pişmiş	Balıkesir	45	Çiğ	Çanakkale
20	Pişmiş	Balıkesir	46	Çiğ	Çanakkale
21	Çiğ	Bursa	47	Pişmiş	Çanakkale
22	Çiğ	Bursa	48	Pişmiş	Çanakkale
23	Çiğ	Bursa	49	Çiğ	Çanakkale
24	Çiğ	Bursa	50	Pişmiş	Çanakkale
25	Çiğ	Bursa	51	Pişmiş	Çanakkale
26	Pişmiş	Balıkesir	52	Pişmiş	Çanakkale

Farklı şehirlerden ve farklı kasaplardan temin edilen çiğ kokoreç örneklerinin şehirlere göre dağılımı Şekil 1’de ayrıntılı şekilde belirtilmiştir.



Şekil 1. Çiğ kokoreç örneklerinin şehirlere göre yüzdelik dağılımı

Farklı şehirlerden ve farklı kokoreç işletmelerinden temin edilen pişmiş kokoreç örneklerinin şehirlere göre dağılımı Şekil 2’de ayrıntılı şekilde belirtilmiştir.



Şekil 2. Pişmiş kokoreç örneklerinin şehirlere göre yüzdelik dağılımı

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Laboratuvara getirilen kokoreç örneklerinden steril bıçak ile aseptik şartlar altında numune alınmıştır. TAMB, küf/maya, *B. cereus*, *S. aureus*, sülfid indirgeyen anaerobik bakteriler, toplam koliform ve *E. coli* analizleri için 10 gram kokoreç örneği üzerine 90 mL %0,85'lik serum fizyolojik aktarılmış ve örnekler stomacher cihazında (İnterscience BagMixer® 400P, Fransa) homojenize edilmiştir. Elde edilen dilüsyonlardan  $10^{-9}$ 'a kadar desimal dilüsyonlar hazırlanmış olup ekimler yapılmıştır. *C. difficile* varlığı için 15 gram kokoreç örneği üzerine ise 30 mL CDEB zenginleştirme sıvısı aktarılmıştır. *Salmonella* varlığının araştırılması için 25 gram kokoreç örneği ve üzerine 225 mL tamponlanmış peptonlu su (Buffered Peptone Water, Oxoid, İngiltere) eklenip stomacher cihazında 60 saniye boyunca homojenize edilmiştir.

### 3.2.2. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB) Sayısının Belirlenmesi

Kokoreç örneklerinin hazırlanması işlemi “3.2.1. Örneklerin Hazırlanması” bölümünde açıklandığı şekilde analize hazırlanmıştır. Elde edilen  $10^{-1}$ 'lik dilüsyondan %0,85'lik serum fizyolojik kullanılarak  $10^{-9}$ 'a kadar desimal dilüsyonlar hazırlanmış olup Plate Count Agar'a (PCA, Merck, Almanya) ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petripler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerinde 30-300 koloni oluşturan petripler sayılarak kokoreç örneğindeki toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı belirlenmiştir (Efe ve Gümüşsoy, 2005).

### 3.2.3. Küf ve Maya Sayısının Belirlenmesi

Kokoreç örneklerinin maya ve küf yükünün belirlenmesi amacıyla %0,85'lik serum fizyolojik kullanılarak  $10^{-9}$ 'a kadar desimal dilüsyonlardan Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar (Merck, Almanya) besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petripler  $25^{\circ}\text{C}$ 'de 3-5 gün inkübasyona bırakılarak kokoreç örneklerindeki maya ve küf sayısı belirlenmiştir (Önen, 2020).



### 3.2.4. Toplam Koliform ve *E. coli* Analizi

Temin edilen kokoreç örneklerinde toplam koliform ve *E. coli* varlığının araştırılması amacıyla %0,85'lik serum fizyolojik kullanılarak hazırlanan desimal dilüsyonlardan Chromocult Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) Agar (Merck, Almanya) besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petripler 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişen mavimsi yeşil renkli koloniler *E. coli*, *E. coli* dışındaki renksiz koloniler ise toplam koliform olarak belirlenmiştir (Çevik Telekoğlu, 2019).

### 3.2.5. *Staphylococcus aureus* Aranması ve Doğrulanması

Temin edilen kokoreç örneklerinde *S. aureus* varlığının araştırılması amacıyla %0.85'lik serum fizyolojik kullanılarak hazırlanan desimal dilüsyonlardan %1 potasyum tellürit (Merck, Almanya) ve yumurta sarısı katkılı Baird Parker Agar (BPA, Merck, Almanya) besiyerine ekim yapılmış olup petripler 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kenarlarında ince beyaz presipitasyon halkası ve temiz zon oluşturan siyah koloniler sayılmıştır (Kılınç vd., 2018; Ünlütürk ve Turantaş, 2015).

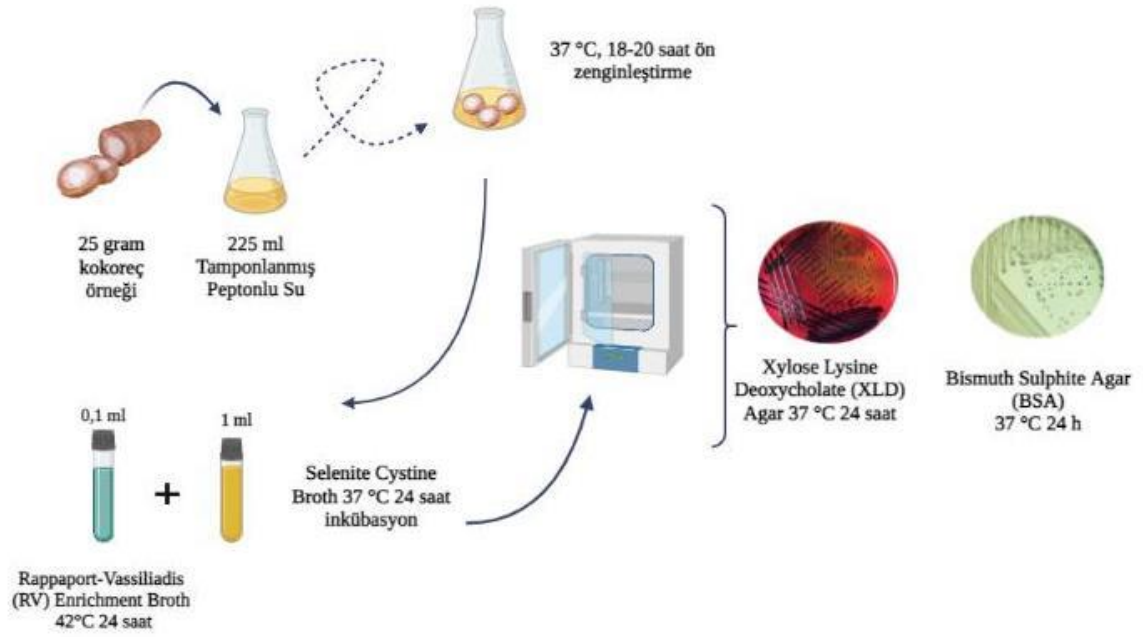
Presipitasyon zonu ve tipik siyah koloni oluşturan izolatlar koagülaz testi uygulanmıştır. Belirlenen izolatlar Nutrient Agar'da (Merck, Almanya) 35-37°C'de 24-48 saatte aktif kültür haline getirilmiş olup koagülaz testinde lam yöntemi kullanılmıştır. Lam yönteminde tavşan plazması (Mediko Kimya, Türkiye) ve aktif kültür öze ile karıştırılmış olup pıhtı oluşumu gözlenen izolatlar pozitif, pıhtı oluşumu gözlenmeyen izolatlar negatif olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol için *S. aureus* ATCC 25923 kullanılırken negatif kontrol için de serum fizyolojik (%0.85 NaCl) kullanılmıştır. Koagülaz testi tüp yöntemi için belirlenmiş izolatlar Brain Heart Infusion Broth (Himedia, Hindistan) besiyerine inoküle edilerek 35-37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Test tüplerine 0,5 mL tavşan plazması eklenmiş ve üzerine 0,5 mL BHI Broth'da hazırlanmış aktif kültür ilave edilerek 35-37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Kültür ilave edilmeyen tüp negatif kontrol olarak belirlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür negatif reaksiyon verirse ek olarak 24 saat inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüplerde koagülüm oluşması (pıhtı oluşumu) gözlenirse kültürün koagülaz pozitif olduğunu göstermektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 2015).

### 3.2.6. *Bacillus spp.* Varlığının Belirlenmesi

Serum fizyolojik (%0,85) kullanılarak  $10^{-9}$ 'a kadar hazırlanmış olan desimal dilüsyonlardan HiCrome *Bacillus* Agar besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılmış olan petripler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan merkezi koyu mavi koloniler muhtemel *Bacillus cereus*, açık mavi koloniler muhtemel *Bacillus thuringiensis*, yeşil koloniler *Bacillus subtilis*, sarı koloniler muhtemel *Bacillus megaterium* kabul edilerek sayım yapılmıştır (Aruwa ve Akinyoso, 2015).

### 3.2.7. *Salmonella* Varlığının Belirlenmesi

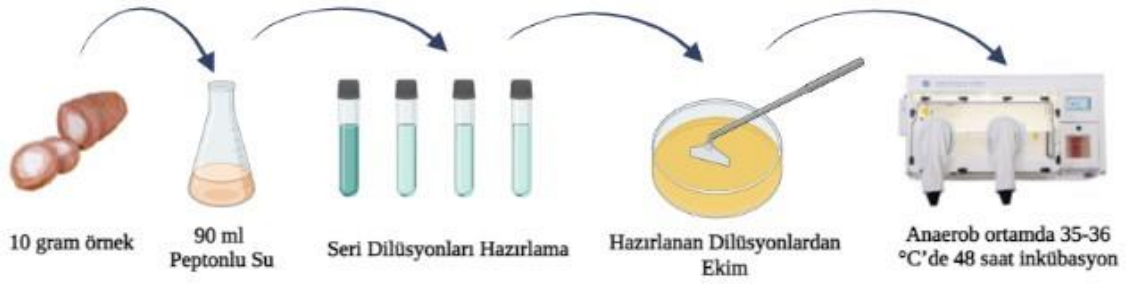
Kokoreç numunelerinde *Salmonella* aranması ISO 6579-1 prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Seçici olmayan ön zenginleştirme için kokoreç örneğinden 25 gram tartılıp üzerine 225 mL Tamponlanmış peptonlu su (Buffered Peptone Water, Oxoid, İngiltere) eklenmiştir. Ön zenginleştirme için 18-20 saat,  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra seçici zenginleştirme için 10 mL Selenite Cystine Broth'a (Oxoid, İngiltere) 1 mL ve 10 mL Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth'a (Oxoid, İngiltere) 0,1 mL ön zenginleştirme sıvısından eklenmiştir. Ekim yapılan Selenite Cystine Broth besiyeri içeren tüpler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat, Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth ise  $42^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tüplerden seçici-ayırteci besiyerlerine tek düşürme yöntemi ile ekim yapılmıştır. Seçici-ayırteci besiyeri için Xylose Lysine Deoxycholate (XLD, Oxoid, İngiltere) Agar ve Bismuth Sulphite Agar (BSA, Merck, Almanya) kullanılmıştır. Ekim yapılan petripler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra belirlenen tipik *Salmonella* kolonilerine biyokimyasal testler yapılmıştır (ISO, 2017). Tipik *Salmonella* kolonileri Nutrient Agar (Oxoid, İngiltere) besiyerinde  $35-37^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübasyona bırakılarak aktif kültür haline getirilmiştir. Aktif hale getirilen kültür Triple Sugar Iron Agar (Oxoid, İngiltere) ve Lysine Iron Agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine iğne öze ile çizme ve daldırma yöntemiyle inokülasyon yapılmıştır. *Salmonella* inoküle edilen tüpler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüplerdeki reaksiyonlar incelenerek pozitif sonuç veren kültürler belirlenmiştir (Ünlütürk ve Turantaş, 2015). Çiğ ve pişmiş kokoreç örneklerinde *Salmonella* izolasyonu için kullanılan yöntemin akış şeması Şekil 3'te açıklanmıştır.



Şekil 3. Kokoreç örneklerinde *Salmonella* izolasyonu

### 3.2.8. Sülfid İndirgeyen Anaerobik Bakterilerin Sayımı

10 gram kokoreç örneği 90 mL %0,85'lik serum fizyolojik bulunan stomacher torbasında homojenize edilmiştir. Hazırlanan dilüsyondan aynı dilüsyon sıvısı kullanılmış ve  $10^{-9}$ 'a kadar desimal dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan D-sikloserin (Neogen, ABD) ve yumurta sarısı katkılı Tryptose Sulphite Cycloserine Agar (Merck, Almanya, TSCA) besiyerine paralelli olarak ekim yapılmıştır. Besiyeri yüzeyi inokülümü absorbe ettikten sonra üzerine yumurta sarısı içermeyen TSCA besiyeri dökülüp anaerobik kabinde (Elektrotek 400TG, İngiltere) 35-37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda etrafında opak zon oluşan tipik siyah koloniler sayılmıştır (Ünlütürk ve Turantaş, 2015). Her petriden elde edilen kolonilerinin karekökü kadar seçilerek BHI Broth besiyerine izolat alınmıştır. İzolatlar -18°C'de gliserol eklenerek saklanmıştır. Safılaştırılan izolatlar gram boyama yapılarak Gram pozitif, kalın-kısa çubuk şeklinde olan izolatlar RAPID ID 32A hızlı tanı testi ile biyokimyasal olarak tanımlanmıştır. Çiğ ve pişmiş kokoreç örneklerinde sülfid indirgeyen anaerobik bakterilerin sayımı için kullanılan yöntemin akış şeması Şekil 4'te açıklanmıştır.

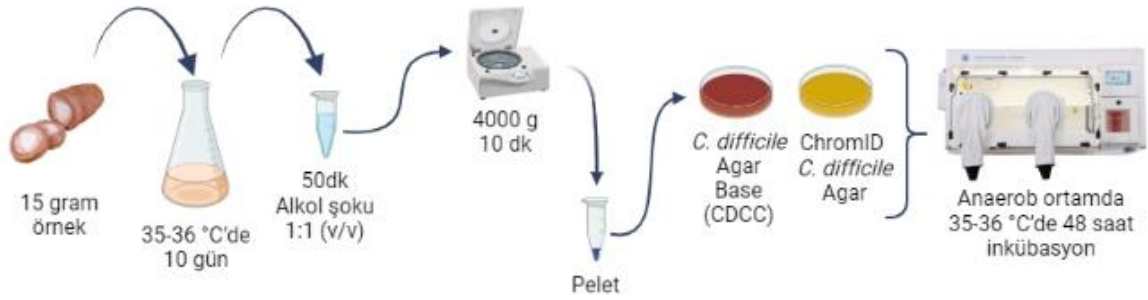


Şekil 4. Kokoreç örneklerinde sülfid indirgeyen anaerobik bakterilerin sayımı

### 3.2.9. *Clostridium (Clostridioides) difficile* Aranması

Çiğ ve pişirilmiş olarak alınan kokoreç numunelerinin *C. difficile* aranmasında Von Abercron vd., (2009) ve Norman vd., (2014)'nın yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. 15 gram örnek zenginleştirme besiyeri olan 30 mL *C. difficile* Enrichment Broth (CDEB)'da anaerob koşullarda ön zenginleştirme için 37°C'de 10 gün inkübasyona bırakılmıştır. CDEB besiyerinin içeriği oldukça zengin olup proteaz pepton (40 g/L, Oxoid, İngiltere), D-fruktoz (6 g/L, Merck, Almanya), disodyum fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g/L, İsolab, Almanya), mono potasyum fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L, Carlo Erba, Fransa), magnezyum sülfat (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g/L, Alfa aesar, Almanya), sodyum klorür (NaCl, 2 g/L, Merck, Almanya), taurokolik asit (Sodyum taurokolat, 1 g/L, Merck, Almanya) ve sefoksitin-sikloserin antibiyotik katkısı (Himedia, Hindistan, CC) içermektedir. İnkübasyon süresi sonunda vejetatif hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla ön zenginleştirme sıvılarına 1:1 oranında %96 etanol (v/v) ilave edilerek 50 dakika homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. 4000g'de 10 dk santrifüjün ardından ayrılan pelet PBS ile iki kez yıkanarak ChromID *C. difficile* Agar (Biomérieux, Fransa) ve %7 at kanı (GBL, Türkiye), sefoksitin-sikloserin antibiyotik katkısı (Himedia, Hindistan, CC), L-sistein (%0,1 Merck, Almanya), sodyum taurokolat (%0,1) ilaveli *C. difficile* Agar Base (Himedia, Hindistan) besiyerine inoküle edilmiştir. Petriler 35-36°C'de 24-48 saat anaerob şartlarda inkübe edilmiştir (Şekil 5). İnkübasyon sonunda ChromID besiyerinde tipik siyah renkli koloniler şüpheli *C. difficile* olarak değerlendirilirken, *C. difficile* Agar Base (CDCC) besiyerinde ise gri, opak ve hemoliz oluşturmeyen koloniler şüpheli *C. difficile* olarak değerlendirilmiştir. İzolatlar tanımlanmak için %0,5 Yeast Extract (Merck, Almanya) ve %0,1 L-cysteine (Merck, Almanya) katkılı Brain Heart Infusion Broth (Himedia, Hindistan) besiyeri içeren kriyo

tüplere stok alınarak -18°C’de saklanmıştır. *C. difficile* olduğu şüpheli izolatlar gram boyama yapılmıştır (Ersöz ve Coşansu, 2014). Gram pozitif ve çubuk şekilli izolatlar RAPID ID 32A hızlı tanı testi uygulanmıştır. Kokoreç numunelerinde *C. difficile* izolasyonu ile ilgili ayrıntılı bilgi Şekil 5’de belirtilmiştir.



Şekil 5. Kokoreç örneklerinden *C. difficile* izolasyonu

### 3.2.10. Sülfite İndirgeyen Anaerobik Bakteri ve Şüpheli *C. difficile* İzolatlarının RAPID ID 32A ile Tanımlanması

Kokoreçlerden elde edilen sülfite indirgeyen anaerobik bakteri ve şüpheli *C. difficile* izolatlarına gram boyama yapılarak sonucunda Gram pozitif ve çubuk şeklindeki izolatlar belirlenmiştir. Belirlenen izolatlar RAPID ID 32A hızlı tanı testi (Biomérieux, Fransa) üretici talimatlarına göre uygulanmıştır. Anaerobik koşullarda 35-36°C’de 24 saat aktif hale gelen kültürler talimatlara göre 4 McFarland’a ayarlanmıştır. Seyreltilmiş olan kültürlerden her kuyucuğa 55 µL kültür eklenmiş ve 4 saat 35-36°C’de aerob koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda API Web™ veritabanında (versiyon 1.3.0) sonuçlar değerlendirilmiştir.

Standart *C. perfringens* NCTC 8237 suşunun RAPID ID 32A ile görüntüsü Şekil 6’da verilmiştir.



Şekil 6. Standart *C. perfringens* NCTC 8237 suşunun RAPID ID 32A ile görüntüsü

### 3.2.11. *C. difficile* İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

#### DNA Ekstraksiyonu

Hızlı tanı testlerinden biri olan RAPID ID 32A testi sonucunda *C. difficile* olarak belirlenen izolatların gerçek zamanlı PCR’de (qPCR) doğrulanması için DNA ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Brain Heart Infusion Agar’da 37°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda aktif hale getirilen kültürlerden 1 öze dolusu alınmıştır. Dnase, rnase free olan ve içerisinde 1 mL Tris-EDTA (TE) Buffer (Sigma-Aldrich, ABD) bulunan santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüpleri kuru blok ısıtıcıda (ThermoFisher Scientific, ABD) 97°C’de 15 dakika kaynatılmıştır. Kaynatılan tüplere 16000g’de 10 dakika santrifüj (Hermle Z 326 K, Almanya) uygulanmıştır. Santrifüj süresi sonunda çöken pelet uzaklaştırılmış olup elde edilen DNA ekstraktları -18°C’de saklanmıştır (Rahimi vd., 2014).

#### *C. difficile* İzolatlarında *tpi* (trioz fosfat izomeraz) Gen Varlığının Belirlenmesi

İzolatlardan elde edilen DNA ekstraktlarındaki *C. difficile tpi* gen varlığı Heise vd., (2021)’nin yöntemine göre belirlenmiştir. Primer ve probalar (Eurofins Genomics, Avusturya), Mastermix (Roche, Almanya) ve plazmid (Genscript, ABD) üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır. İç amplifikasyon kontrolü olarak [CY5]AATCGGCCAACGCGCGG[BHQ2] probu *E. coli* plazmidini kullanılmıştır (Maurischat vd., 2015). Primer ve probaların nükleotid dizilimi Tablo 3’de verilmiştir. Primerler 5 pmol/µL ve probalar 2,5 pmol/µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan

karişımlar 96 kuyucuklu plaklara her birinde 15 µL olacak şekilde aktarılmıştır. İzolatlardan bir tanesi için gerekli olan karişım Tablo 4’de belirtilmiştir. Kuyucuklara 5 µL DNA ekstraktı eklendikten sonra plak üzerine sealing film (SSIbio, ABD) yapıştırılarak 2500 rpm’de 20 saniye spindown (Fisherbrand, ABD) ile homojenizasyon sağlanmıştır. Plak qPCR (BIO-RAD, CFX96 Real-Time System, C1000 Touch Thermal Cycler, ABD) haznesine yerleştirilerek süre, sıcaklık ve döngü sayıları aşağıda belirtilen adımlarda PCR’de yürütölmüştür. Standart suş olarak *C. difficile* ATCC 43593 ve *C. difficile* ATCC 1870 (Microbiologics, ABD) pozitif kontrol olarak kullanılmış olup negatif kontrol için PCR water kullanılmıştır. Sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerin oluşturdukları piklere göre değerlendirilmiştir.

Tablo 3

*C. difficile tpi* gen varlığının belirlenmesinde kullanılan plasmid, primer ve problar

<b>Nökleotid dizilimi (5-3)</b>	
<i>tpiR</i>	GGTCTATTCCTACTTCTAATGC
<i>tpiF</i>	GAAGCTACTAAGGGTACAAA
<i>tpi</i> prob	[HEX]ATAAGAGGTGAAACTTCTCCTGTAAATGCTCC[TAM]
Plasmid (F)	GTCGGGAAACCTGTCG
Plasmid (R)	GCTCACATGTTCTTTCCTGC
Plasmid prob	[CY5]AATCGGCCAACGCGCGG[BHQ2]

Tablo 4

Gerçek zamanlı PCR (qPCR) yöntemine göre *tpi* geni araştırılması (reaksiyon karışımı)

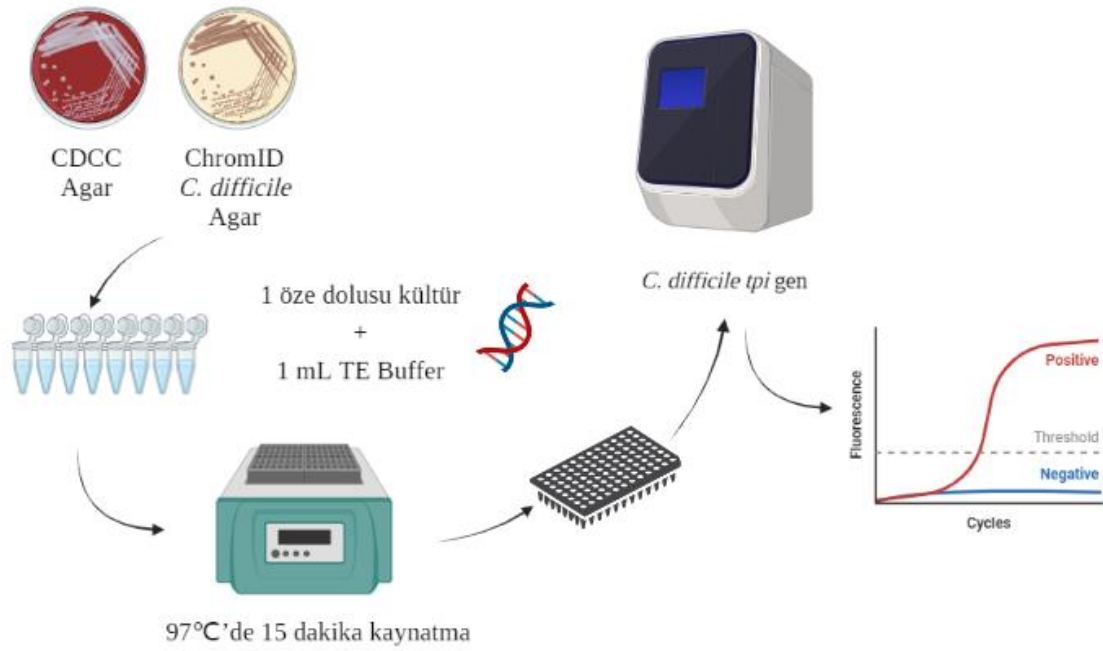
Malzemeler	Miktar toplam (20 µL)
Light cycler 480 mastermix	10 µL
Tpi primer F20 µM	0.25µL
Tpi primer R20 µM	0.25µL
Plasmid primer F20 µM	0.25µL
Plasmid primer R20 µM	0.25µL
Tpi probe 20 µM	0.125µL
Plasmid probe 20 µM	0.125µL
Plasmid	0.1µL
DNA template	5 µL
PCR water	3.65 µL

Tablo 5

*C. difficile tpi* gen belirlenmesinde kullanılan döngü koşulları

Adım	Sıcaklık	Süre	
1	95°C	5 dakika	
2	95°C	10 saniye	} 2. adıma döngü 39 tur
3	59°C	1 dakika	
4	72°C	1 saniye	
5	25°C	30 saniye	





Şekil 7. İzolatlardan DNA ekstraksiyonu ve izolatların *tpi* gen varlığının belirlenmesi

### 3.2.12. Elde Edilen İzolatların Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi

Elde edilen izolatların biyofilm oluşturma özelliklerinin belirlenmesi için kristal viyole mikrotitre plak yöntemi kullanılmıştır (Donelli vd., 2012). Brain Heart Infusion Agar'da (Himedia, Hindistan) 35-36°C'de 24 saat aktif hale getirilen kültürler 0,5 McFarland düzeyine seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu mikroplağın her kuyucuğuna 6 log düzeyindeki 20 µL kültür ve 180 µL BHI Broth eklenmiş olup negatif kontrol için kuyucuklara sadece BHI Broth besiyeri aktarılmıştır. Mikroplaklar 35-36°C'de 48 saat anaerobik kabinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar boşaltılmıştır. Boşaltılan tüm kuyucuklar 3 kez 200 µL Fosfat tamponlu su (PBS) ile yıkanarak kuyucuklarda tutunamayan hücrelerin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. PBS ile yıkanan plaklar 60°C'de 1 saat kurutmaya bırakılmıştır. Ardından, %1'lik kristal viyole kuyucuklara 150 µL eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Süre bitiminde plaklar PBS ile yıkanarak 60°C'de 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminden sonra her kuyucuğa %33 oranında hazırlanmış (v/v) asetik asit (Sigma, ABD) ilave edilerek tutunmuş hücrelere yapışmış boyaların çözünmesi amaçlanmıştır (Şekil 8). 620 nm'de mikroplak okuyuculu spektrofotometrede (Thermo scientific, Multiscan FC, ABD) plaklar okutularak optik yoğunluklarına göre (OD değeri) oluşturdukları biyofilm

kapasiteleri belirlenmiştir. Analiz her kültür için 3 kez tekrar edilmiştir. Stepanović vd., (2000)'ne göre 3 kez ölçülmüş negatif kontrolün OD değerlerinin ortalamasına ( $OD_c$ ) bağlı olarak izolatların tutunma yeteneği Tablo 6'da belirtilen şekilde sınıflandırılmıştır.

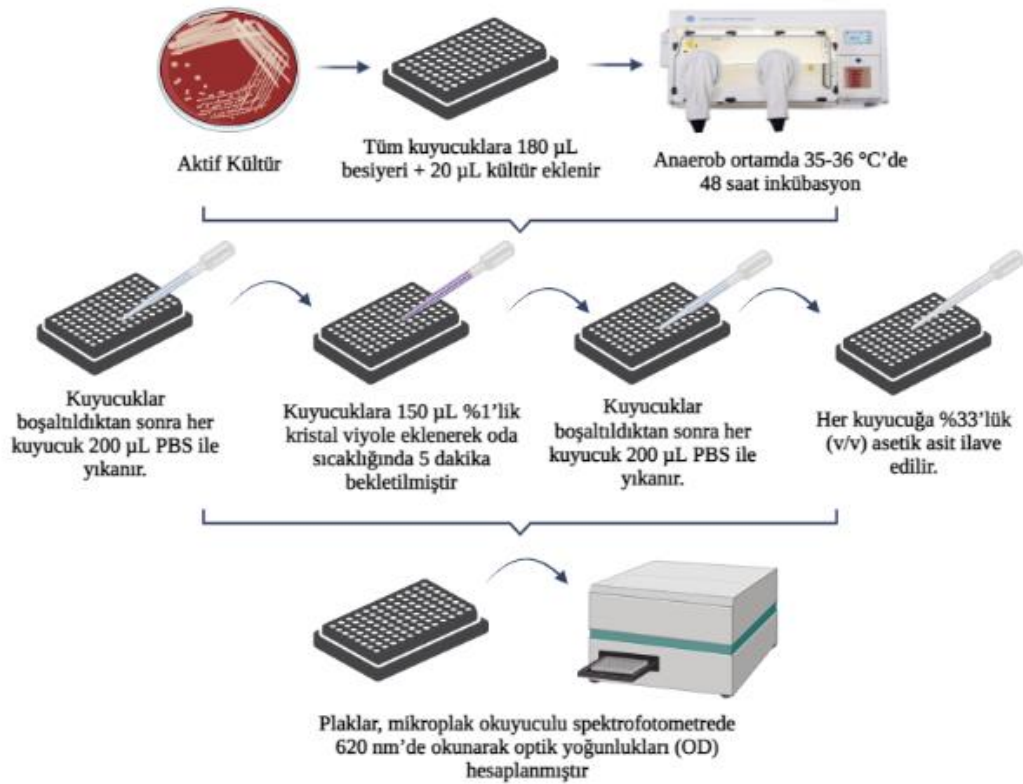
Tablo 6

Optik yoğunluk değerlerine göre biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi

OD Değeri	Biyofilm Oluşturma Kapasitesi
$4 \times *OD_c < OD$	Güçlü
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	Orta
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Zayıf
$OD \leq OD_c$	Biyofilm oluşumu yok

\* $OD_c$ : Negatif kontrolün optik yoğunluk ortalaması, OD: İzolatların optik yoğunluk ortalaması

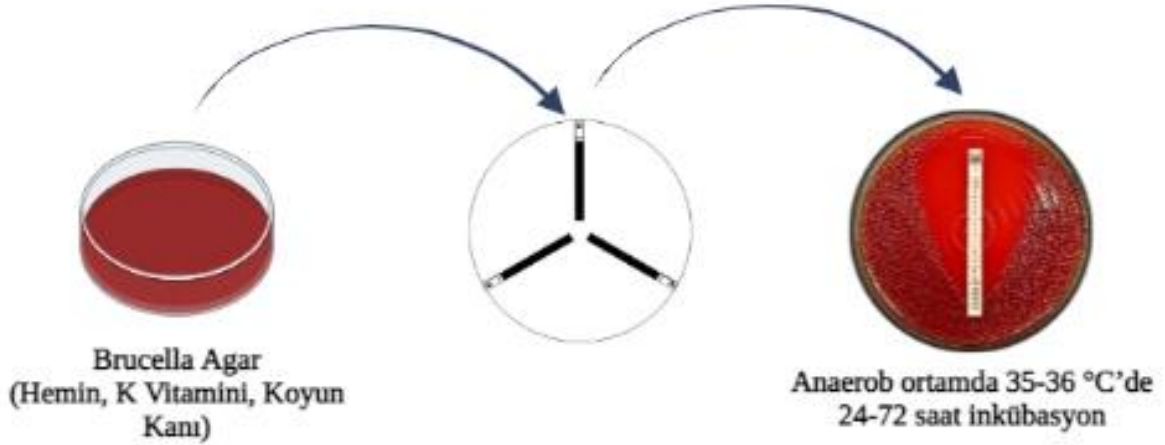
Elde edilen izolatların biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi için kullanılacak yöntem Şekil 8'de detaylı olarak açıklanmıştır.



Şekil 8. Elde edilen izolatların biyofilm oluşturma kapasitesinin belirlenmesi

### 3.2.13. Elde Edilen İzolatların Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

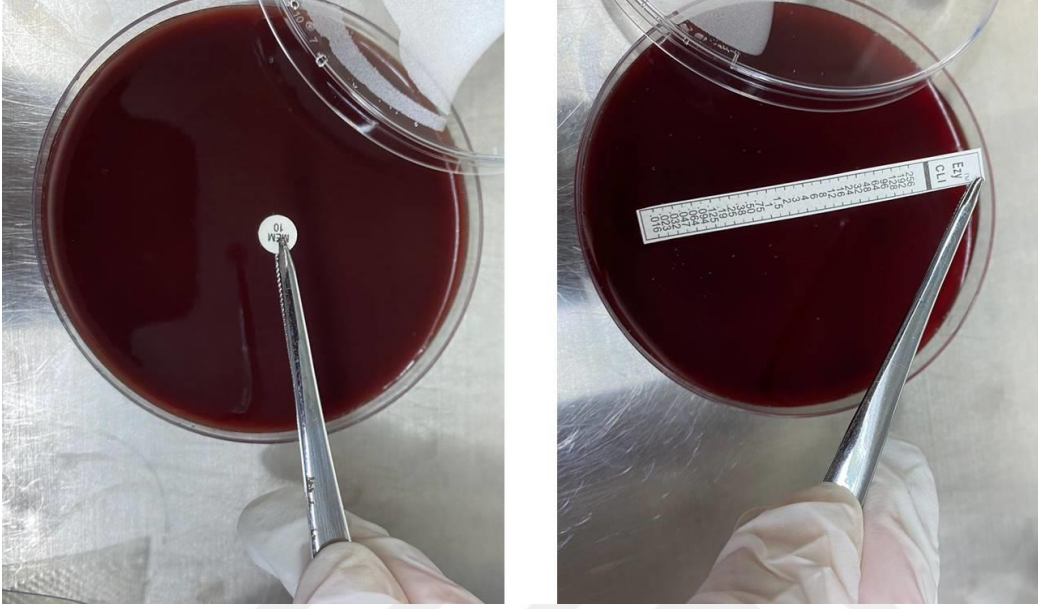
Elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde Epsilon test (E-test) yöntemi kullanılmıştır. Tedavide sıklıkla kullanılan klindamisin, vankomisin ve metronidazol antibiyotiklerine karşı antibiyotik direnç profilleri belirlenmiştir (CLSI, 2012). E-test yöntemi için kullanılacak olan antibiyotiklerin E-test şeritleri, izolatlar ile ekim yapılmış Brucella Agar (%5 (v/v) koyun kanı (Liofilchem, İtalya), 5 µg/mL Hemin (Sigma, ABD) ve 1 µg/mL K vitamini (Roche, Almanya)) üzerine yerleştirilmiştir. E-test şerit içeren petripler anaerobik ortamda 35-36°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda E-test şeritleri etrafında oluşmuş inhibisyon elipsi test şeritinin üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta antibiyotiklerin MİK değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Elde edilen izolatların antibiyotik direncinin belirlenmesi

Elde edilen izolatların antibiyotik direncinin belirlenmesinde ek olarak disk difüzyon yöntemi de tercih edilmiştir (EUCAST, 2023). Disk difüzyon yöntemi için vankomisin (5 µg), klindamisin (2 µg) ve meropenem (10 µg) antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Türkiye) kullanılmıştır. 24 saat aktif hale getirilen kültür 1,0 McFarland düzeyine seyreltilerek %5 at kanı içeren Fastidious Anaerobe Agar (FAA, Neogen, ABD) besiyerine inoküle edilmiştir. Kültür inokülasyonu sonunda antibiyotik diskleri

yerleştirilerek 35-37°C’de 18±2 saat anaerob koşullarda inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 10). İnkübasyon sonunda disk etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür.



Şekil 10. Antibiyotik diskinin ve E-testin yerleştirilmesi

### 3.2.14. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi için Minitab (Versiyon 17) programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler ortalama±standart hata olarak hesaplanmıştır. Kokoreç örneklerinin mikrobiyolojik kalitesinin ve örneklerin temin edildiği iller arasındaki fark tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Farklar istatistiksel olarak önemli bulunduğunda ( $P \leq 0,05$ ) ise Tukey testi ile farklılıklar belirlenmiştir.

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Kokoreç Örneklerinin Mikrobiyolojik Kalitesi

Çiğ ve pişmiş kokoreç örnekleri Çanakkale, Bursa, İzmir ve Balıkesir illerinden temin edilmiştir. Temin edilen kokoreç örneklerinde Toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB), Toplam koliform ve *E.coli*, Küf/Maya, *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Salmonella*, sülfid indirgeyen anaerobik bakteriler ve *Clostridioides difficile* varlığı araştırılmıştır.

#### 4.1.1. Çiğ Kokoreçlerin Mikrobiyal Kalitesi

Çiğ kokoreç örnekleri belirlenen şehirlerin farklı kasaplarından temin edilmiş olup toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı, küf/maya sayısı ve *Staphylococcus* spp. yükleri Tablo 7’de belirtilmiştir. Bazı örneklerden 2 paralel bazı örneklerden ise 4 paralel örnek olacak şekilde toplamda 64 çiğ kokoreç örneği analize alınmıştır.

Tablo 7

Çiğ kokoreç örneklerinin TAMB, küf/maya ve *Staphylococcus spp.* sayım sonuçları (Ortalama±Std. Hata)

Şehir	Örnek No	Örnek Sayısı (n)	TAMB	Maya	Küf	<i>Staphylococcus spp.</i>
Çanakkale	1	4	6.48±0.18	4.75±0.03	4.01±0.01	5.02±0.03
Çanakkale	2	4	6.65±0.77	4.33±0.03	4.73±0.04	5.89±0.13
Çanakkale	4	2	7.17±0.02	3.62±0.15	4.10±0.10	5.05±0.02
Çanakkale	5	2	7.16±0.01	3.65±0.18	TE	5.00±0.01
İzmir	15	2	4.27±0.16	2.19±0.04	TE	3.31±0.08
İzmir	16	2	4.72±0.09	2.68±0.09	TE	3.43±0.02
Bursa	21	2	5.35±0.01	3.61±0.03	TE	5.98±0.02
Bursa	22	2	5.59±0.06	3.21±0.03	TE	5.67±0.14
Bursa	23	4	5.13±0.11	TE	TE	4,82±0.09
Bursa	24	4	5.76±0.09	TE	TE	5,40±0.09
Bursa	25	2	5.72±0.02	TE	TE	5.48±0.04
Balıkesir	28	2	4.68±0.02	TE	3,20±0.05	3.31±0.08
Balıkesir	29	2	4.69±0.06	TE	3.21±0.10	3.24±0.07
Balıkesir	30	2	4.93±0.01	TE	TE	3.03±0.03
Balıkesir	31	2	4.71±0.04	TE	TE	2.86±0.09
Balıkesir	32	2	4.79±0.04	TE	TE	3.16±0.32
İzmir	37	2	4.91±0.04	2.89±0.05	TE	3.12±0.03
İzmir	38	2	4.79±0.02	2.78±0.02	TE	3.22±0.03
İzmir	39	2	4.75±0.04	TE	TE	3.19±0.05
Çanakkale	40	4	5.71±0.05	3.71±0.06	TE	3.22±0.05
Çanakkale	41	2	5.88±0.03	3.66±0.08	TE	TE
Çanakkale	42	4	5.90±0.04	3.72±0.12	TE	3.60±0.03
Çanakkale	45	2	6.78±0.11	3.64±0.01	TE	3.34±0.07
Çanakkale	46	4	5.46±0.06	3.91±0.06	TE	3.59±0.04
Çanakkale	49	2	5.38±0.08	4.04±0.27	TE	4.84±0.02
Şehir	Temin Edilen Yer Sayısı	Toplam Örnek Sayısı	Genel Ortalama			
			TAMB	Maya	Küf	<i>Staphylococcus spp.</i>
Çanakkale	10	30	*6.18±0.14 <sup>A</sup>	3.94±0.07 <sup>A</sup>	4.28±0.14 <sup>A</sup>	4.43±0.18 <sup>B</sup>
Bursa	5	14	5.49±0.08 <sup>B</sup>	3.41±0.11 <sup>B</sup>	TE <sup>C</sup>	5.37±0.11 <sup>A</sup>
İzmir	5	10	4.68±0.07 <sup>C</sup>	2.63±0.10 <sup>C</sup>	TE <sup>C</sup>	3.25±0.03 <sup>C</sup>
Balıkesir	5	10	4.76±0.03 <sup>C</sup>	TE <sup>D</sup>	3.20±0.04 <sup>B</sup>	3.12±0.07 <sup>C</sup>

\*Aynı sütun üzerinde farklı harfler istatistiki olarak önemlidir(P&lt;0,05), TE: Tespit Edilmedi

Çanakkale ilinden temin edilen çiğ kokoreç örnekleri arasında toplam aerobik mezofilik bakteri yükü bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttur ( $P<0,05$ ). Çanakkale ili bazında en yüksek toplam yük 7,17 log KOB/g iken en düşük toplam yük ise 5,38 log KOB/g olarak belirlenmiştir (Tablo 7). Çanakkale’de kasaplardan temin edilen çiğ kokoreç örneklerinde genel olarak TAMB sayısı 6,18 log KOB/g olarak saptanmış olup iller arasında en yüksek TAMB yükünü içermektedir. İzmir’den alınan çiğ kokoreç örnekleri arasında TAMB yükü bakımından önemli derecede farklılıklar saptanmıştır ( $P<0,05$ ). İzmir’deki çiğ kokoreçlerde en yüksek TAMB yükü 4,91 log KOB/g olup en düşük yük ise 4,27 log kob/g olarak belirlenmiştir. Balıkesir ilinden temin edilen çiğ kokoreçlerin genel ortalama olarak TAMB sayısı 4,76 log KOB/g olarak saptanırken İzmir’den temin edilen çiğ kokoreçlerin ortalama TAMB yükü ise 4,68 log KOB/g olarak belirlenmiştir. Bursa’daki çiğ kokoreçlerde en yüksek TAMB sayısı 5,76 log KOB/g bulunmuş ve en düşük TAMB yükü ise 5,13 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. İller kendi içinde toplam yük bakımından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlemlenmiştir ( $P<0,05$ ). Bu durum ise kokorecin hammaddesi olan bağırsağın mikrobiyal kalitesini yansıtmakta ve bağırsakları temizleme işleminin yetersiz yapılmasından da kaynaklanabilmektedir. Kılıç (2016) ve Temelli vd., (2002)’nin çiğ kokoreç örneklerinde yaptığı çalışmalardaki TAMB sayısına kıyasla bizim çalışmamızda çiğ kokoreç örneklerinde TAMB sayısının daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Bursa’dan temin edilen çiğ kokoreçlerin %40’ında maya sayısı tespit edilmiş olup genel ortalama olarak maya sayısı 3,41 log KOB/g olarak belirlenmiştir. Bursa ilinden farklı kasaplardan temin edilen çiğ kokoreç örnekleri arasında maya sayısı bakımından anlamlı farklılıklar saptanmıştır ( $P<0,05$ ). Çanakkale’den alınan çiğ kokoreç örnekleri arasında da maya sayısı bakımından önemli farklılıklar belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). Çanakkale’den alınan çiğ kokoreç örnekleri arasında en yüksek maya sayısı 4,75 log KOB/g düzeyindeyken en düşük maya sayısı ise 3,62 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. İzmir ilinden farklı zaman ve kasaplardan temin edilen çiğ kokoreç örneklerinin maya sayıları arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemlidir ( $P<0,05$ ). Balıkesir ilinden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinde maya saptanmamıştır. Çiğ kokoreç örnekleri maya sayısı bakımından genel olarak değerlendirildiğinde ise en yüksek maya sayısı Çanakkale ilinde olup en düşük maya sayısı ise İzmir ilinden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinde belirlenmiştir. Çiğ kokoreç örneklerinde maya tespit edilmiş olması, ısıya direnci düşük

olan bu mikroorganizmaların hammadde işleme koşullarından ve çevreden bulaşmış olabileceğinin göstergesidir.

Genel olarak, çiğ kokoreç örneklerinde küf sayısı değerlendirildiğinde en yüksek 4,73 log KOB/g düzeyinde olup Çanakkale'den temin edilen örneklerde belirlenmiştir. Çanakkale ilinden alınan çiğ örneklerin %30'unda küf saptanmış olup aralarında küf sayısı bakımından önemli farklılıklar mevcut olduğu gözlemlenmiştir ( $P<0,05$ ). Balıkesir ilinde 5 farklı kasaptan temin edilen örneklerin sadece 2 tanesinde küf saptanmış olup aralarında küf sayısı bakımından önemli farklılık saptanmamıştır ( $P>0,05$ ). Bursa ve İzmir'deki kasaplardan alınan çiğ kokoreç örneklerinde küf belirlenmemiştir. Benzer şekilde küf yükünün fazla olması da mayalar gibi çevreden bulaşı olduğunun göstergesidir.

Gıdaların işlenmesi sırasında bulaşma potansiyeli yüksek olan *Staphylococcus aureus* ile ilgili çiğ ve pişmiş kokoreçlerde yapılan çalışmalar literatürde mevcuttur. Kokoreçlerin işlenmesi sırasında *S. aureus* yükü bakımından artış riski hem tüketici sağlığı hem de gıda güvenliği açısından önemli olmaktadır. Çanakkale, Bursa, İzmir ve Balıkesir illerinden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinin %96'sında (24/25) *Staphylococcus* spp. belirlenmiştir. Çanakkale'den alınan çiğ örnekler arasında en yüksek *Staphylococcus* spp. yükü 5,89 log KOB/g olup en düşük *Staphylococcus* spp. yükü ise 3,22 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Çiğ kokoreç örneklerinde *Staphylococcus* spp. yükü bakımından Çanakkale, İzmir ve Bursa illeri kendi içinde *Staphylococcus* spp. yükleri bakımından anlamlı düzeyde farklılık saptanırken ( $P<0,05$ ), Balıkesir ilinden alınan çiğ kokoreç örnekleri arasında *Staphylococcus* spp. yükleri bakımından önemli derecede istatistiksel olarak farklılık belirlenmemiştir ( $P>0,05$ ). Çiğ kokoreç örnekleri *Staphylococcus* spp. varlığı bakımından değerlendirildiğinde İzmir ve Balıkesir illeri arasında anlamlı derecede farklılıklar saptanmamıştır ( $P>0,05$ ). Çiğ kokoreç örneklerinde en yüksek *Staphylococcus* spp. yükü Bursa'dan alınan örnekte 5,37 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. En düşük *Staphylococcus* spp. yükü ise Balıkesir ilinden alınan örneklerde belirlenmiştir (3,12 log KOB/g). Çalışmamızda tüm *Staphylococcus* spp. izolatlarına koagülaz testi uygulanmıştır. Koagülaz testi sonucunda çiğ örneklerden elde edilen izolatların tamamı koagülaz negatif olarak belirlenmiştir. Çoğunlukla *Staphylococcus* spp. boğaz ve burun boşluğunda, hayvan ve insanların dışkılarında, ciltte bulunmaktadır. Gıda işletmelerinde, gıda hazırlayan personellerin ellerinde, hastane personellerinde ve hastanelerde yaygınlıkla bulunabilmektedir. Gıdaların el ile hazırlanması, gıda hazırlanan ortamın temizliği ve



personel hijyeninin dikkate alınmaması gibi durumlarda stafilocoklar taşıyıcılarla birlikte çevreye ve gıdalara kolayca yayılabilmektedir (Vural ve Öztan, 1993; Bilgehan, 2000; Tunail, 2000).

Uzun yıllar boyunca kommensal ve kontaminant bakteriler olarak değerlendirilen koagülaz negatif stafilocokların (KNS), son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda enterotoksin üretebildikleri ve insanlar üzerinde patojenik etkisinin olduğu gözlemlenmiştir (Cunha vd., 2006). Stafilocoklar katı yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturabilmektedir. Gıdaların hazırlandığı ortamlarda biyofilm varlığı gıdaların kontaminasyonuna neden olabilmektedir. Bu nedenle gıda hazırlanan ortamın hijyen durumu oldukça önemlidir (Schlegelová vd., 2010). KNS'ler genellikle insan ve hayvanlarda deri ve mukoza tabakasında bulunmaktadır. Bu nedenle hayvansal gıdalarda çoğunlukla KNS varlığına çalışmalarda rastlanılmıştır (Leroy vd., 2010; Talon ve Leroy, 2011; Busconi vd., 2014). Schlegelová vd., (2004)'nin çalışmasında karkaslardan swap ile alınan örneklerde %7,5 oranda *S. aureus* ve %52,2 oranda KNS saptanmıştır. Gıda ile kontaminasyon durumunda KNS'lerin daha etkili olduğu belirtilmiştir. KNS'lerin hayvan karkaslarında ve et ürünlerinde varlığının nedeni personel kaynaklı kontaminasyon olma ihtimali yüksek olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda şüpheli *S. aureus* izolatlarına koagülaz testi uygulanmış ve izolatların hepsi koagülaz negatif olarak saptanmıştır. Kokoreç örneklerinde koagülaz negatif stafilocokların varlığının nedeninin ise bağırsakların temizlenmesi ve kokoreç yapım aşamasında personel veya çevreden bulaşma ihtimali olduğu düşünülmektedir. Örneklerde *S. aureus* saptanmamış olmasına karşın koagülaz negatif stafilocokların enterotoksin üretebiliyor olması ayrıca biyofilm oluşturarak diğer patojenlerin tutunmasına neden olabilecek olması nedeni ile üründe yüksek seviyelerde bulunmaları halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Özellikle örneklerde 4 log ve üzerinde koagülaz negatif stafilocokların tespit edilmiş olması gıda güvenliği açısından risk teşkil etmektedir.

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde belirtilen limitlere göre, tüketime hazır olmayan gıdalarda *S. aureus* yükü 3-4 log KOB/g arasında ve tüketime hazır gıdalarda ise *S. aureus* yükü 2-3 log KOB/g arasında olması gerektiği belirtilmiştir (Anonim, 2022). Farklı illerden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinde *S. aureus* varlığı tespit edilmemiştir. Bu nedenle çiğ kokoreç örnekleri Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde belirtilen limitlere uygundur. Çiğ kokoreç örneklerinde yapılan bir çalışmada (Bilgin vd.,

2008), *S. aureus* 3,50 log KOB/g düzeyinde bulunurken, çalışmamızda 4 farklı ilden temin edilen çiğ kokoreçlerin hepsinden koagülaz negatif stafilokok varlığına rastlanılmıştır.

Farklı illerden ve şehirlerin farklı kasaplarından temin edilen çiğ kokoreç örneklerinde toplam koliform, *E. coli*, muhtemel *Bacillus cereus* ve sülfid indirgeyen anaerobik bakteri yükleri belirlenmiştir. Örneklerde *Salmonella* aranmış olup sonuçlar Tablo 8’de verilmiştir.



Tablo 8

Çiğ kokoreç örneklerinde *Salmonella* varlığı ve toplam koliform, *E. coli*, muhtemel *B. cereus*, sülfid indirgeyen anaerobik bakteri sayım sonuçları (Ortalama±Standart Hata)

Şehir	Örnek No	Örnek Sayısı (n)	Toplam Koliform	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	* <i>Bacillus cereus</i>	Sülfid İndirgeyen Anaerobik Bakteri
Çanakkale	1	4	TE	TE	TE	7.22±0.01	TE
Çanakkale	2	4	TE	TE	TE	7.39±0.01	TE
Çanakkale	4	2	5.53±0.02	TE	TE	7.32±0.07	TE
Çanakkale	5	2	5.38±0.07	2.72±0.10	TE	6.80±0.00	2.70±0.13
İzmir	15	2	3.66±0.05	TE	TE	3.64±0.04	TE
İzmir	16	2	2.87±0.03	TE	TE	4.10±0.21	2.90±0.13
Bursa	21	2	3.38±0.04	2.38±0.08	TE	5.42±0.08	2.07±0.07
Bursa	22	2	3.46±0.05	2.25±0.21	TE	5.44±0.05	2.09±0.03
Bursa	23	4	3.38±0.11	TE	TE	4.23±0.23	TE
Bursa	24	4	2.80±0.31	TE	TE	5.60±0.04	TE
Bursa	25	2	3.30±0.13	2.24±0.24	TE	5.35±0.21	TE
Balıkesir	28	2	3.60±0.10	TE	TE	4.73±0.03	2.27±0.03
Balıkesir	29	2	3.71±0.03	TE	TE	4.66±0.03	TE
Balıkesir	30	2	3.62±0.06	TE	TE	4.49±0.06	TE
Balıkesir	31	2	3.65±0.11	2.58±0.11	TE	TE	TE
Balıkesir	32	2	3.65±0.03	TE	TE	TE	TE
İzmir	37	2	3.18±0.03	TE	TE	TE	TE
İzmir	38	2	3.13±0.04	TE	TE	TE	TE
İzmir	39	2	3.09±0.07	TE	TE	TE	TE
Çanakkale	40	4	4.86±0.02	TE	TE	4.25±0.12	TE
Çanakkale	41	2	4.61±0.04	TE	TE	3.92±0.08	TE
Çanakkale	42	4	4.89±0.03	TE	TE	4.28±0.05	TE
Çanakkale	45	2	4.67±0.06	TE	TE	4.34±0.09	TE
Çanakkale	46	4	3.68±0.45	4.00±0.16	TE	4.16±0.11	TE
Çanakkale	49	2	3.75±0.15	TE	TE	3.15±0.01	TE
Şehir	Temin Edilen Yer Sayısı	Toplam Örnek Sayısı	Toplam Koliform	<i>E. coli</i>	Genel Ortalama <i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	Sülfid İndirgeyen Anaerobik Bakteri
Çanakkale	10	30	**4.62±0.15 <sup>A</sup>	3.36±0.37 <sup>A</sup>	TE <sup>A</sup>	5.34±0.29 <sup>A</sup>	2.70±0.13 <sup>A</sup>
Bursa	5	14	3.21±0.11 <sup>C</sup>	2.29±0.09 <sup>B</sup>	TE <sup>A</sup>	5.27±0.15 <sup>AB</sup>	2.07±0.03 <sup>B</sup>
İzmir	5	10	3.18±0.08 <sup>C</sup>	TE <sup>C</sup>	TE <sup>A</sup>	3.87±0.16 <sup>B</sup>	2.90±0.13 <sup>A</sup>
Balıkesir	5	10	3.64±0.02 <sup>B</sup>	2.58±0.11 <sup>AB</sup>	TE <sup>A</sup>	4.63±0.05 <sup>AB</sup>	2.27±0.03 <sup>B</sup>

\*Sonnular muhtemel *B. cereus* yükleri olarak verilmiştir.

\*\*Aynı sütun üzerinde farklı harfler istatistiki olarak önemlidir (P<0,05), TE: Tespit edilmedi.

Küçükbaş hayvanların bağırsakları kullanılarak üretilen kokorecin üretim aşamasında bağırsaklar su ile temizlenmektedir. Bu durumda fekal bakterileri içeren bağırsaklara sudan gelebilecek olan ek bir fekal kontaminasyon tüketici sağlığı ve gıda kalitesi bakımından önemli bir durum oluşturmaktadır. Çanakkale ilinden temin edilen çiğ kokoreç örnekleri arasında en yüksek toplam koliform sayısı 4 numaralı örnekte belirlenmiş olup 5,53 log KOB/g düzeyindedir. Çiğ kokoreç örneklerinde en düşük koliform yükü 3,68 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Genel olarak iller arasında toplam koliform yükü değerlendirildiğinde en yüksek yük Çanakkale ilinden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinde saptanmıştır ( $P < 0,05$ ). Çanakkale'den temin edilen çiğ kokoreçlerin %20'sinde (2/10) toplam koliform yükü tespit seviyesinin altında olup belirlenmemiştir. İzmir ilindeki çiğ kokoreç örnekleri toplam koliform bakımından değerlendirildiğinde en yüksek ve en düşük değer sırasıyla 3,66 ve 2,87 log KOB/g olarak belirlenmiştir. Balıkesir ve Bursa ilinden alınan örneklerde ise farklı kasaplardan satın alınan çiğ kokoreç örnekleri arasında toplam koliform yükleri bakımından önemli derecede farklılık olmadığı tespit edilmiştir ( $P > 0,05$ ). Balıkesir ve Bursa ilinden temin edilen çiğ kokoreçlerin toplam koliform yüklerinin sırasıyla 3,60-3,71 log KOB/g ve 2,80-3,46 log KOB/g arasında olduğu belirlenmiştir. Farklı illerden temin edilen çiğ kokoreç örnekleri iller arasında değerlendirilmeye alındığında ise Bursa, İzmir ve Balıkesir illeri arasında toplam koliform yükleri açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $P > 0,05$ ). Kılıç (2016) ve Bilgin vd., (2016)'nın yaptığı çalışmada, çiğ kokoreç örneklerinde bulunan koliform yükü incelenmiştir. Çalışmamızdaki çiğ kokoreçlerin koliform yükü yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Farklı illerden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinde *E. coli* varlığı incelendiğinde İzmir ilinden satın alınan örneklerde *E. coli* saptanmamıştır. Çanakkale ilinden temin edilen çiğ kokoreçlerin %20'sinde *E. coli* varlığı belirlenmiş olup en yüksek ve en düşük değerler sırasıyla 4,00 ve 2,72 log KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Bursa'dan alınan çiğ örnekler arasında *E. coli* varlığı bakımından anlamlı düzeyde farklılık saptanmamış ( $P > 0,05$ ) olup çiğ örneklerin %60'ında *E. coli* tespit edilmiştir. *E. coli* tespit edilen kokoreç örneklerindeki *E. coli* yükleri illere göre değerlendirildiğinde en düşük Bursa ilinde tespit edilmiş, Balıkesir ilinde ise 1 örnekte 2,58 log KOB/g düzeyinde bulunmuştur. Temelli vd., (2002)'nin yaptığı çalışmada, çiğ kokoreç örneklerinde *E. coli* yükü ortalama 4,11 log KOB/g düzeyinde belirlenirken, çalışmamızda çiğ kokoreçlerde *E. coli* yükü 2,29-3,36 log KOB/g arasında olduğu tespit edilmiştir.

Farklı illerden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinde *Salmonella* varlığı araştırılmış olup hiçbir örnekte *Salmonella* saptanmamıştır. Türk Gıda Kodeksi'nin Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre, tüketime hazır gıdalarda *Salmonella* bulunmamalıdır (Anonim, 2022). Bu kriterlere göre çiğ kokoreç örneklerinin limitler dâhilinde olduğu belirlenmiştir. Bilgin vd., (2016)'nin çalışmasında, çiğ örneklerin %90'ında *Salmonella* saptanmış olup Hampikyan vd., (2008)'nin çalışmasında ise bizim çalışmamıza benzer olarak çiğ kokoreç örneklerinde *Salmonella*'ya rastlanılmamıştır.

Gıda zehirlenmelerine neden olan *Bacillus cereus*'un enterotoksin ve emetik toksin oluşturan iki farklı tipi olduğu bilinmektedir. Emetik toksin oluşturan *B. cereus*'un insanlarda kusmaya neden olduğu, enterotoksin oluşturan suşun ise insanlarda diyareye neden olduğu belirlenmiştir (Halkman, 2013; Sağlam ve Şeker, 2016). Çalışmamızda *B. cereus* saptanmasında kromojenik bir besiyeri kullanılmış ve üreticinin belirttiği koloni özelliklerine göre *B. cereus* olma ihtimali olan koloniler sayılmıştır. Çanakkale, Bursa, İzmir ve Balıkesir illerinden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinde *Bacillus cereus* varlığı bakımından değerlendirildiğinde, Balıkesir ve İzmir illerinden temin edilen çiğ örnekler arasında önemli farklılıklar saptanmamıştır ( $P>0,05$ ). İzmir ilinden temin edilen çiğ örneklerin %40'ında muhtemel *B. cereus* saptanmış olup 3,87 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Çanakkale'den satın alınan çiğ örneklerin hepsinde muhtemel *B. cereus* belirlenmiş olup en yüksek muhtemel *B. cereus* yükü 7,39 log KOB/g ve en düşük muhtemel *B. cereus* yükü 3,15 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Balıkesir'den temin edilen çiğ kokoreçlerin %60'ında muhtemel *B. cereus* saptanmış olup 4,63 log KOB/g düzeyinde yük belirlenmiştir. İller arasında genel olarak muhtemel *B. cereus* sayısı değerlendirildiğinde ise Çanakkale ve İzmir illerinden temin edilen çiğ örneklerde anlamlı derecede farklılık belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). Çalışmada kullandığımız HiCrome Bacillus Agar kromojenik bir besiyeri olduğundan tercih edilmiştir. *Bacillus cereus* grubu bakteriler mavi koloni ve etrafı pembe, *Bacillus subtilis* yeşil merkezli ve *Bacillus megaterium* ise sarı merkezli koloniler oluşturmaktadır. *B. cereus* grubu içerisinde *B. thuringensis* vb. türlerde olduğu için sonuçlar muhtemel *B. cereus* sayısı olarak verilmiş ve *B. cereus* varlığının doğrulanması yapılamamıştır. Farklı illerden temin edilen kokoreç örneklerinde *B. subtilis* ve *B. megaterium* saptama sınırının altında kalmıştır. Çiğ kokoreçlerde *Bacillus* spp. yükü araştıran çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Türk Gıda Kodeksi'nin Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğine göre, tüketime hazır olmayan gıdalarda *B. cereus* 3-4 log KOB/g arasında kabul edilmektedir (Anonim, 2022). Çiğ kokoreçlerde sadece İzmir ilinden temin

edilen örnekler muhtemel *B. cereus* sayısı bakımından limitler içerisinde olduğu belirlenmiştir. Diğer illerden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinin muhtemel *B. cereus* yükleri limitler içerisinde değildir. Bu nedenle çiğ kokoreç örneklerinden elde edilen muhtemel *B. cereus* izolatları doğrulanması durumunda halk sağlığı açısından risk oluşturacaktır.

Doğada, deniz sularında, toprakta, insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde yaygın olarak bulunan *Clostridium perfringens*'in, gazlı kangren, ishal ve gıda zehirlenmesine neden olduğu bilinmektedir (Ohtani ve Shimizu, 2016; Poxton, 2006). Kokoreç örneklerinde *C. perfringens* araştıran çalışma sayısı oldukça azdır. Çalışmamızda farklı şehirlerden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinin %20'sinde sülfite indirgeyen anaerobik bakterilerin varlığı belirlenmiş olup en yüksek yük 2,90 log KOB/g düzeyinde İzmir ilinden temin edilen örneklerde tespit edilmiştir. Sülfite indirgeyen anaerobik bakteri yükünün en düşük belirlendiği il ise Bursa olup 2,07 log KOB/g düzeyinde yük saptanmıştır. Genel olarak iller arasında sülfite indirgeyen anaerobik bakteri yükü bakımından Çanakkale ve İzmir illeri arasında anlamlı derecede farklılık belirlenmemiştir ( $P>0,05$ ). Aynı durumun Balıkesir ve Bursa illeri arasında da geçerli olduğu gözlenmiştir ( $P>0,05$ ). Bu çalışmada Tryptose Sulphite Cycloserine Agar (TSCA) besiyerinde sülfite indirgeyen anaerobik bakterilere ait yükler belirlenmiş olup, seçilen kolonilere gram boyama ve RAPID ID 32A testi uygulandığında bu grup içerisinde *C. perfringens* dışındaki bakterilerin daha ağırlıklı olduğu görülmüştür. Çiğ kokoreç örneklerindeki sülfite indirgeyen anaerobik bakteri yükünün Mikrobiyolojik Kriter Tebliği'ne göre belirlenen limitler içerisinde olduğu tespit edilmiştir (Anonim, 2022).

#### **4.1.2. Pişmiş Kokoreçlerin Mikrobiyal Kalitesi**

Çanakkale, Bursa, İzmir ve Balıkesir illerinden ve farklı işletmelerden satın alınan pişmiş kokoreç örneklerinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı, küf/maya sayısı ve *Staphylococcus spp.* sayım sonuçları Tablo 9'da belirtilmiştir. Pişmiş kokoreç örnekleri de 2 veya 4 paralel olarak çalışılmış ve toplamda 76 örnek analize alınmıştır.

Tablo 9

Pişmiş kokoreç örneklerinin TAMB, küf/maya ve *Staphylococcus spp.* sayım sonuçları (Ortalama±Std. Hata)

Şehir	Örnek No	Örnek Sayısı (n)	TAMB	Maya	Küf	<i>Staphylococcus spp.</i>
Çanakkale	3	4	4.91±0.02	TE	TE	TE
Çanakkale	6	4	5.41±0.03	TE	3.12±0.02	TE
Çanakkale	7	4	5.60±0.04	3.91±0.08	2.14±0.06	4.53±0.04
Çanakkale	8	4	4.93±0.08	3.26±0.09	TE	TE
Bursa	9	4	5.36±0.08	TE	TE	4.76±0.02
Bursa	10	4	5.38±0.05	TE	TE	4.23±0.23
Bursa	11	4	4.62±0.03	TE	TE	TE
Bursa	12	2	5.35±0.02	TE	TE	TE
Bursa	13	2	5.17±0.03	TE	TE	TE
İzmir	14	2	4.83±0.01	2.19±0.04	TE	2.63±0.06
İzmir	17	2	4.26±0.03	2.05±0.01	TE	2.38±0.08
Balıkesir	18	2	4.67±0.00	TE	2.52±0.09	2.85±0.02
Balıkesir	19	2	4.95±0.01	TE	TE	2.50±0.09
Balıkesir	20	2	4.54±0.08	TE	2.04±0.04	2.12±0.01
Balıkesir	26	2	4.06±0.11	TE	TE	2.31±0.06
Balıkesir	27	2	3.90±0.13	TE	TE	2.19±0.19
İzmir	33	2	4.66±0.15	TE	TE	2.07±0.03
İzmir	34	2	4.46±0.05	TE	TE	2.21±0.06
İzmir	35	2	4.32±0.06	TE	TE	2.06±0.04
İzmir	36	2	4.22±0.04	TE	TE	2.31±0.02
Çanakkale	43	4	4.56±0.03	TE	TE	TE
Çanakkale	44	2	4.67±0.02	TE	TE	TE
Çanakkale	47	4	4.23±0.11	TE	TE	2.80±0.03
Çanakkale	48	2	4.00±0.10	TE	TE	TE
Çanakkale	50	4	4.10±0.10	TE	TE	TE
Çanakkale	51	4	4.39±0.12	TE	TE	TE
Çanakkale	52	2	3.32±0.07	TE	TE	TE
Şehir	Temin Edilen Yer Sayısı	Toplam Örnek Sayısı	TAMB	Maya	Genel Ortalama Küf	<i>Staphylococcus spp.</i>
Çanakkale	11	38	*4.64±0.09 <sup>B</sup>	3.58±0.13 <sup>A</sup>	2.46±0.21 <sup>A</sup>	3.95±0.36 <sup>A</sup>
Bursa	5	16	5.15±0.08 <sup>B</sup>	TE <sup>C</sup>	TE <sup>B</sup>	4.49±0.18 <sup>B</sup>
İzmir	6	12	4.46±0.07 <sup>A</sup>	2.12±0.04 <sup>B</sup>	TE <sup>B</sup>	2.27±0.06 <sup>A</sup>
Balıkesir	5	10	4.42±0.13 <sup>A</sup>	TE <sup>C</sup>	2.28±0.14 <sup>A</sup>	2.39±0.09 <sup>B</sup>

\*Aynı sütun üzerinde farklı harfler istatistiki olarak önemlidir(P&lt;0,05), TE: Tespit edilmedi.

Çanakkale ilinde farklı işletmelerden temin edilen pişmiş kokoreç örneklerinin toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayıları arasında önemli düzeyde farklılık saptanmış ( $P<0,05$ ) ve en yüksek TAMB yükü 5,60 log KOB/g düzeyinde tespit edilmiştir (Tablo 9). Çanakkale’de işletmelerden satın alınan pişmiş örnekler genel olarak değerlendirildiğinde TAMB sayısı 4,64 log KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Bursa’dan alınan pişmiş kokoreçlerde TAMB sayısı 4,62-5,38 log KOB/g arasında, İzmir’den temin edilen pişmiş kokoreçlerde toplam TAMB yükü ise 4,22-4,83 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Balıkesir’deki işletmelerden satın alınan pişmiş kokoreçlerde TAMB yükü en yüksek 4,95 log KOB/g düzeyinde saptanmış ve en düşük TAMB sayısı 3,90 log KOB/g olarak belirlenmiştir. Çanakkale, Bursa, İzmir ve Balıkesir illeri kendi içlerinde TAMB yükleri açısından istatistiksel anlamda değerlendirildiğinde önemli farklılıklar belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). Genel olarak pişmiş kokoreçlerde TAMB sayısına bakıldığında ise, en yüksek TAMB sayısı 5,15 log KOB/g olup Bursa ilinde ve en düşük TAMB sayısı ise 4,42 log KOB/g düzeyinde olup Balıkesir ilinden temin edilen pişmiş kokoreçlerde belirlenmiştir. Çalışmamızda pişmiş kokoreç örneklerinin TAMB sayısı, Kara vd., (2013)’nin yaptığı çalışmadaki pişmiş kokoreçlerin TAMB sayısından düşük olduğu tespit edilmiştir. Ancak, Hampikyan vd., (2008)’nin pişmiş kokoreçlerde yaptığı çalışmada ise elde edilen TAMB sayısı ile çalışmamızdaki sayım sonuçları benzerlik göstermektedir. Pişmiş kokoreçlerde toplam yükün fazla olması durumu ısıl işlemin yetersizliği, pişirme sıcaklığının düşük olması ve müşteri azlığından dolayı gıdaların pişirildikten sonra soğutulup tekrar ısıtılması gibi yanlış uygulamalardan kaynaklanabilmektedir. Örneklerde sonradan baharat ilave edilmeden alındığı için baharatların getirdiği ilave bir yük yoktur.

Çanakkale ve İzmir ilinden pişmiş olarak temin edilen kokoreçlerin sırasıyla %33,33 ve %18,18’inde maya varlığı belirlenmiştir. Ancak Balıkesir ve Bursa illerindeki pişmiş örneklerde maya tespit edilmemiştir. Çanakkale’den satın alınan pişmiş örneklerdeki maya sayıları arasında istatistiksel anlamda önemli farklılık belirlenirken ( $P<0,05$ ) İzmir’den temin edilen pişmiş kokoreçlerin maya sayıları arasında ise önemli derecede farklılık tespit edilmemiştir ( $P>0,05$ ). Genel olarak değerlendirildiğinde ise pişmiş örneklerde en yüksek maya sayısı Çanakkale’de gözlemlenmiştir. Çanakkale ilinden elde edilmiş pişmiş kokoreç örneklerinde maya sayısı ortalama 3,58 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Pişmiş kokoreç örneklerinde maya yükünün tespit edilmesi kokorecin hazırlandığı ortamın ve personelin hijyen kalitesinin eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Çanakkale'den satın alınan pişmiş kokoreç örneklerinin %18,18'inde küf saptanmış ve bu örneklerde küf sayısı 2,46 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Balıkesir ilinden temin edilen pişmiş kokoreç örneklerinde küf sayıları arasında önemli derecede farklılık saptanmış ( $P<0,05$ ) ve bu kokoreç örneklerinde küf sayısı 2,28 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Bursa ve İzmir illerinden satın alınan pişmiş kokoreçlerde küf belirlenmemiştir. Farklı illerden temin edilen pişmiş kokoreç örnekleri genel olarak değerlendirildiğinde iller arasında küf sayısı bakımından önemli farklılık tespit edilmemiştir ( $P>0,05$ ). Pişirilmiş bir üründe 2 log üzerindeki küf yükü çevresel bir kontaminasyonun göstergesi olarak görülmektedir. Örneklere baharat ilavesi olmadığı için hazırlık sırasında kullanılan araç/gereç ve ortamdan kontaminasyon olması muhtemeldir.

*S. aureus*'un insanlarda stafilokokal gıda zehirlenmesine neden olduğu bilinmektedir. Ülkemizde de bu riskin yüksek olduğu belirtilmiştir (Aydın vd., 2011). *S. aureus* genellikle burun bölgesinde bulunduğu bilinmekte olup farklı vücut bölgelerinde, mukoza ve deride de bulunarak taşınabilmektedir. Burunda bulunan *S. aureus*, genellikle yüz, el ve parmaklara bulaşabilmekte olup kolayca gıdalara taşınabilmektedir (Wertheim vd., 2005; Çakıcı vd., 2015). Balıkesir ve İzmir illerinden temin edilen pişmiş kokoreçlerin tamamında *Staphylococcus* spp. belirlenmiştir. Ayrıca Çanakkale ve Bursa'dan satın alınan pişmiş kokoreçlerde *Staphylococcus* spp. sırasıyla %18,18 ve %40 oranında tespit edilmiştir. Bursa'dan satın alınan pişmiş kokoreçler arasında *Staphylococcus* spp. varlığı açısından anlamlı düzeyde farklılık gözlemlenmemiştir ( $P>0,05$ ). Pişmiş kokoreç örneklerinde en yüksek *Staphylococcus* spp. yükü 4,49 log KOB/g düzeyinde Bursa ilinde tespit edilmiştir. Pişmiş kokoreçlerin temin edildiği iller arasında *Staphylococcus* spp. yükü bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). Pişmiş kokoreçlerde *Staphylococcus* spp. sayısının en düşük olduğu il İzmir olup 2,27 log KOB/g düzeyinde tespit edilmiştir. Çalışmamızda pişmiş kokoreç örneklerinden elde edilen *Staphylococcus* spp. izolatlarına koagülaz testi uygulanmış ve elde edilen tüm izolatlar koagülaz negatif olarak tespit edilmiştir. Stafilokoklar direkt ve indirekt temas yollarıyla çevreye yayılabilmektedir. İnsanlarda çoğunlukla burun mukozasında bulunmaktadır. Gıdaların işlenmesi aşamasında gıda hazırlanan ortamın ve personel hijyeninin eksikliği durumunda stafilokokların gıda ile kontaminasyon ihtimali artmaktadır (Gülbandılar, 2009). Kokoreçlerin hazırlandığı ortamın ve kokoreçleri hazırlayan personelin hijyen açısından yetersizliği, çalışmamızdaki pişmiş kokoreç örneklerinde stafilokokların varlığının nedeni olarak düşünülmüştür. Pişmiş kokoreç örneklerinde 4 log ve üzeri

koagülaz negatif stafilokok varlığının saptanması gıdaların hazırlandığı ortamdan ve personelden kaynaklı bir kontaminasyonu göstermektedir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre tüketime hazır gıdalarda *S. aureus* 2-3 log KOB/g arasında bulunması gerekmektedir. Çalışmamızda pişmiş kokoreç örneklerinden *S. aureus* saptanmamış olup pişmiş kokoreç örnekleri belirlenen limitler dâhilindedir (Anonim, 2022).

Çanakkale, Bursa, İzmir ve Balıkesir illerindeki farklı işletmelerden satın alınan pişmiş kokoreç örneklerinde toplam koliform, muhtemel *B. cereus*, *E. coli* ve sülfid indirgeyen anaerobik bakteri yükleri belirlenmiştir. Örneklerde *Salmonella* aranmış olup sonuçlar Tablo 10'da verilmiştir.



Tablo 10

Pişmiş kokoreç örneklerinde *Salmonella* varlığı ve toplam koliform, *E. coli*, muhtemel *B. cereus*, sülfid indirgeyen anaerobik bakteri sayım sonuçları (Ortalama±Std. Hata)

Şehir	Örnek No	Örnek Sayısı (n)	Toplam Koliform	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	Sülfid İndirgeyen Anaerobik Bakteri
Çanakkale	3	4	TE	TE	TE	5.29±0.10	TE
Çanakkale	6	4	3.18±0.04	TE	TE	4.22±0.08	TE
Çanakkale	7	4	5.40±0.03	1.98±0.05	TE	4.97±0.05	2.21±0.07
Çanakkale	8	4	TE	TE	TE	3.94±0.17	TE
Bursa	9	4	2.09±0.05	2.28±0.14	TE	4.22±0.07	TE
Bursa	10	4	TE	TE	TE	4.31±0.03	TE
Bursa	11	4	TE	TE	TE	4.20±0.08	TE
Bursa	12	2	TE	TE	TE	4.06±0.21	TE
Bursa	13	2	TE	TE	TE	TE	TE
İzmir	14	2	TE	TE	TE	3.28±0.18	TE
İzmir	17	2	TE	TE	TE	2.69±0.07	TE
Balıkesir	18	2	3.20±0.09	2.18±0.01	TE	4.49±0.02	3.41±0.05
Balıkesir	19	2	3.30±0.13	2.16±0.03	TE	4.32±0.02	3.22±0.07
Balıkesir	20	2	TE	TE	TE	4.49±0.10	TE
Balıkesir	26	2	3.50±0.07	TE	TE	5.53±0.06	TE
Balıkesir	27	2	3.27±0.03	TE	TE	5.58±0.10	TE
İzmir	33	2	2.42±0.11	TE	TE	3.25±0.05	TE
İzmir	34	2	2.22±0.03	TE	TE	3.33±0.08	TE
İzmir	35	2	2.31±0.03	TE	TE	3.20±0.04	TE
İzmir	36	2	2.11±0.07	TE	TE	3.06±0.05	TE
Çanakkale	43	4	3.46±0.08	TE	TE	TE	TE
Çanakkale	44	2	3.67±0.02	TE	TE	TE	TE
Çanakkale	47	4	2.67±0.37	TE	TE	3.05±0.05	TE
Çanakkale	48	2	TE	TE	TE	TE	TE
Çanakkale	50	4	2.57±0.11	TE	TE	TE	TE
Çanakkale	51	4	3.04±0.20	TE	TE	3.03±0.03	TE
Çanakkale	52	2	2.15±0.15	TE	TE	3.09±0.04	TE
Şehir	Temin Edilen Yer Sayısı	Toplam Örnek Sayısı	Genel Ortalama				
			Toplam Koliform	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	Sülfid İndirgeyen Anaerobik Bakteri
Çanakkale	11	38	*3.41±0.22 <sup>A</sup>	1.98±0.05 <sup>A</sup>	TE <sup>A</sup>	4.18±0.20 <sup>B</sup>	2.21±0.07 <sup>B</sup>
Bursa	5	16	2.09±0.05 <sup>AB</sup>	2.28±0.14 <sup>A</sup>	TE <sup>A</sup>	4.20±0.04 <sup>A</sup>	TE <sup>C</sup>
İzmir	6	12	2.26±0.05 <sup>AB</sup>	TE <sup>B</sup>	TE <sup>A</sup>	3.13±0.07 <sup>AB</sup>	TE <sup>C</sup>
Balıkesir	5	10	3.32±0.05 <sup>B</sup>	2.17±0.01 <sup>A</sup>	TE <sup>A</sup>	4.88±0.18 <sup>C</sup>	3.31±0.06 <sup>A</sup>

\* Aynı sütun üzerinde farklı harfler istatistiki olarak önemlidir (P<0,05), TE: Tespit edilmedi.

İşleme koşullarının yetersizliği ve gıdaların işlenmesinden sonra kontamine olması durumu, pişmiş ve ısıtılmış işleme uygulanmış gıdalarda koliform grubu bakterilerinin varlığının nedeni olarak gösterilmektedir (Uğur vd., 2001; Erol, 2007). Çanakkale ilinden temin edilen pişmiş kokoreç örneklerinin %72,72'sinde koliform bakteriler belirlenmiş ve en yüksek koliform yükü 3,41 log KOB/g düzeyinde tespit edilmiştir. Bursa ilinden 5 farklı işletmeden temin edilen pişmiş kokoreç örneklerinden sadece birinde koliform yükü belirlenmiş olup 2,09 log KOB/g düzeyinde saptanmıştır. İzmir ve Balıkesir illerinden temin edilen pişmiş kokoreç örnekleri arasında toplam koliform yük açısından anlamlı farklılık belirlenmemiştir ( $P>0,05$ ). Pişmiş kokoreç örneklerinde en düşük koliform sayısı Bursa ilinde belirlenmiştir (Tablo 10). Çanakkale, Bursa, İzmir ve Balıkesir gibi farklı illerden pişmiş olarak temin edilen kokoreç örneklerinin %14,81'inde (4/27) *E. coli* varlığı belirlenmiştir. Çanakkale, Bursa ve Balıkesir illerinden temin edilen pişmiş kokoreç örnekleri arasında *E. coli* varlığı açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $P>0,05$ ). Pişmiş örneklerde en yüksek *E. coli* varlığı Bursa ilindeki örneklerde belirlenmiş olup 2,28 log KOB/g düzeyinde saptanmıştır. İzmir ilinden 6 farklı işletmeden temin edilen kokoreç örneklerinde *E. coli* varlığına rastlanılmamıştır. Ayrıca farklı illerden temin edilen pişmiş kokoreç örneklerinin hiçbirinde *Salmonella*'ya rastlanılmamıştır (Tablo 10). Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre tüketime hazır gıdalarda *Salmonella* bulunmamalıdır (Anonim, 2022). Çalışmamızda pişmiş kokoreç örneklerinde *Salmonella* saptanmamış olup örnekler limitler dâhilindedir.

*B. cereus* önemli bir gıda kaynaklı patojen olarak bilinmektedir. Spor formunun hidrofobik özelliği, farklı yüzeylere tutunmasını kolaylaştırmaktadır. Önceden ısıtılmış işleme uygulanmış ve soğutulmuş gıda ürünlerinin *B. cereus*'un hayatta kalması ve büyümesi için uygun bir ortam olabileceği belirtilmiştir (Granum ve Lindbäck, 2012). Pişirilmiş yiyeceklerin yüksek sıcaklıkta soğutulmaya bırakılması (14°C) ve oda sıcaklığında uzun süre saklanması gibi durumlarda *B. cereus* canlılığını korumakta ve yiyeceklerin tüketilmesi halinde insanlarda gıda zehirlenmesine sebep olabilmektedir (Dierick vd., 2005; Naranjo vd., 2011). Bu çalışmada, Çanakkale'den satın alınan pişmiş örneklerin %63,63'ünde muhtemel *B. cereus* saptanmış olup ortalama 4,18 log KOB/g düzeyinde muhtemel *B. cereus* yükü belirlenmiştir. Bursa ilinden satın alınan pişmiş kokoreç örnekleri arasında muhtemel *B. cereus* yükü açısından istatistiksel anlamda önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ( $P>0,05$ ). Bursa ilindeki örnekler ile Balıkesir ve Çanakkale illerindeki örnekler arasında muhtemel *B. cereus* yükü bakımından anlamlı derecede

farklılık belirlenmemiştir ( $P>0,05$ ). Genel olarak bakıldığında en yüksek muhtemel *B. cereus* sayısı Balıkesir ilindeki örneklerde belirlenmiş olup 4,88 log KOB/g düzeyinde olduğu belirlenmiştir (Tablo 10). En düşük muhtemel *B. cereus* yükü 3,13 log KOB/g düzeyinde olup İzmir ilinden temin edilen pişmiş örneklerde belirlenmiştir. Literatürde pişmiş kokoreç örneklerinde *Bacillus* spp. varlığı ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamakta olup çalışmamız bu konuda ilk verileri sağlamaktadır. Bu çalışmada saptanan muhtemel *B. cereus*'lar kromojenik bir besiyeri olan HiCrome *Bacillus* Agar besiyerinde saptanmış olup ileri tanımlama yapılmamıştır. Besiyeri üzerinde *B. cereus* tipik kolonileri sayılarak elde edilen sonuçlar verilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre tüketime hazır gıdalarda *B. cereus* 3-4 log KOB/g arasında olmaktadır (Anonim, 2022). Yapılan bu çalışmada sadece Balıkesir ilinden temin edilen pişmiş kokoreç örnekleri muhtemel *B. cereus* yükü bakımından belirlenen limitler içerisinde bulunmamaktadır. Bu nedenle örneklerden elde edilen muhtemel *B. cereus* izolatları doğrulandığında halk sağlığı açısından risk oluşturacaktır.

Gıdaların hazırlanması aşamasındaki hijyenik koşullar, gıdaların pişirilmesinden sonra soğutulma süresi ve gıdaların soğutulduktan sonra tekrar ısıtılması gibi durumlar *C. perfringens*'in gelişmesini teşvik edebilmektedir (Novak ve Juneja, 2002). Farklı illerdeki işletmelerden satın alınan pişmiş kokoreçlerin %11,11'inde (3/27) sülfid indirgeyen anaerobik bakteri sayısı saptanmıştır (Tablo 10). Çanakkale'den satın alınan örneklerin birinde (%9,09) sülfid indirgeyen anaerobik bakteri saptanırken Balıkesir'den satın alınan örneklerin 2 tanesinde (%40) sülfid indirgeyen anaerobik bakteri varlığı belirlenmiştir. Balıkesir ilinden temin edilen pişmiş kokoreçlerin arasında sülfid indirgeyen anaerobik bakteri sayısı açısından istatistiksel anlamda önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir ( $P>0,05$ ). Bursa ve İzmir'den satın alınan örneklerin hiçbirinde sülfid indirgeyen anaerobik bakteri sayısı tespit edilmemiştir. Genel olarak bakıldığında ise iller arasında sülfid indirgeyen anaerobik bakteri yükü bakımından anlamlı farklılık saptanmıştır ( $P<0,05$ ).

Bursa'da çiğ, pişmiş ve pişirilmiş baharatlanmış kokoreç örneklerinde toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB), koliform grubu, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. ve maya/küf yükleri araştırılmıştır (Temelli vd., 2002). Çiğ örneklerde TAMB sayısı 7,36 log KOB/g olarak saptanmış olup pişmiş örneklerde 5,00 log KOB/g düzeyinde bulunduğu belirtilmiştir. Pişirildikten sonra baharat eklenen kokoreç örneklerinde ise TAMB sayısında

artış gözlenmekte olup 5,55 log KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Çiğ kokoreç örneklerinde koliform grubu bakteriler 7,27 log KOB/g düzeyinde belirlenmiş olup pişmiş ve pişirilmiş baharatlanmış kokoreç örneklerinde koliform bakteri düzeyinde azalma saptanmış olup sırasıyla 4,38 ve 4,00 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Pişmiş ve pişirilmiş baharat eklenmiş kokoreç örneklerinde *E. coli* sayısının saptama sınırının altında belirlendiği görülmüştür. Çiğ, pişmiş ve pişirilmiş baharatlanmış kokoreç örneklerinde maya/küf miktarında istatistiksel anlamda önemli farklılık gözlemlenmediği belirtilmiştir ( $P>0,05$ ).

Isparta'da toplam 30 kokoreç örneğinde (10 adet çiğ, 10 adet pişmiş ve 10 adet pişmiş-baharatlı) TAMB, toplam koliform ve maya/küf yükleri araştırılmıştır. Çiğ örneklerde TAMB sayısı ortalama 7,39 log KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Pişmiş örneklerde TAMB sayısı ise ortalama 3,72 log KOB/g düzeyinde belirlenirken pişmiş-baharatlı kokoreç örneklerinde TAMB sayısı ortalama 6,04 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Çiğ örneklerde toplam koliform sayısı 5,11 log KOB/g düzeyinde iken pişmiş örneklerde saptama sınırının altına düşmüş olduğu belirtilmiştir. Pişmiş ve baharat eklenmiş kokoreç örneklerinde toplam koliform sayısı ise pişmiş örneklere göre önemli düzeyde artış göstermiştir (5,75 log KOB/g). Kokoreç örnekleri küf/maya yükleri açısından değerlendirildiğinde çiğ örneklerde ortalama 5,17 log KOB/g düzeyinde, pişmiş örneklerde saptama sınırının altında ve pişirilmiş baharatlanmış kokoreç örneklerinde ortalama 3,74 log KOB/g düzeyinde küf/maya yükü olduğu belirtilmiştir (Kılıç, 2016).

Tekirdağ'da toplam 60 kokoreç örneğinde (20 adet çiğ, 20 adet ızgarada pişirilmiş ve 20 adet tandırda pişirilmiş) toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB), koliform grubu, *E. coli*, *Salmonella* ve *S. aureus* yükleri araştırılmıştır. Çiğ kokoreç örneklerinde TAMB sayısı 6,07-8,07 log KOB/g arasında, koliform sayısının ortalama 4,34 log KOB/g düzeyinde ve *S. aureus* sayısının ise ortalama 3,50 log KOB/g düzeyinde saptandığı belirtilmiştir. Çiğ kokoreç örneklerinin hepsinde *E. coli* ve *Salmonella* saptandığı belirtilmiştir. Izgara ve tandırda pişirilmiş kokoreç örneklerinde TAMB sayısının sırasıyla 2,00-4,74 log KOB/g arasında ve ortalama 4,36 log KOB/g düzeyinde belirlenmiştir. Izgarada pişirilen kokoreç örneklerinin bir tanesinde *E. coli* ve *Salmonella* belirlenmiş olup tandırda pişirilen kokoreç örneklerin %70'inden *Salmonella* izole edildiği bildirilmiştir (Bilgin vd., 2008). Çalışmamızda ise İzmir ilinden temin edilen çiğ ve pişmiş kokoreç örneklerinde *E. coli* saptanmamıştır. Çanakkale'den temin edilen çiğ ve pişmiş

örneklerinde *E. coli* sayısı sırasıyla ortalama 3,36 log KOB/g ve 1,98 log KOB/g düzeyinde tespit edilmiştir.

Afyonkarahisar ilinde farklı lokanta ve sokak satıcılarında satılan 50 adet pişmiş kokoreç örneği genel mikrobiyolojik kalitesi bakımından incelenmiştir. Pişmiş kokoreç örneklerinde TAMB, koliform grubu, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. ve küf/maya yükleri sırasıyla 6,29 log KOB/g, 2,43 log KOB/g, 2,10 log KOB/g, 2,85 log KOB/g ve 5,89 log KOB/g düzeylerinde belirlenmiştir. (Kara vd.,2013). Çalışmamızda çiğ kokoreç örneklerinde toplam koliform yükü Kılıç vd., (2016)'nin çalışmasında belirlenen koliform grubu bakterilerin sayısından düşük olduğu ve Kara vd., (2013)'nin çalışmasında belirlenen koliform sayısı ile yakın düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Kokoreç örneklerinde *C. perfringens* araştıran çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesinde toplam 180 adet kokoreçte (60 adet çiğ, 60 adet ızgarada pişirilmiş ve 60 adet tandırda pişirilmiş) *C. perfringens* araştırılmış olup pişmiş örneklerin hiçbirinde *C. perfringens* saptanmamıştır. Farklı kasaplardan temin edilen 60 adet çiğ örnekte ise 18'inde (%45) *C. perfringens* varlığı belirlenmiştir. *C. perfringens*'in pişmiş kokoreç örneklerinde saptanmamasının işletmelerin pişirme sıcaklığı, hijyen ve sanitasyon koşullarına özellikle dikkat etmesinin önemini ortaya koymaktadır (Bilgin vd., 2016). Çalışmamızda farklı illerden temin edilen çiğ örneklerin %20'sinde sülfid indirgeyen anaerobik bakteri yükü belirlenmiş olup 2,07-2,90 log KOB/g düzeyinde saptanmıştır. Bu durum hammadde olan bağırsakların mikrobiyolojik kalitesinin düşüklüğü, bağırsakların temizlenme işleminde genel hijyen kurallarının uygulanmaması durumunu düşündürmektedir.

İstanbul'da tüketime sunulan bazı ızgara tipi gıdaların araştırıldığı çalışmada, pişmiş olarak satışa sunulan kokoreç örneklerinde sülfid indirgeyen anaerob bakteriler araştırılmıştır. Farklı işletmelerden toplam 15 adet pişmiş kokoreç örneğinin analize alındığı belirtilmiştir. Temin edilen pişmiş kokoreç örneklerinde sülfid indirgeyen anaerobik bakteri sayısının saptama sınırının altında olduğu bulunmuştur (Hampikyan vd., 2008). Çalışmamızda farklı illerden ve farklı işletmelerden alınan toplam 27 adet pişmiş kokoreç örneğinde sülfid indirgeyen anaerobik bakteri sayıları en yüksek Balıkesir ilinden temin edilen kokoreçlerde saptanmıştır (3,31 log KOB/g). Izgarada pişirilen ve tüketime sunulan gıdalarda merkez sıcaklığın derecesinin sabit tutulması önemli olup pişirme işleminin servisten hemen önce yapılması ve kokoreç gibi hassas gıdaların pişirildikten

sonra ızgara kenarında bekletilmemesi özellikle patojen bakteriler açısından önemli bir durumdur.

#### 4.2. Kokoreç Örneklerinden İzole Edilen Sülfite İndirgeyen Anaerobik Bakteri ve Şüpheli *C. difficile* İzolatlarının Tanımlanması

Çalışmamızda Çanakkale, Bursa, Balıkesir ve İzmir illerinden temin edilen 25 adet çiğ ve 27 adet pişmiş olacak şekilde toplam 52 adet kokoreç örneğinde *Clostridioides difficile* varlığı araştırılmıştır. Çiğ ve pişmiş kokoreç örneklerinden elde edilen olası *C. difficile* izolatları Tablo 11’de detaylıca açıklanmıştır.

Tablo 11

Kokoreç örneklerinden elde edilen şüpheli *C. difficile* izolat sayısı

Temin Edilen Yer	Örnek Türü	Toplam Örnek Sayısı	İzolat Alınan Örnek Sayısı	İzolat Sayısı	
				*CDCC	ChromID
Çanakkale	Çiğ	10	7	8	8
	Pişmiş	11	5	7	1
Bursa	Çiğ	5	5	7	7
	Pişmiş	5	5	8	1
İzmir	Çiğ	5	3	3	0
	Pişmiş	6	3	3	0
Balıkesir	Çiğ	5	1	1	0
	Pişmiş	5	3	3	2
<b>Toplam</b>	Çiğ	<b>25</b>	<b>16</b>	<b>19</b>	<b>15</b>
	Pişmiş	<b>27</b>	<b>16</b>	<b>21</b>	<b>4</b>

\*CDCC: *Clostridium difficile* Agar Base (Cycloserine-Cefoxitin)

CDCC besiyeri üzerinde gri-opak görüntüde ve at gübresi kokusuna sahip olan koloniler şüpheli *Clostridium difficile* olarak kabul edilirken, ChromID *C. difficile* Agar besiyerinde ise anaerobik ortamda 35-36 °C’de 24 saat inkübasyon sonunda siyah renk oluşturan kolonilerin tamamı şüpheli *C. difficile* olarak kabul edilmiştir. Çiğ kokoreç örneklerinin %60’ında (15/25) ChromID besiyeri ile tipik koloni elde edilirken, %76’sında (19/25) CDCC besiyeri ile tipik koloniler elde edilmiştir. Her besiyerinden en az bir koloni olacak şekilde izolat alınmıştır (Tablo 11).

Pişmiş kokoreç örneklerinden de her iki besiyerinde gelişen tipik kolonilerden izolat alınmıştır. 27 pişmiş kokoreç örneğinden CDCC besiyeri ile 21 izolat (%77,77),



ChromID besiyeri ile 4 izolat (%14,81) elde edilmiştir. Toplamda çiğ ve pişmiş 52 adet kokoreç örneklerinden CDCC besiyerinden 40 adet, ChromID besiyerinden 19 adet izolat elde edilmiştir.

Elde edilen izolatlar stok besiyeri olan Brain Heart Infusion (BHI) Broth'a alınmış ve 35-36°C'de 24-48 saat anaerobik koşullarda geliştirilerek ve stoklara gliserol (%17, v/v, Merck, Almanya) ilave edilerek -18°C'de saklanmıştır. Tekrar aktifleştirilerek Gram boyama yapılmış izolatlar arasından Gram pozitif ve çubuk görünümlü olan izolatlar ayrılmıştır. Gram boyama sonucunda ise her iki besiyerinden alınan 59 adet izolatın 6'sının (%10,16) Gram pozitif ve çubuk şeklinde olduğu belirlenmiştir. Diğer izolatların %89,83'ünün (53/59) Gram pozitif kok olduğu belirlenmiştir. Bu durum besiyerlerinin bu *C. difficile* belirlenmesinde yeterli ayırt ediciliği sağlamadığının göstergesi olmuştur. Gram pozitif ve çubuk görünümlü olan izolatların 5'i pişmiş olarak satılan kokoreçlerden, biri ise çiğ olarak satılan kokoreçlerden saptanmıştır. İzmir ilinden Gram pozitif ve çubuk görünümlü izolat elde edilmemiştir. Elde edilen izolatların 3'ü Çanakkale ilinden, 2'si Bursa ilinden ve biri de Balıkesir ilinden temin edilmiştir.

Kokoreç örneklerinden elde edilen sülfite indirgeyen anaerobik bakterilere ait tipik koloniler stoğa alınmış olup gliserol eklenerek -18°C'de saklanmıştır. Sülfite indirgeyen anaerobik bakteri izolatlarına gram boyama yapılmış olup %40'ı (10/25) Gram pozitif ve çubuk şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Gram pozitif ve çubuk şeklinde belirlenmiş olan sülfite indirgeyen anaerobik bakteri ve şüpheli *C. difficile* izolatları (toplam 16 izolat) RAPID ID 32A (Biomérieux, Fransa) ile tanımlanmıştır. RAPID ID 32A sonuçları değerlendirildiğinde kokoreçlerden izole edilen izolatların 7 tanesi *C. difficile*, diğerleri ise *C. perfringens* (1 adet), *C. bifementans* (3 adet), *Lactobacillus acidophilus* (3 adet), *Actinomyces naeslundii* (1 adet) ve *Gemella morbilorum* (1 adet) olarak saptanmıştır. *C. difficile* olarak belirlenen izolatların doğrulanması için gerçek zamanlı PCR kullanılmış olup sonuçlar detaylı bir şekilde Tablo 12 'de açıklanmıştır.

Tablo 12

## Elde edilen izolatların RAPID ID 32 A ve qPCR sonuçları

Örnek No	Besiyeri	Örnek Türü	Örneğin Temin Edildiği Yer	RAPID ID 32A	qPCR
K12	CDCC	Pişmiş	Çanakkale	<i>C. bifermentans</i> (%81,7) <i>C. difficile</i> (%17)	*TE
K14	CDCC	Pişmiş	Çanakkale	<i>C. bifermentans</i> (%81,7) <i>C. difficile</i> (%17)	TE
K20	CDCC	Pişmiş	Bursa	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (%97,4)	-
K36	CDCC	Çiğ	Bursa	<i>Gemella morbitorum</i> (%99,9)	-
K62	CDCC	Pişmiş	Çanakkale	<i>C. perfringens</i> (%99,9)	-
K27	ChromID	Pişmiş	Balıkesir	<i>Actinomyces naeslundii</i>	-
K25-2	TSCA	Çiğ	İzmir	<i>C. difficile</i> (%69,2) <i>C. bifermentans</i> (%18,6) <i>Clostridium glycolicum</i> (%8)	TE
K15-1	TSCA	Pişmiş	Bursa	<i>C. difficile</i> (%69,2) <i>C. bifermentans</i> (%18,6)	TE
K15-2	TSCA	Pişmiş	Bursa	<i>C. difficile</i> (%69,2) <i>C. bifermentans</i> (%18,6) <i>Clostridium glycolicum</i> (%8)	TE
K11-4	TSCA	Pişmiş	Çanakkale	<i>C. difficile</i> (%69,2) <i>C. bifermentans</i> (%18,6) <i>Clostridium glycolicum</i> (%8)	TE
K17-1	TSCA	Pişmiş	Bursa	<i>C. difficile</i> (%69,2) <i>C. bifermentans</i> (%18,6) <i>Clostridium glycolicum</i> (%8)	TE
K17-2	TSCA	Pişmiş	Bursa	<i>C. bifermentans</i> (%94,7) <i>C. difficile</i> (%3,1) <i>Clostridium glycolicum</i> (%2,2)	TE
K19-1	TSCA	Pişmiş	Bursa	<i>C. difficile</i> (%89,8) <i>C. bifermentans</i> (%6,38) <i>Clostridium glycolicum</i> (%3,81)	TE
K19-2	TSCA	Pişmiş	Bursa	<i>C. difficile</i> (%89,8) <i>C. bifermentans</i> (%6,38) <i>Clostridium glycolicum</i> (%3,81)	TE
K11-2	TSCA	Pişmiş	Çanakkale	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (%97,4)	-
K11-3	TSCA	Pişmiş	Çanakkale	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (%97,4)	-
<i>C. perfringens</i> NCTC 8237				<i>C. perfringens</i> (%99,9)	-
<i>C. difficile</i> ATCC 1870				<i>C. difficile</i> (%99,9)	<i>C. difficile</i>

\*TE: Tespit Edilmedi.

RAPID ID 32A tanı kitinin *C. difficile* olarak belirlediği çiğ örnek İzmir ilinden temin edilmiş olup pişmiş örneklerin 5 tanesi Bursa'dan ve bir tanesi Çanakkale ilinden temin edilen kokoreçlerden elde edilmiştir. Balıkesir ilinden temin edilen çiğ ve pişmiş kokoreç örneklerinin hiçbirinden *C. difficile* izole edilmemiştir.

Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSCA) besiyerinden elde edilen ve RAPID ID 32A hızlı tanı testine göre *C. difficile* olduğu belirlenen izolatlarda gerçek zamanlı PCR ile *C. difficile tpi* gen varlığı araştırılmıştır. Sonuçlara göre elde edilen izolatların hiçbirinde *C. difficile*'ye rastlanılmamıştır. İzolatların sülfid indirgeyen anaerobik bakteri varlığının araştırılması için kullanılan TSC Agar besiyerinden RAPID ID 32A tanı testine göre *C. difficile* olarak belirlenmesi durumu besiyerinin seçici özelliğindeki yeterliliği düşündürücü olmuştur. Çiğ ve pişmiş kokoreç örneklerinden alınan sülfid indirgeyen anaerobik bakteri izolatlarına yapılan tanımlamalar sonucunda hiçbirinde *C. perfringens* saptanmamıştır.

Hızlı tanı testi olan RAPID ID 32A'nın anaerob bakteri tanımlama konusunda bazı eksik kısımlarının olduğunu belirten çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, *C. difficile*, *C. bifermentans*, *C. perfringens* ve *C. sordelli*'nin birçok suşlarından oluşan klinik izolatları RAPID ID 32A hızlı tanı testi ile tanımlandığı bildirilmiştir. Toplam 55 klinik izolat mevcut olup bu izolatların sadece 10 tanesinin RAPID ID 32A ile doğru tanımlandığı belirtilmiştir (Fontana vd., 1995). Anaerob bakterilerden biri olan *C. difficile*'nin tanımlanmasında enzime dayalı tanımlama yöntemleri yeterli olmamaktadır. RAPID ID 32A gibi hızlı tanı test yöntemleriyle tanımlanan *C. difficile* izolatlarının moleküler olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile tanımlanıp doğrulanmasının daha güvenilir olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda RAPID ID 32A yöntemi ile *C. difficile* olduğu belirlenen izolatlar gerçek zamanlı PCR ile *tpi* gen varlığı açısından araştırılmış ve belirlenen izolatların hiçbirisi *C. difficile* olarak doğrulanmamıştır.

CDCC besiyerinden izole edilen ve RAPID ID 32A hızlı tanı testi ile *C. perfringens* olarak belirlenen izolatın RAPID ID 32A testindeki görünümü, TSC Agar besiyerindeki tipik görüntüsü ve mikroskoptaki görüntüsü Şekil 11 ve Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 11. *C. perfringens* olarak belirlenen izolatin RAPID ID 32A ile görüntüsü



**A**



**B**

Şekil 12. *C. perfringens* olarak belirlenen izolatin TSC Agar besiyerindeki görüntüsü (A) ve mikroskopik görüntüsü (B)

Sikloserin-sefoksitin antibiyotik ve kan katkılı besiyeri olan CDCC'den RAPID ID 32A sonucuna göre *C. perfringens* izole edilmiştir. *C. difficile* izolasyonunda kullanılan CDCC besiyerinde *C. perfringens*'in izole edilmesi durumu besiyerinin yeterliliği konusunda şüphe uyandırmıştır. *C. difficile* izolasyonu için bilinen mevcut yöntemler dışı örnekleri için standartlaştırılmış olup gıdalardan *C. difficile* izolasyonu için standart yöntemler hala tam olarak oturmamıştır. Bu konuda araştırmalar sürdürülmektedir. Besiyerine eklenen antibiyotik katkıları dışında örnek miktarı, inkübasyon koşulları ve süreleri, seyreltme faktörleri gibi farklılıkların gıdalardan *C. difficile* izolasyonunu etkileme ihtimali olduğu belirtilmektedir (Barbosa vd., 2020).

*C. difficile* ile ilgili yapılan birçok çalışma; su, et ve et ürünleri, gübre ve hayvan dışkıında *C. difficile* varlığını ortaya koymuştur (Weese vd., 2009; Janezic vd., 2016; Vidal vd., 2019; Lim vd., 2020b). *C. difficile*'nin bulaşı kaynakları arasında hayvanlarda olduğu bilinmekte olup hayvanların kesimi ve karkas haline getirilmesi sırasında kontaminasyon ihtimali yüksektir. Hayvan karkaslarında *C. difficile* varlığı araştırılan çalışmalar literatürde mevcuttur (Koene vd., 2012; Rodriguez vd., 2013). Farklı hayvanlardan elde edilen etlerde *C. difficile* varlığını araştıran çalışmalar bulunmakta olup kuzu, koyun, keçi, inek, sığır ve tavuk etlerinde *C. difficile* varlığı bildirilmiştir (Boer vd., 2011; Rahimi vd., 2014; Bakri, 2018).

Çalışmamızda elde edilen izolatların %6,25'i (1/16) *C. perfringens* olarak RAPID ID 32A ile tanımlanmıştır. Gıdalarda ve hayvanların bağırsaklarında *C. perfringens* varlığını araştırılan çalışmalar literatürde mevcuttur. Koyun bağırsaklarından alınan örneklerde *C. perfringens* varlığı araştırılan bir çalışmada, ELISA yöntemi kullanılmış ve bağırsakların %52,8'inde (37/70) *C. perfringens* varlığı tespit edilmiştir. *C. perfringens* saptanan örneklerde ELISA ile yapılan tiplendirme sonucuna göre A tipinin %32,4 (12/37), B tipinin %18,9 (7/37), C tipinin %24,3 (9/37) ve D tipinin %24,3 (9/37) düzeyinde tespit edildiği bildirilmiştir (Seyitoğlu vd., 2012).

Batı Kazakistan'da bulunan farklı şehirlerdeki et fuarlarından alınan, sığır ve kuzudan elde edilen toplam 240 örnekte *C. perfringens* varlığı araştırılmıştır. Sığır ve kuzuların eti, kıyması ve bağırsaklarından örnekler alınmış olup toplam 240 örneğin 67'sinde (%27,9) *C. perfringens* saptanmıştır. Kuzu bağırsağı örneklerinin %10'u, kuzu kıyma örneklerinin %40'ı, kuzu et örneklerinin %22,5'i, sığır et örneklerinin %50'si, sığır kıyma örneklerinin %27,5'i ve sığır bağırsaklarının %17,5'inde *C. perfringens* tespit edilmiştir. Tespit edilen *C. perfringens* suşlarının alfa toksin genine sahip olduğu belirlenmiştir (Issimov vd., 2022).

Bursa'da yapılan bir çalışmada ise, marketlerden ve kasaplardan temin edilen çiğ, pişmeye hazır ve yemeğe hazır et ve et ürünlerinde *C. perfringens* varlığı araştırılmıştır. Elde edilen izolatlar API 20A ile tanımlanmış ve qPCR ile doğrulanmıştır. Yemeğe hazır 25 adet kokoreç örneğinden 11 pozitif izolat tespit edilmiştir. Bu izolatların 6'sı (%24) API 20A testinde *C. perfringens* olarak tanımlanmıştır. Çiğ kokoreç örneklerinin %50'si (2/4) API 20A ile *C. perfringens* olarak tespit edilmiştir (Yibar vd., 2018). Benzer olarak

çalışmamızda pişmiş kokoreç örneklerinden elde edilen izolatlardan biri RAPID ID 32A ile *C. perfringens* olarak tanımlanmıştır.

Gıda hayvanlarının kesimi ve işlenmesi sırasında hijyen uygulamalarının ihmal edilmesi durumu bakteri yükünü etkileyebilmektedir (McClane vd., 2012). Geleneksel lezzetlerimizden biri olan kokoreç küçükbaş hayvanlarının bağırsağından yapılmakta olup bağırsak içeriğinde *C. perfringens*'in varlığı, kokorecin pişirme sıcaklığının yetersizliği ve kokoreç yapımı sırasında bağırsakların iyi temizlenememesi durumunda tüketici sağlığı açısından risk oluşturduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız RAPID ID 32A hızlı tanı testi, kromojenik substratlar üzerinde bakteriyel enzimlerin etkisinin değerlendirilmesine dayanmaktadır. Bu testin değerlendirildiği bazı çalışmalarda duyarlılığının yüksek olduğu belirlenmiştir. RAPID ID 32A ile 18 farklı *Clostridium* türüne ait 122 test suşunun tanımlanmasının araştırıldığı bir çalışmada, test suşlarının %90,2'sinin (110/122) 4 saat inkübasyon sonrasında doğru şekilde tanımlandığı belirtilmiştir. Yapılan bu çalışma gıda hijyeni alanında gıda izolatlarını kullanarak hızlı bir şekilde tanımlama sürecinin yararlılığı değerlendirilmiş olup, 49 *C. perfringens* test suşunun 37 farklı 10 haneli profil içermesine rağmen tüm suşların doğru bir şekilde tür düzeyinde tanımlandığı bildirilmiştir (Sperner vd., 1999).

#### **4.2.1. Kokoreç Örneklerinden Elde Edilen *C. perfringens* Suşunun Antibiyotik Direnç Profili**

*C. perfringens* olarak belirlenen izolatın epsilon test yöntemi ve disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç profili belirlenmiştir. EUCAST (2023) standardına göre meropenem (10µg), klindamisin (2µg) ve vankomisin (5µg) antibiyotikleri için inhibisyon zonları sırasıyla 25 mm, 19 mm ve 12 mm olarak belirtilmiştir. İnhibisyon zonları bu değerlerin altında ise dirençli, değerlerin üzerinde ise duyarlı olarak yorumlanmıştır. RAPID ID 32A hızlı tanı testi ile *C. perfringens* olarak tanımlanan izolat meropenem, vankomisin ve klindamisin antibiyotik disklerine karşı duyarlı olarak belirlenmiştir (Şekil 13). E-test yönteminde ise metronidazol, vankomisin ve klindamisin antibiyotiklerine karşı izolatın antibiyotik direnç profili belirlenmiştir. Bu antibiyotikler için standarda göre belirlenen MİK değerleri vankomisin için 2 µg/mL, metronidazol için 4 µg/mL ve klindamisin için 0,25 µg/mL olarak belirtilmiştir. *C. perfringens* olduğu belirlenen izolat vankomisin ve klindamisin antibiyotiğine karşı duyarlı olup metronidazole karşı direnç

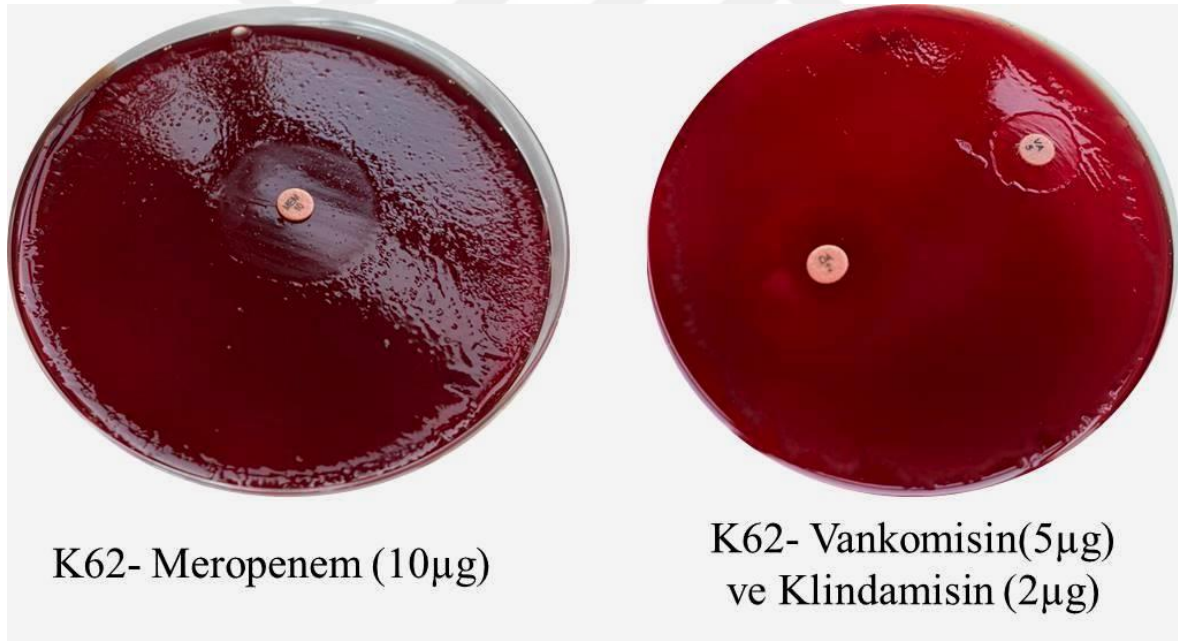
gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 14). RAPID ID 32A ile *C. perfringens* olarak tanımlanan izolatin antibiyotiklere karşı oluşturduğu MİK değerleri Tablo 13’de belirtilmiştir.

Tablo 13

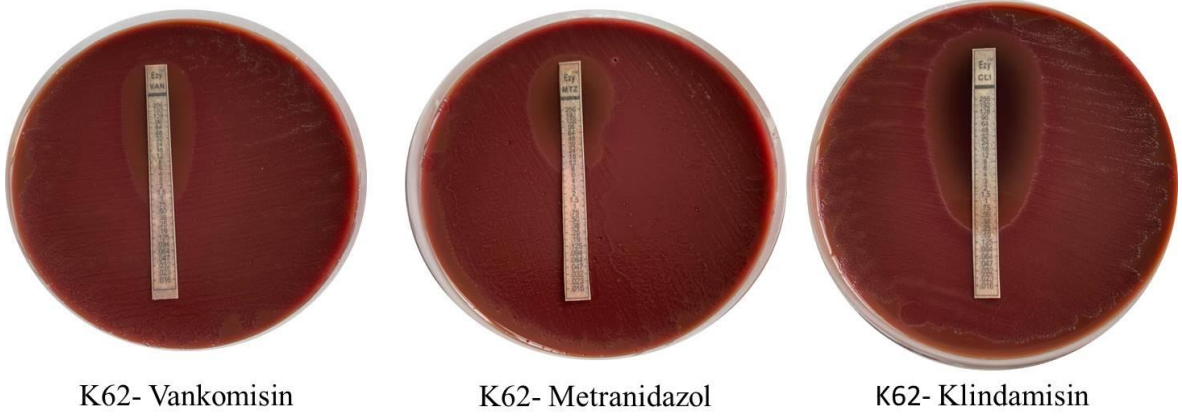
Disk difüzyon ve E-test yöntemi ile belirlenen MİK değerleri

MİK değeri						
İzolat	Disk Difüzyon Testi			E-Test		
	Zon (mm)			(0.016-256 µg/mL)		
	Vankomisin (5 µg)	Klindamisin (2 µg)	Meropenem (10 µg)	Vankomisin	Klindamisin	Metronidazol
K62	*15.38±0.09	25.29±0.31	29.34±1.39	0,75	0,25	8

\*Zon değerleri ortalama±standart hata olarak verilmiştir.



Şekil 13. *C. perfringens* olarak belirlenen izolatin disk difüzyon sonuçları



Şekil 14. *C. perfringens* olarak belirlenen izolatın E-test sonuçları

#### 4.2.2. Kokoreç Örneklerinden Elde Edilen *C. perfringens* Suşunun Biyofilm Oluşturma Kapasitesi

*C. perfringens* olduğu belirlenen izolatın biyofilm oluşturma kapasiteleri kristal viyole mikrotitre plak yöntemi ile incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak standart suşlardan biri olan *C. perfringens* NCTC 8237 suşu kullanılmıştır. Anaerob koşullarda 48 saat inkübasyon sonucunda mikropak okuyuculu spektrofotometrede belirlenen optik yoğunluk (OD) değerlerine göre bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri değerlendirilmiştir (Tablo 7). İzolatların optik yoğunluk ortalaması “OD” olarak belirtilirken negatif kontrolün optik yoğunluk ortalaması “OD<sub>c</sub>” olarak değerlendirilmiştir. İzolatların ortalama OD değeri, negatif kontrolün ortalama OD değerinden düşük veya eşit ise biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir. Ancak “OD<sub>c</sub> < OD ≤ 2 × OD<sub>c</sub>” durumunda zayıf biyofilm oluşumu, “2 × OD<sub>c</sub> < OD ≤ 4 × OD<sub>c</sub>” durumunda orta derecede biyofilm oluşumu ve “4 × OD<sub>c</sub> < OD” durumunda güçlü oranda biyofilm oluşumu olduğu belirtilmektedir.

Çalışmamızda RAPID ID 32A hızlı tanı testi ile *C. perfringens* olarak belirlenmiş olan izolat Çanakkale ilinden temin edilen pişmiş kokoreç örneklerinden izole edilmiştir. Elde edilen *C. perfringens* izolatının biyofilm oluşturma yeteneği 0,061 olarak belirlenmiş olup zayıf düzeyde biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Ancak standart suşlardan biri olan *C. perfringens* NCTC 8237'nin biyofilm oluşturma kapasitesi ise 0,119 düzeyinde orta derecede biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir.

Bakteriler fiziksel ve çevresel stres koşullarında hayatta kalabilmek için biyofilm üretebilmektedirler (Hall-Stoodley vd., 2004). *C. baratii*, *C. fallax*, *C. perfringens*, *C.*



*bifermentans*, *F. magna* ve *C. difficile* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırıldığı bir çalışmada, *C. difficile* hariç diğer bakterilerin güçlü biyofilm oluşturduğu belirlenirken *C. difficile* suşunun orta düzeyde biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir (Donelli vd., 2012). *C. perfringens*'in farklı suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri değerlendirildiğinde, *C. perfringens* suşlarının güçlü oranda biyofilm oluşturma yeteneklerini açıklayan çalışmalar mevcuttur (Hu vd., 2021). Domuz, kümes hayvanları, insanlar ve diğer hayvanlardan izole edilen *C. perfringens* izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin değerlendirildiği çalışmada, test edilen *C. perfringens* izolatlarının %83.03'ünün (230/277) biyofilm üretebilme yeteneklerinin olduğunu bildirilmiştir. Standart suşlardan biri olan *C. perfringens* ATCC 13124 suşunun ise zayıf düzeyde biyofilm oluşturabildiği bildirilmiştir (Charlebois vd., 2014).

## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Kokoreç, kuzu ve koyunların ince bağırsaklarının temizlenmesi ve yağlarla birlikte şişlere sarılarak tekniğine göre ızgara veya tandırda pişirildikten sonra satışa sunulan sokak yemeklerinden birisidir. Ürün hammaddesi gereği hayvan dışkısı ile kontaminasyon ihtimali yüksek olduğundan dolayı özellikle bağırsakların temizlenmesi kısmında hijyen ve sanitasyon koşullarına dikkat edilmelidir. Çiğ kokoreç örneklerinde saptanmış olan riskli mikroorganizmaların varlığı, kokorecin hazırlanması sırasında hijyene gerekli önemin verilmediğini ortaya koymaktadır. Kokoreçlerde pişirme işleminde süre ve sıcaklık parametrelerine dikkat edilmesi gerekmektedir. Kokoreçler servis edilmeden hemen önce pişirilmeli ve pişirildikten sonra ızgara kenarında bekletilmemelidir. Bekletilmesi durumunda sporlu bakterilerin tekrar vejetatif forma geçmesi söz konusu olmakta ve halk sağlığı açısından risk taşıyabilmektedir. Önceki yapılan çalışmalar sonucunda kokoreçlere pişirildikten sonra baharat eklenmesi durumunda, kokoreçlerde mikroorganizma varlığının arttığı belirlenmiş olup tüketici sağlığı açısından risk taşıdığı bildirilmiştir. Bu durum ilave edilen baharatların mikrobiyal kalitesinin düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Çalışmamızda toplam 52 adet farklı işletmeden kokoreç temin edilmiştir. Toplamda 140 örnek analize alınmıştır. Örneklerin genel mikrobiyolojik kaliteleri incelendiğinde çiğ örneklerdeki mikrobiyal yükün yeterli ısıl işlem uygulanan pişmiş kokoreç örneklerinde azaldığı gözlemlenmiştir. Çiğ kokoreç örneklerinde en yüksek toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayısı Çanakkale ilinden temin edilen örneklerde tespit edilmiştir (6,18 log KOB/g). Çiğ kokoreç örneklerindeki TAMB yükünün yüksek olması kokorecin hammaddesi olan bağırsakların mikrobiyal yükünün fazla olduğunu ve bağırsakların temizlenmesi aşamasında hijyen koşullarının ihmal edildiğinin bir göstergesi olmuştur.

Farklı illerden temin edilen çiğ kokoreç örneklerinin %96'sında (24/25) *Staphylococcus* spp. yükü belirlenmiştir. Kokoreç örneklerinden izole edilen *Staphylococcus* spp. izolatlarına koagülaz testi yapılmış ve elde edilen izolatların tamamı koagülaz negatif belirlenmiştir. Kokoreç örneklerinden tespit edilen koagülaz negatif stafilkokların (KNS) varlığı genellikle kokorecin işlendiği ortamın ve personelin hijyen eksikliğinden dolayı kaynaklanabilmektedir.

Kuzu, koyun gibi hayvanların bağırsaklarının su ile temizlendikten sonra şişlere sarılmasıyla üretilen kokorecin, bağırsakların temizlenmesi aşamasında kullanılacak suyun kalitesi oldukça önemlidir. Bağırsaklarda bulunan fekal bakterilere ek olarak sudan gelebilecek olan fekal kontaminasyon kokorecin kalitesi ve halk sağlığı açısından risk taşımaktadır. Çalışmamızda kokoreç örneklerinde belirlenen toplam koliform yükleri, diğer çalışmalardaki toplam koliform yüklerine kıyasla benzer sonuçları içerdiği tespit edilmiştir. Ek olarak çalışmamızda farklı illerden temin edilen kokoreç örneklerinde *Salmonella*'ya rastlanılmamıştır. Kokoreç örneklerinde yapılan benzer çalışmaların birinde çiğ kokoreçlerde *Salmonella* saptanırken, diğer bir benzer çalışmada ise sonuçların çalışmamız ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Kokoreç örneklerinde *B. cereus* varlığını araştıran çalışmaya önceki yapılan çalışmalarda rastlanılmamıştır. Çiğ ve pişmiş kokoreç örneklerinde muhtemel *B. cereus* varlığı HiCrome *Bacillus* Agar kromojenik besiyeri ile incelenmiştir. Çalışmamızda kokoreçlerden elde edilen muhtemel *B. cereus* izolatlarına ileri düzey tanımlama yapılamamıştır. Bu besiyerinden elde edilen muhtemel *B. cereus* izolatlarının doğrulanması önerilmektedir. Çalışmamızda besiyerindeki muhtemel *B. cereus* tipik koloniler sayılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Pişmiş kokoreçlerin oda sıcaklığında saklanması veya müşteri azlığından dolayı tezgah kenarında bekletilmesi gibi durumlarda *B. cereus*'un canlılığını koruduğu düşünülmekte ve kokoreçlerin tüketilmesi durumunda insanlarda gıda zehirlenmesine neden olabilmektedir.

Hammaddesi bağırsak olan kokoreçte pişmiş örneklerin %11,11'inde (3/27) sülfid indirgeyen anaerobik bakteriler saptanmış olup 2,21-3,31 log KOB/g arasında yük belirlenmiştir. Pişmiş kokoreç örneklerinde sülfid indirgeyen anaerobik bakterilerin varlığı, pişirme sıcaklığı ve süresi, personel hijyen ve sanitasyon kısımlarında eksikliklerin olduğu düşünülmektedir. Çiğ kokoreç örneklerinde de sülfid indirgeyen anaerobik bakterilerin varlığı hammaddenin bağırsak olması nedeniyle genel mikrobiyal yükün fazla olması ve bağırsak temizleme işleminin yetersiz olması gibi durumlardan kaynaklandığı söylenebilir.

Çalışmamızda çiğ kokoreç örneklerinde belirlenmiş olan patojen mikroorganizmaların varlığı, bağırsakların yıkanması ve temizlenmesi aşamasında, kokoreçlerin hazırlık aşamalarında hijyen ve sanitasyona yeterli önemin gösterilmediği düşünülmektedir. Ayrıca çiğ kokoreçlerde bulunan patojen mikroorganizmalar, hammadde olan bağırsağın mikrobiyolojik kalitesinin düşük olduğunu göstermektedir. Pişmiş

kokoreçlerde patojen mikroorganizmaların bulunması ise, kokoreçlerin pişirme sıcaklığı ve pişirme süresi açısından yeterli olmadığının bir göstergesidir.

Kokoreç örneklerinden elde edilen *C. difficile* ve sülfite indirgeyen anaerobik bakteri izolatları RAPID ID 32A ile biyokimyasal olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan izolatların %6,25'inde (1/16) *C. perfringens* tespit edilmiştir. Elde edilen izolat Çanakkale ilinden temin edilen pişmiş kokoreç örneklerinden izole edilmiştir. *C. perfringens* olarak tanımlanan izolat meropenem, vankomisin ve klindamisin antibiyotik disklerine karşı duyarlı olarak belirlenirken, E-test ile belirlenen sonuçlar değerlendirildiğinde ise vankomisin ve klindamisin antibiyotiğine karşı duyarlı olduğu ancak metronidazole karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. Bu durum kokoreç tüketiminden gelebilecek olası bir zehirlenme durumunda tedavide kullanılacak antibiyotiklerin belirlenmesinde önemlidir. Mikroorganizmalar çevre tarafından gelen streslere karşı hayatta kalabilmek için biyofilm üretebilirler. *C. perfringens* olarak belirlediğimiz izolatın, zayıf biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir. Standart *C. perfringens* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneği araştıran çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiştir (Charlebois vd., 2014).

Bağırsak kökenli bir bakteri olduğu bilinen *C. difficile*'nin, hammaddesi küçükbaş hayvan bağırsakları olan kokoreçte bulunabileceği düşünülmüştür. Ancak çalışmamızda analize alınan çiğ ve pişmiş kokoreç örneklerinden *C. difficile* izole edilmemiştir. Ülkemizde gıdalarda *C. difficile* varlığı araştırılan çalışmaların sayısının az olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda *C. difficile* izolasyonu için kullanılan %7 at kanı ve sefoksitin-sikloserin antibiyotik katkılı *C. difficile* Agar Base (CDCC) ve ChromID *C. difficile* Agar besiyerleri tercih edilmiştir. Bu besiyerlerinden elde edilen izolatlar RAPID ID 32A ile biyokimyasal olarak tanımlanmış ve şüpheli *C. difficile* izolatları tespit edilmiştir. Şüpheli *C. difficile* izolatları gerçek zamanlı PCR (qPCR) ile doğrulanmış ve kokoreç örneklerinin hiçbirinde *C. difficile* varlığı belirlenmemiştir. Ancak CDCC besiyerinden elde edilen bir izolat *C. perfringens* olarak RAPID ID 32A ile tanımlanmıştır. Sülfite indirgeyen anaerobik bakterilerin sayımı için kullanılan TSCA besiyerinden RAPID ID 32A biyokimyasal testine göre *C. difficile* olarak belirlenen izolatların eldesi, kullanılan besiyerinin seçici özelliğinin yeterli olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca *C. difficile* izolasyonu için kullanılan CDCC besiyerinden RAPID ID 32A biyokimyasal testine göre *C. perfringens* tespit edilmesi durumu da izolasyon aşaması için kullanılan besiyerlerinin eksikliği konusunda şüphe uyandırmaktadır.

*C. difficile* izolasyonu için belirlenen yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiği ve *C. difficile* olduğu düşünölen izolatların tanımlanmasında yöntem olarak eksiklikler olduğu başka çalışmalarda da belirtilmektedir. Bu nedenle *C. difficile*'nin gıdalardan izolasyonu için yeni yöntemlerin standardize edilmesi önerilmektedir.



## KAYNAKÇA

- Abay, S., Ahmed, E. F., Aydın, F., Karakaya, E., ve Müştak, H. K. (2022). “Presence of *Clostridioides difficile* in Cattle Feces, Carcasses, and Slaughterhouses: Molecular Characterization and Antibacterial Susceptibility of the Recovered Isolates”. *Anaerobe*, 75, 102575. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102575>
- Acar, A. (2016). “Yerli ve Yabancı Fastfood Ürünlerinin Gençlerin Tercih Nedenlerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Alan Çalışması: Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Örneği”. *Sosyal ve Beşeri Bilimler Araştırma Dergisi*, 17(3), 1–24.
- Akbulut, O. (2010). İstanbul İlinde Hazır Yemek Üreten Firmaların Ürettikleri Yemeklerin Bazı Patojen Bakteriler Bakımından İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Akgöl, M., Alan, S. ve Öksüztepe, G. (2023). “Elazığ’da Tüketime Sunulan Kokoreçlerin Mikrobiyolojik Kalitesi”, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 37(2), 114-121.
- Akkaya, E., ve Hampikyan, H. (2019). “*Clostridioides (Clostridium) difficile* and its Presence in Food”. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 49(4), 175–185. <https://doi.org/10.5222/tmcd.2019.175>
- Alataş, Z., ve Güner, A. (2018). “*Clostridium difficile*: Is it a New Food-borne Pathogen?” *Ataturk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 13(3), 389–396. <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.364311>
- Albayrak, A., ve Yıldırım, Ö. (2019). “Yabancı Turistlerin İstanbul Sokak Yemeklerini Değerlendirmeleri Üzerine Bir Çalışma”. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 7(2), 1077–1092. <https://doi.org/10.21325/jotags.2019.409>
- Allart, J. G., Van Asten, A. J., ve Gröne, A. (2013). “Predisposing Factors and Prevention of *Clostridium perfringens*-associated Enteritis”, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36(5), 449-464. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.05.001>

- Altaş, A., ve Varnacı Uzun, F. (2017). “Üniversite Öğrencilerinin Yemek Tercihleri: Aksaray Üniversitesi Öğrencileri Üzerine Bir Çalışma”. *Journal of Human Sciences*, 14(4), 4435. <https://doi.org/10.14687/jhs.v14i4.5113>
- Angelidis, A. S., Chronis, E. N., Papageorgiou, D. K. ve Kazakis, I. I. (2006). “Non-lactic Acid, Contaminating Microbial Flora in Ready-to-eat Foods : A Potential Food-Quality Index”. *Food Microbiology*, 23, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.015>
- Anonim. (2022). “Türk Gıda Kodeksi, Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği”. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara, 21.11.2022.
- Aruwa, C., ve Akinyosoye, F. (2015). “Microbiological Assessment of Ready-to-Eat Foods (RTEs) for the Presence Bacillus Species”. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 3(4), 145–152. <https://doi.org/10.9734/jabb/2015/17407>
- Asal Ulus, C. (2021). “*Salmonella* Bakterisinin Gıdalarda Varlığı”. *Samsun Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(1), 28–34. <https://doi.org/10.47115/jshs.695685>
- Athira, C. K., Milton, A. A. P., Reddy, A., Mekhemadhom Rajendrakumar, A., Abhishek, Verma, M. R., Kumar, A., Nagaleekar, V. K. ve Agarwal, R. K. (2018). “Diversity of Toxin-genotypes Among *Clostridium perfringens* Isolated from Healthy and Diarrheic Neonatal Cattle and Buffalo Calves”. *Anaerobe*, 49, 99–102. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.001>
- Avberšek, J., Pirš, T., Pate, M., Rupnik, M., ve Ocepek, M. (2014). “*Clostridium difficile* in Goats and Sheep in Slovenia: Characterisation of Strains and Evidence of Age-related Shedding”. *Anaerobe*, 28, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.06.009>
- Aydın A., Sudagidan M. ve Muratoglu K. (2011). “Prevalence of Staphylococcal Enterotoxins, Toxin Genes and Genetic-relatedness of Foodborne *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in the Marmara Region of Turkey”. *International Journal of Food Microbiology*, 148 (2): 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.007>
- Bacheno, H., Ahmadi, M., Fazeli, F., ve Ariaii, P. (2022a). “Antibiotic Resistance of *Clostridioides difficile* Isolated From Bovine, Vone And Caprine Raw

- Meat”. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 9721-9726.  
<https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.S09.1136>
- Bacheno, H., Ahmadi, M., Fazeli, F., ve Ariaii, P. (2022b). “*Clostridioides difficile* in Foods with Animal Origins; Prevalence, Toxigenic Genes, Ribotyping Profile, and Antimicrobial Resistance”. *Journal of Food Quality*, 1-12.  
<https://doi.org/10.1155/2022/4868409>
- Bakri, M. (2018). “Prevalence of *Clostridium difficile* in Raw Cow, Sheep, and Goat Meat in Jazan, Saudi Arabia”. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(4), 783–785.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.07.002>
- Bakri, M. M., Brown, D. J., Butcher, John P. ve Sutherland, A. D. (2009). “*Clostridium difficile* in Ready-to-Eat Salads, Scotland”. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 817–818. <https://doi.org/10.3201/eid1505.081186>
- Bazaid, F. (2012). Distribution and Sources of *Clostridium difficile* (Issue December). Yüksek Lisans Tezi. The University of Guelph, Kanada.
- Benenson, A. S. (1995). “Control of Communicable Diseases Manual”. In *Control of Communicable Diseases Manual*. American Public Health Association., Washington, USA.
- Bilgehan, H. (2000). “Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları”. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi: İzmir, 487.
- Bilgin, B., Makarnacı, N. ve Palabiyik, İ. (2016). “The Effect of Different Cooking Process on Microbiological Quality of Kokorec”. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 05(05), 6–8.  
<https://doi.org/10.15623/ijret.2016.0505002>
- Bilgin, B., Makarnacı, N. ve Yılmaz, İ. (2008). “Çiğ ve Farklı Metotlarla Pişirilen Kokoreçlerin Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi”. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 4, 587–590.
- Bishara, J., Bloch, Y., Garty, M., Behor, J., ve Samra, Z. (2006). “Antimicrobial Resistance of *Clostridium difficile* Isolates in a Tertiary Medical Center, Israel”. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54, 141–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.09.008>



- Boer, E. D., Zwartkruis-nahuis, A., Heuvelink, A. E., Harmanus, C., ve Kuijper, E. J. (2011). "International Journal of Food Microbiology Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in The Netherlands". *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 561–564. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.007>
- Bouttier, S., Barc, M.-C., Felix, Benjamin; Lambert, S., Collignon, A. ve Barbut, F. (2010). "*Clostridium difficile* in Ground Meat, France". *Emerging Infectious Diseases*, 16(4), 733–735. <https://doi.org/10.1086/517951>
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R. ve Swaminathan, B. (2000). "*Salmonella* Nomenclature". *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465–2467. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000>
- Brynstad, S. ve Granum, P. E. (2002). "*Clostridium perfringens* and Foodborne Infections". *International Journal of Food Microbiology*, 74(3), 195–202. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00680-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00680-8)
- Bull, A. L., Worth, L. J. ve Richards, M. J. (2012). "Implementation of Standardised Surveillance for *Clostridium difficile* Infections in Australia: Initial Report from the Victorian Healthcare Associated Infection Surveillance System". *Internal Medicine Journal*, 42(6), 715–718. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2012.02804.x>
- Busconi, M., Zacconi, C. ve Scolari, G. (2014). "Bacterial ecology of PDO copa and pancetta piancentina at the end of ripening and after MAP storage of sliced product". *International Journal of Food Microbiology*, 172: 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.023>
- Canbolat, E. ve Çakıroğlu, F. P. (2016). "Üniversite Öğrencilerinin Fast-Food Tüketim Alışkanlıkları". *The Journal of Academic Social Sciences*, 26(26), 473–473. <https://doi.org/10.16992/asos.1158>
- Candel-Pérez, C., Ros-Berruezo, G., ve Martínez-Graciá, C. (2019). "A Review of *Clostridioides [Clostridium] difficile* Occurrence Through the Food Chain". *Food Microbiology*, 77(May 2018), 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.012>
- Cao, C., Zhao, W., Lü, Z., Mo, Y., Hu, W., Sun, S., Cheng, H., Ma, J., Xiong, S., Jin, X., Yang, H., Bai, L., Cui, S. ve Yang, B. (2023). "Microbiological Analysis and Characterization of *Salmonella* and Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* Isolates

- Recovered from Retail Fresh Vegetables in Shaanxi Province, China”. *International Journal of Food Microbiology*, 387, 110053. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110053>
- Capita, R., Álvarez-Astorga, M., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., ve del Camino García-Fernández, M. (2003). “Occurrence of *Salmonella* in Retail Chicken Carcasses and Their Products in Spain”. *International Journal of Food Microbiology*, 81(2), 169-173. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00195-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00195-2)
- Carrasco, E., Morales-rueda, A. ve García-gimeno, R. M. (2012). “Cross-contamination and Recontamination by *Salmonella* in Foods: A Review”. *Food Research International*, 45(2), 545–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004>
- Charlebois, A., Jacques, M. ve Archambault, M. (2014). “Biofilm Formation of *Clostridium perfringens* and its Exposure to Low-dose Antimicrobials”. *Frontiers in Microbiology*, 5, 183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00183>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Approved Standard-eighth edition. CLSI document M11-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards.
- Cooper, K. K., Bueschel, D. M. ve Songer, J. G. (2013). “Presence of *Clostridium perfringens* in Retail Chicken Livers”. *Anaerobe*, 21, 67–68. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.013>
- Crowther, G. S., Chilton, C. H., Todhunter, S. L., Nicholson, S., Freeman, J., Baines, S. D. ve Wilcox, M. H. (2014). “Development and Validation of a Chemostat Gut Model to Study Both Planktonic and Biofilm Modes of Growth of *Clostridium difficile* and Human Microbiota”. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088396>
- Crump, J. A. ve Mintz, E. D. (2010) “Global Trends in Typhoid and Paratyphoid Fever” *Clinical Infectious Diseases*, 50 (2) pp. 241-246. <https://doi.org/10.1086/649541>
- Cumhur, Ö. (2020). “Sokak Gıdalarının Güvenliği İçin Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi”. *Food and Health*, 6(2), 128–139. <https://doi.org/10.3153/FH20014>

- Cunha, M. L. R. S., Peresi, E., Calsolari, R. A. O. ve Júnior, J. P. A. (2006). “Detection of Enterotoxins Genes in Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From Foods”. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:70-74. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100013>.
- Çakıcı, N., Demirel-Zorba, N. N. ve Akçalı, A. (2015). “Gıda Endüstrisi Çalışanları ve Stafilocokal Gıda Zehirlenmeleri” *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(4), 337-350. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2015.21704>
- Çakıcı, C., Bektarım, N. ve Ballı, E. (2019). “Sokak Lezzetleri Tüketim Sıklığı”. *Üçüncü Uluslararası Turizmin Geleceği Kongresi: İnovasyon, Girişimcilik ve Sürdürülebilirlik*, October, 678–684.
- Çevik Telekoğlu, M. (2019). Piyasada Satılan Etlerde *Salmonella spp.* ve *E. coli O157:H7* Varlığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar.
- Đapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S. A., Scarselli, M., Minton, N. P., Serruto, D. ve Unnikrishnan, M. (2013). “Multiple Factors Modulate Biofilm Formation by the Anaerobic Pathogen *Clostridium difficile*”. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 545-555. <https://doi.org/10.1128/jb.01980-12>.
- Davey, M. E., ve O'toole, G. A. (2000). “Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847-867. <https://doi.org/10.1128/mnbr.64.4.847-867.2000>
- Davies, D. (2003). “Understanding Biofilm Resistance to Antibacterial Agents”. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114-122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Dennison, A. C., VanMetre, D. C., Callan, R. J., Dinsmore, P., Mason, G. L. ve Ellis, R. P. (2002). “Hemorrhagic Bowel Syndrome in Dairy Cattle: 22 Cases (1997-2000)”. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(5), 686–689. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.686>
- Dharmasena, M., ve Jiang, X. (2018). “Isolation of Toxigenic *Clostridium difficile* from Animal Manure”. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(16), 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.00738-18>.

- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M. ve Mahillon, J. (2005). "Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning". *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4277-4279. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4277-4279.2005>
- Donelli, G., Vuotto, C., Cardines, R. ve Mastrantonio, P. (2012). "Biofilm-Growing Intestinal Anaerobic Bacteria". *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 318-325. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00962.x>
- Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., Salamoura, A., Kansouzidou, A. ve Levidiotou, S. (2003). "Isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from Foods in Greece", *International Journal of Food Microbiology*, 82(3), 273-279. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00313-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00313-6)
- Efe, M. ve Gümüşsoy, K. S. (2005). "Ankara Garnizonu'nda Tüketime Sunulan Tavuk Etlerinin Mikrobiyolojik Analizi", *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 14(3), 151-157.
- Eng, S., Pusparajah, P., Mutalib, N. A., Ser, H., Chan, K., ve Lee, L. (2015). "Frontiers in Life Science *Salmonella* : A Review on Pathogenesis, Epidemiology and Antibiotic Resistance". *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Erol İ. (2007). "Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi". Pozitif Matbaacılık: Ankara.
- Erol, İ., Goncuoglu, M., Ayaz, N. D., Ormanci, F. S. B., ve Hildebrandt, G. (2008). "Molecular Typing of *Clostridium perfringens* Isolated from Turkey Meat by Multiplex PCR". *Letters in Applied Microbiology*, 47, 31-34. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02379.x>
- Ersöz, Ş. Ş. ve Coşansu, S. (2014). "*Clostridium difficile* : Özellikleri ve Gıdalarla İlişkisi", *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(3), 58-68.
- Ersöz, Ş. Ş. ve Coşansu, S. (2018). "Prevalence of *Clostridium difficile* Isolated from Beef and Chicken Meat Products in Turkey". *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(4), 759-767. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e14>
- Esfandiari, Z., Jalali, M., Ezzatpanah, H. ve Weese, J. S. (2014). "Prevalence and Characterization of *Clostridium difficile* in Beef and Mutton Meats of Isfahan

Region, Iran”. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(8), 1–5.  
<https://doi.org/10.5812/jjm.16771>

European Food Safety Authority (EFSA) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008 *EFSA Journal*, 8(1) (2010), p. 1496

European Food Safety Authority [EFSA] Scientific opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (bovine animals) *EFSA Journal*, (2013);11:3266.  
doi: 10.2903/j.efsa.2013.3266.

Food Drug Administration (2013). “Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins”. [www.fda.gov.tr](http://www.fda.gov/tr). Bad Bug Book,

Fontana, C., Jezzi, T., Testore, G. P. ve Dainelli, B. (1995). “Differentiation of *Clostridium difficile*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordellii*, and *Clostridium perfringens* from Diarrheal Stool by API ZYM and API LRA Oxidase Test”. *Microbiology and Immunology*, 39(4), 231-235. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb02194.x>.

Forti, K., Ferroni, L., Pellegrini, M., Cruciani, D., Giuseppe, A. De, Crotti, S., Papa, P., Maresca, C., Severi, G., Marenzoni, M. L. ve Cagiola, M. (2020). “Molecular Characterization of *Clostridium perfringens* Strains Isolated in Italy”. *Toxins*, 12(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/toxins12100650>

Frentrup, M., Thiel, N., Junker, V., Behrens, W., Münch, S., Siller, P., Kabelitz, T., Faust, M., Indra, A., Baumgartner, S., Schepanski, K., Amon, T., Roesler, U., Funk, R. ve Nübel, U. (2021). “Agricultural Fertilization with Poultry Manure Results in Persistent Environmental Contamination with the Pathogen *Clostridioides difficile*”. *Environmental Microbiology*, 00. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15601>

Garbaj, A. M., Gawella, T. B. B., Sherif, J. A., Naas, H. T., Eshamah, H. L., Azwai, S. M., Gammoudi, F. T., Abolghait, S. K., Moawad, A. A., Barbieri, I. ve Eldaghayes, I. M. (2022). “Occurrence and Antibigram of Multidrug-resistant *Salmonella enterica* Isolated from Dairy Products in Libya”. *Veterinary World*, 15(5), 1185. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1185-1190>

- García, S., ve Heredia, N. (2011). “*Clostridium perfringens*: A Dynamic Foodborne Pathogen”. *Food and Bioprocess Technology*, 4(4), 624–630. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0182-2>
- Gebeyehu, A., Taye, M. ve Abebe, R. (2022). “Isolation, Molecular Detection and Antimicrobial Susceptibility Profile of *Salmonella* from Raw Cow Milk Collected from Dairy Farms and Households in Southern Ethiopia”, *BMC Microbiology*, 22(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02504-2>
- Ghose, C. (2013). “*Clostridium difficile* Infection in the Twenty-first Century”. *Emerging Microbes & Infections*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.62>
- Gibbons, I., Adesiyun, A., Seepersadsingh, N. ve Rahaman, S. (2006). “Investigation for Possible Source of Contamination of Ready-to-eat meat Products with *Listeria* spp . and Other Pathogens in a Meat Processing Plant in Trinidad”. *Food Microbiology*, 23, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.05.008>
- Gökmen, M., Kara, R. ve Önen, A. (2016). “Prevalence of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in Some Ready to Eat Foods Sold Retail in Balıkesir”. *Van Veterinary Journal*, 27(1), 31–36.
- Göktaş, D., Tunçel, G. ve Ceylan, S. (1991). “Microbial Quality, and Effect of Cooking on Survival of *Salmonella*, in Kokariç”, *Meat Science*, 29(4), 375-381. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(91\)90015-I](https://doi.org/10.1016/0309-1740(91)90015-I)
- Grant, K. A., Kenyon, S., Nwafor, I., Plowman, J., Ohai, C., Halford-Maw, R., Peck, M. W. ve McLauchlin, J. (2008). “The Identification and Characterization of *Clostridium perfringens* by Real-time PCR, Location of Enterotoxin Gene, and Heat Resistance”. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(5), 629–639. <https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0066>
- Granum, P. E. ve Lindbäck, T. (2012). “*Bacillus cereus*”. *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 491-502. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch19>
- Gurjar, A. A., Hegde, N. V., Love, B. C. ve Jayarao, B. M. (2008). “Real-time Multiplex PCR Assay for Rapid Detection and Toxotyping of *Clostridium perfringens* Toxin

- Producing Strains in Feces of Dairy Cattle”. *Molecular and Cellular Probes*, 22(2), 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.08.001>
- Gülbandılar, A. (2009). “Kütahya Yöresinde Burun Mukozasındaki *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığının ve Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması”, *Journal of Science and Technology of Dumlupınar University*, 18, 1-6.
- Güran, H. S., ve Öksüztepe, G. (2013). “Detection and Typing of *Clostridium perfringens* from Retail Chicken Meat Parts”. *Letters in Applied Microbiology*, 57(1), 77–82. <https://doi.org/10.1111/lam.12088>
- Haeghebaert, S., Sulem, P., Deroudille, L., Vanneroy-Adenot, E., Bagnis, O. ve Bouvet, P., Grimont, F., Brisabois, A., Hervy, C., Espié, E., de Valk, H., Le Querrec, F. ve Vaillant, V. (2003) “Two Outbreaks of *Salmonella enteritidis* Phage Type 8 Linked to the Consumption of Cantal Cheese Made with Raw Milk, France, 2001”. *Euro Surveillance*, 8(7), 151-156. <https://doi.org/10.2807/esm.08.07.00419-en>
- Halkman, A.K. (2013). “Gıda Mikrobiyolojisi II Ders Notları”. Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 89 sayfa, Ankara.
- Hall-Stoodley, L., ve Stoodley, P. (2009). “Evolving Concepts in Biofilm Infections”. *Cellular Microbiology*, 11(7), 1034-1043. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. ve Stoodley, P. (2004). “Bacterial Biofilms: from The Natural Environment to Infectious Diseases”. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95-108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hamad, G. M., Abdelmotilib, N. M., Darwish, A. M. G. ve Zeitoun, A. M. (2020). “Commercial Probiotic Cell-free Supernatants for Inhibition of *Clostridium perfringens* Poultry Meat Infection in Egypt”. *Anaerobe*, 62, 102181. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102181>
- Hammit, M. C., Bueschel, D. M., Keel, M. K., Glock, R. D., Cuneo, P., DeYoung, D. W., Reggiardo, C., Trinh, H. T. ve Songer, J. G. (2008). “A Possible Role for *Clostridium difficile* in the Etiology of Calf Enteritis”. *Veterinary Microbiology*, 127(3–4), 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.002>

- Han, Y., King, J. ve Janes, M. E. (2018). "Detection of Antibiotic Resistance Toxigenic *Clostridium difficile* in Processed Retail Lettuce". *Food Quality and Safety*, 2(1), 37–41. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx032>
- Heise, J., Witt, P., Maneck, C., Wichmann-Schauer, H. ve Maurischat, S. (2021). "Prevalence and Phylogenetic Relationship of *Clostridioides difficile* Strains in Fresh Poultry Meat Samples Processed in Different Cutting Plants". *International Journal of Food Microbiology*, 339, 109032. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109032>
- Hopman, N. E. M., Oorburg, D., Sanders, I., Kuijper, E. J. ve Lipman, L. J. A. (2011). "High Occurrence of Various *Clostridium difficile* PCR Ribotypes in Pigs Arriving at the Slaughterhouse". *Veterinary Quarterly*, 31(4), 179–181. <https://doi.org/10.1080/01652176.2011.649370>
- Hu, W. S., Woo, D. U., Kang, Y. J. ve Koo, O. K. (2021). "Biofilm and Spore Formation of *Clostridium perfringens* and its Resistance to Disinfectant and Oxidative Stress", *Antibiotics*, 10(4), 396. <https://doi.org/10.3390/antibiyotikler10040396>
- Indra, A., Lassnig, H., Baliko, N., Much, P., Fiedler, A., Huhulescu, S. ve Allerberger, F. (2009). "*Clostridium difficile*: A New Zoonotic Agent?" *Wiener Klinische Wochenschrift*, 121(3–4), 91–95. <https://doi.org/10.1007/s00508-008-1127-x>
- ISO 6579-1 (2017-2) Microbiology of the Food Chain. Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of *Salmonella*.
- Issimov, A., Baibatyrov, T., Tayeva, A., Kenenbay, S., Abzhanova, S., Shambulova, G., Kuzembayeva, G., Kozhakhieva, M., Brel-Kisseleva, I., Safronova, O., Bauzhanova, L., Yeszhanova, G., Bukarbayev, K., Katasheva, A. ve Uzal, F. A. (2022). "Prevalence of *Clostridium perfringens* and Detection of Its Toxins in Meat Products in Selected Areas of West Kazakhstan", *Agriculture*, 12(9), 1357. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091357>
- Janezic, S., Ocepek, M., Zidaric, V. ve Rupnik, M. (2012). "*Clostridium difficile* Genotypes Other Than Ribotype 078 That are Prevalent Among Human, Animal and Environmental Isolates", *BMC Microbiology*, 12(1), 48. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-48>



- Janezic, S., Potocnik, M., Zidaric, V. ve Rupnik, M. (2016). “Highly Divergent *Clostridium difficile* Strains Isolated from the Environment”. *PLoS ONE*, 11(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167101>
- Jang, Y. S., Kim, D. H., Bae, D., Kim, S. H., Kim, H., Moon, J. S., Song, K. Y., Chon, J. W. ve Seo, K. H. (2020). “Prevalence, Toxin-typing, and Antimicrobial Susceptibility of *Clostridium perfringens* from Retail Meats in Seoul, Korea”. *Anaerobe*, 64, 102235. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102235>
- Jefferson, K. K. (2004). “What Drives Bacteria to Produce a Biofilm?”. *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 163-173. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x>
- Kachrimanidou, M. ve Malisiovas, N. (2011). “*Clostridium difficile* Infection: A Comprehensive Review”. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(3), 178–187. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2011.556598>
- Kara, R., Aslan, S., Yaman, H., ve Akkaya, L. (2013). “Afyonkarahisar’da Tüketime Sunulan Kokoreçlerin Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi”. *Kocatepe Veterinary Journal*, 6(1), 7–10. <https://doi.org/10.5578/kvj.5340>
- Kılıç, B. (2016). “Determination of Microbiological Quality of Kokoreç Sold in Isparta”. *Scientific Papers. Series D. Animal Science*, LIX, 296–298.
- Kılınç, B., Şen Yılmaz, B., ve Gören, B. (2018). “İzmir’in Farklı Bölgelerinde Satışa Sunulan Midye Dolmaların Mikrobiyolojik Kalite Kontrolü”. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 14(4), 276–290. <https://doi.org/10.22392/egirdir.403570>
- Kiu, R., Hall, L. J., Kiu, R. ve Hall, L. J. (2018). “Pathogen *Clostridium perfringens* An Update on the Human and Animal Enteric Pathogen *Clostridium perfringens*”. *Emerging Microbes & Infections*, 7(141), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0144-8>
- Knight, D. R., ve Riley, T. V. (2013). “Prevalence of Gastrointestinal *Clostridium difficile* Carriage in Australian Sheep and Lambs”. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5689–5692. <https://doi.org/10.1128/AEM.01888-13>

- Koene, M. G. J., Mevius, D., Wagenaar, J. A., Harmanus, C., Hensgens, M. P. M., Meetsma, A. M., Putirulan, F. F., van Bergen, M. A. P. ve Kuijper, E. J. (2012). “*Clostridium difficile* in Dutch animals: Their Presence, Characteristics and Similarities with Human Isolates”. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(8), 778–784. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03651.x>
- Kotila, S. M., Kuusi, M., KÄnÄnen, E., Virolainen, A., PitkÄnen, T., Miettinen, I. T., Brazier, J., Eerola, E., Jalava, J., Laine, J. ve Vuento, R. (2013). “*Clostridium difficile* Contamination of Public Tap Water Distribution System During A Waterborne Outbreak in Finland”. *Scandinavian Journal of Public Health*, 41(5), 541–545. <https://doi.org/10.1177/1403494813481648>
- Kouassi, K. A., Dadie, A. T., N’Guessan, K. F., Dje, K. M. ve Loukou, Y. G. (2014). “*Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in Cooked Beef Sold in CÔte d’Ivoire and Their Antimicrobial Susceptibility”. *Anaerobe*, 28(June), 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.05.012>
- Küçükkömürler, S. ve Koluman, A. (2021). “Tüketicilerin Sakatat Tüketimi ve Tercihi”, *Journal of Recreation and Tourism Research*, 8(1), 120–143.
- Küplülü, Ö. (1999). “Sığır Karkaslarında *Salmonella* Kontaminasyonu ve Serotip Dağılımı”. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46, 25–34.
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L. ve Finegold, S. M. 2016. “Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938”. *Anaerobe*, 40, 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>
- Leroy, F., Giammarino, P., Chacornac, J.P., Lebert, I. ve Talon, R. (2010). “Biodiversity of Indigenous Staphylococci of Naturally Fermented Dry Sausages and Manufacturing Environments of Small Scale Processing Units”. *Food Microbiology*, 27 (2): 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.005>
- Li, J. ve McClane, B. A. (2006). “Further Comparison of Temperature Effects on Growth and Survival of *Clostridium perfringens* Type A Isolates Carrying a Chromosomal or Plasmid-borne Enterotoxin Gene”. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(7), 4561-4568. <https://doi.org/10.1128/AEM.00177-06>

- Lim, S., Foster, N., Elliott, B., Riley, T. ve Thomas Riley, C. V. (2017). “High Prevalence of *Clostridium difficile* on Retail Root Vegetables, Western Australia”. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 585-590. <https://doi.org/10.1111/jam.13653>
- Lim, S. C., Knight, D. R. ve Riley, T. V. (2020a). “*Clostridium difficile* and One Health”. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7), 857–863. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2019.10.023>
- Lim, S. C., Knight, D. R., Moono, P., Foster, N. F. ve Riley, T. V. (2020b). “*Clostridium difficile* in Soil Conditioners, Mulches and Garden Mixes with Evidence of a Clonal Relationship with Historical Food and Clinical Isolates”. *Environmental Microbiology Reports*, 12(6), 672–680. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12889>
- Lindström, M., Heikinheimo, A., Lahti, P. ve Korkeala, H. (2011). “Novel Insights into the Epidemiology of *Clostridium perfringens* Type A Food Poisoning”. *Food Microbiology*, 28(2), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.020>
- Lund, B. M. ve Peck, M. W. (2015). “A Possible Route for Foodborne Transmission of *Clostridium difficile*?” *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(3), 177–182. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1842>
- Macfarlane, S., Woodmansey, E. J. ve Macfarlane, G. T. (2005). “Colonization of Mucin by Human Intestinal Bacteria and Establishment of Biofilm Communities in a Two-stage Continuous Culture System”. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7483-7492. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7483-7492.2005>
- Malamou-Ladas, H., O’Farrell, S., Nash, J. Q. ve Tabaqchali, S. (1983). “Isolation of *Clostridium difficile* from Patients and the Environment of Hospital Wards”. *Journal of Clinical Pathology*, 36(1), 88–92. <https://doi.org/10.1136/jcp.36.1.88>
- Malhotra, S. 2017. "Food Safety Issues Related to Street Vendors". sf:395–402. Food Safety in the 21st Century: Public Health Perspective. (Ed.) Dudeja. Minhas, S., Gupta, R. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801773-9.00031-5>
- Manguiat, L. S. ve Fang, T. J. (2013). “Microbiological Quality of Chicken-and pork-based street-vended Foods from Taichung, Taiwan, and Laguna, Philippines”. *Food Microbiology*, 36(1), 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.005>

- Manteca, C., Daube, G., Pirson, V., Limbourg, B., Kaeckenbeeck, A. ve Mainil, J. G. (2001). "Bacterial Intestinal Flora Associated with Enterotoxaemia in Belgian Blue Calves". *Veterinary Microbiology*, 81(1), 21–32. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00329-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00329-7)
- McClane, B. A., Robertson, S. L. ve Li, J. (2012). "*Clostridium perfringens*", *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 465-489. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch18>
- Metcalf, D. S., Costa, M. C., Dew, W. M. V. ve Weese, J. S. (2010). "*Clostridium difficile* in Vegetables, Canada". *Letters in Applied Microbiology*, 51, 600-602. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02933.x>
- Miki, Y., Miyamoto, K., Kaneko-Hirano, I., Fujiuchi, K. ve Akimoto, S. (2008). "Prevalence and Characterization of Enterotoxin Gene-carrying *Clostridium perfringens* Isolates from Retail Meat Products in Japan". *Applied and Environmental Microbiology*, 74(17), 5366–5372. <https://doi.org/10.1128/AEM.00783-08>
- Muratoglu, K., Akkaya, E., Hampikyan, H., Bingol, E. B., Cetin, O. ve Colak, H. (2020). "Detection, Characterization and Antibiotic Susceptibility of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in Meat Products". *Food Science of Animal Resources*, 40(4), 578–587. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e34>
- Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delbrassinne, L., Veys, J., Waegenare, J., Sirtaine, N., Driesen, R. B., Sipido, K. R., Mahillon, J. ve Dierick, K. (2011). "Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning". *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4379-4381. <https://doi.org/10.1128/jcm.05129-11>
- Norman, K. N., Harvey, R. B., Andrews, K., Hume, M. E., Callaway, T. R., Anderson, R. C. ve Nisbet, D. J. (2014). "Survey of *Clostridium difficile* in Retail Seafood in College Station, Texas", *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 31(6), 1127–1129. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.888785>

- Novak, J. S. ve Juneja, V. K. (2002). “*C. perfringens*: Hazards in New Generation Foods”. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 127-132. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00011-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00011-5)
- Nowell, V. J., Poppe, C., Parreira, V. R., Jiang, Y. F., Reid-Smith, R. ve Prescott, J. F. (2010). “*Clostridium perfringens* in Retail Chicken”. *Anaerobe*, 16(3), 314–315. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2009.11.004>
- Ohtani, K. ve Shimizu, T. (2016). “Regulation of Toxin Production in *Clostridium perfringens*”. *Toxins*, 8(207), 1–14. <https://doi.org/10.3390/toxins8070207>
- Önen, A. (2020). Salam Üretim Aşamalarındaki Mikrobiyal Kontaminasyon Kaynaklarının Belirlenmesi. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi, Bursa.
- Öncül, N. ve Yıldırım, Z. (2019). “Microbiological Quality of Raw Meat Sold in Tokat Province”. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(3), 62–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.24925/turjaf.v7isp3.62-67.3185>
- Özgen, E. K. ve Yıldırım, M. (2021). "Isolation and Identification of *Clostridium difficile* From Cases of Diarrhea in Young Farmanimals, and The Determination of Antimicrobial Susceptibility," *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 45(2), 266-271. <https://doi.org/10.3906/vet-2008-94>
- Özmert Ergin, S. ve Güzel, A. (2018). “Kadınların Gıda ve Mutfak Hijyeni ile İlgili Bilgi, Tutum ve Davranışlarının Değerlendirilmesi”. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7(3), 11–22.
- Peláez, T., Alcalá, L., Alonso, R., Rodríguez-Crèixems, M., García-Lechuz, J. M. ve Bouza, E. (2002). “Reassessment of *Clostridium difficile* Susceptibility to Metronidazole and Vancomycin”. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 46(6), 1647–1650. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1647-1650.2002>
- Pirs, T., Ocepek, M. ve Rupnik, M. (2008). “Isolation of *Clostridium difficile* from Food Animals in Slovenia”. *Journal of Medical Microbiology*, 57(6), 790–792. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47669-0>
- Primavilla, S., Farneti, S., Petruzzelli, A., Drigo, I. ve Scuota, S. (2019). “Contamination of Hospital Food with *Clostridium difficile* in Central Italy”. *Anaerobe*, 55, 8–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.10.008>

- Rahimi, E., ve Khaksar, F. (2015). "Detection Of Toxigenic *Clostridium difficile* Strains Isolated From Meat And Meat Products in Iran". *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18(3), 277–281. <https://doi.org/10.15547/bjvm>.
- Rahimi, E., Jalali, M. ve Weese, J. S. (2014). "Prevalence of *Clostridium difficile* in Raw Beef, Cow, Sheep, Goat, Camel and Buffalo Meat in Iran". *BMC Public Health*, 14(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-119>
- Rodriguez, C., Avesani, V., Van Broeck, J., Taminiau, B., Delmée, M. ve Daube, G. (2013). "Presence of *Clostridium difficile* in Pigs and Cattle Intestinal Contents and Carcass Contamination at the Slaughterhouse in Belgium". *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), 256–262. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.07.017>
- Rodriguez, C., Taminiau, B., Van Broeck, J., Avesani, V., Delmée, M., ve Daube, G. (2012). "*Clostridium difficile* in Young Farm Animals and Slaughter Animals in Belgium". *Anaerobe*, 18(6), 621–625. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.09.008>
- Rodriguez-Palacios, A., ve LeJeune, J. T. (2011). "Moist-Heat Resistance, Spore Aging, and Superdormancy in *Clostridium difficile*". *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 3085–3091. <https://doi.org/10.1128/AEM.01589-10>
- Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R. J., Staempfli, H. R., ve Weese, J. S. (2010). "*Clostridium difficile* Survives Minimal Temperature Recommended for Cooking Ground Meats". *Anaerobe*, 16(5), 540–542. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.05.004>
- Rodriguez-Palacios, A., Reid-Smith, R. J., Staempfli, H. R., Daignault, D., Janecko, N., Avery, B. P., Martin, H., Thomson, A. D., McDonald, L. C., Limbago, B. ve Weese, J. S. (2009). "Possible Seasonality of *Clostridium difficile* in Retail Meat, Canada". *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 802–805. <https://doi.org/10.3201/eid1505.081084>
- Rodriguez-Palacios, A., Staempfli, H. R., Duffield, T. ve Weese, J. S. (2007). "*Clostridium difficile* in Retail Ground Meat, Canada". *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 485–487. <https://doi.org/10.3201/eid1303.060988>

- Ryan, M.J., Wall, P.G. ve Gilbert, R.J. (1996). "Risk Factors for Outbreaks of Infectious Intestinal Disease Linked to Domestic Catering" *Communicable Disease Report*, 6, pp. 179-183
- Sağlam, D. ve Şeker, E. (2016). "Gıda Kaynaklı Bakteriye Patojenler". *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(2), 105-113.
- Sarker, M. R., Shivers, R. P., Sparks, S. G., Juneja, V. K. ve McClane, B. A. (2000). "Erratum: Comparative Experiments to Examine the Effects of Heating on Vegetative Cells and Spores of *Clostridium perfringens* Isolates Carrying Plasmid Enterotoxin Genes Versus Chromosomal Enterotoxin Genes" *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5549. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5549-5549.2000>
- Sarré, F. B., Dièye, Y., Seck, A. M., Fall, C., ve Dieng, M. (2023). "High Level of *Salmonella* Contamination of Leafy Vegetables Sold around the Niayes Zone of Senegal". *Horticulturae*, 9(1), 97. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010097>
- Sawires, Y. S. ve Songer, G. J. (2006). "*Clostridium perfringens*: Insight into Virulence Evolution and Population Structure". *Anaerobe*, 12, 23–43. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.10.002>
- Saygılı, D., Demirci, H. ve Samav, U. (2019). "Coğrafi İşaretli Gastronomik Lezzetler : İzmir Örneği", *Ganud International Conference On Gastronomy, Nutrition And Dietetics*, 105–111. <https://hdl.handle.net/20.500.12569/346>
- Schlegelová J, Nápravníková E, Dendis M, Horváth R, Benedík J, Babák V., Klímová, E., Navrátilová, P. ve Šustáčková, A. (2004). "Beef Carcass Contamination in Slaughterhouse and Prevalence of Resistance to Antimicrobial Drugs in Isolates of Selected Microbial Species". *Meat Science*, 66: 557-565. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00159-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00159-1).
- Schlegelová J., Babák V., Holasová M., Konstantinová L., Necidová L., Šišák F., Vlková H., Roubal P. ve Jaglic Z. (2010). "Microbial Contamination After Sanitation of Food Contact Surfaces in Dairy and Meat Processing Plants". *Czech Journal of Food Sciences*, 28: 450–461. <https://doi.org/10.17221/65/2009-CJFS>

- Seekatz, A. M. ve Young, V. B. (2014). “*Clostridium difficile* and the Microbiota”. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4182–4189. <https://doi.org/10.1172/JCI72336>
- Seyitođlu, Ő., Cengiz, Ő., Kılıç Altun, S., Kűçűkkalem, Ő. F. ve Sűzduitmaz, İ. (2012) “Erzurum Yűresinde Koyunlarda *Clostridium perfringens* Toksin Varlıđının Toksin Nűtralizasyon, ELISA ve Lateks Aglűtinasyon Test Yűntemleri ile AraŐtırılması” *Journal of Etlik Veterinary Mikrobiyoloji*, 23, 39-43. <https://dergipark.org.tr/en/pub/evmd/issue/70277/1095351>
- Sharp, R. ve Macfarlane, G. T. (2000). “Chemostat Enrichments of Human Feces with Resistant Starch are Selective for Adherent Butyrate-producing Clostridia at High Dilution Rates”. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4212-4221. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4212-4221.2000>
- Shaughnessy, M. K., Snider, T., Sepulveda, R., Boxrud, D., Cebelinski, E., Jawahir, S., Holzbauer, S., Johnston, B. D., Smith, K., Bender, J. B., Thuras, P., Diez-Gonzalez, F. ve Johnson, J. R. (2018). “Prevalence and Molecular Characteristics of *Clostridium difficile* in Retail Meats, Food-Producing and Companion Animals, and Humans in Minnesota”. *Journal of Food Protection*, 81(10), 1635–1642. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-104>
- Shen, Y., Xu, L. ve Li, Y. (2021). “Biosensors for Rapid Detection of *Salmonella* in Food: A Review”. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 149–197. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12662>
- Songer, J. G. (2010). “*Clostridia* as Agents of Zoonotic Disease”. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.003>
- Songer, J. G., Trinh, H. T., Killgore, G. E., Thompson, A. D., Mcdonald, L. C. ve Limbago, B. M. (2009). “*Clostridium difficile* in Retail Meat Products, USA, 2007”. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), 819–821. <https://doi.org/10.3201/eid1505.081071>
- Sperner, B., Eisgruber, H. ve Stolle, A. (1999). “Use of the RAPID ID 32 A® System for Rapid Identification of *Clostridium* Species Important in Food Hygiene”. *International Journal of Food Microbiology*, 52(3), 169-180. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00150-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00150-6)



- Spigaglia, P., Barbanti, F., Faccini, S., Vescovi, M., Criscuolo, E. M., Ceruti, R., Gaspano, C. ve Rosignoli, C. (2023). “*Clostridioides difficile* in Pigs and Dairy Cattle in Northern Italy: Prevalence, Characterization and Comparison between Animal and Human Strains”. *Microorganisms*, 11(7), 1738.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071738>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., ve Švabić-Vlahović, M. (2000). "A Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation", *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Şahingöz Akar, S. ve Öztürk, B. (2021). “Covid-19 Pandemisi Normalleşme Sürecinde Bireylerin Yiyecek İçecek Tercihleri”. *Haliç Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 4(2), 187–214.
- Taha, A. E. (2021). “Raw Animal Meats as Potential Sources of *Clostridium difficile* in Al-jouf, Saudi Arabia”. *Food Science of Animal Resources*, 41(5), 883–893.  
<https://doi.org/10.5851/KOSFA.2021.E44>
- Talon, R. ve Leroy, S. (2011). “Diversity and Safety Hazards of Bacteria Involved in Meat Fermentations”. *Meat Science*, 89, 303–309.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.029>
- Tan, D. T., Mulvey, M. R., Zhanel, G. G., Bay, D. C., Reid-Smith, R. J., Janecko, N. ve Golding, G. R. (2022). “A *Clostridioides difficile* Surveillance Study of Canadian Retail Meat Samples from 2016-2018”. *Anaerobe*, 74, 102551.  
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102551>
- Tawab, A. A. A. A., El-hofy, F. I., Khater, D. F. ve Kotb, M. A. M. (2015). “Typing of *Clostridium perfringens* Isolated from Some Meat Products by Using PCR”. *Benha Veterinary Medical Journal*, 29(1), 118–123.
- Taylan, G., Tosun, M. N. ve Zorba, N. N. (2020). “The Risk of *Clostridium difficile* as a Foodborne Pathogen”. In A. C. Toft (Ed.), *Frontiers in Bacteriology Research* (s. 93–145). Nova Science Publishers.

- Temelli, S., Saltan Evrensel, S., Anar, Ş. ve Tayar, M. (2002). “Bursa’da Tüketilen Kokoreçlerin Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi”. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28(2), 467–473.
- Tkalec, V., Janezic, S., Skok, B., Simonc, T., Mesaric, S., Vrabic, T. ve Rupnik, M. (2018). “High *Clostridium difficile* Contamination Rates of Domestic and Imported Potatoes Compared to Some Other Vegetables in Slovenia”. *Food Microbiology*, 78, 194-200. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.017>
- Todd, E. C. (1997) “Epidemiology of Foodborne Diseases: A Worldwide Review,” *World Health Statistics Quarterly*, 50, pp. 30-50
- Toe, E., Attien, P., Moroh, A. J. L., Sina, H. Kouame, D. N., Kambire, O., Baba-Moussa, L., Guessennd, N., Dako, E. ve Dadie, A. (2022). “Prevalence and Characterization of *Salmonella* Isolated from Vegetables Salads and Ready to Eat Raw Mixed Vegetable Salads in Abidjan, Cte d’Ivoire”. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 15-25. <https://doi.org/10.5897/JMA2021.0449>
- Tunail, N. 2000. “Mikrobiyal Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar”. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, (Ed. Tunail, N.), Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh. Bölümü yayını, Sim Matbaacılık, Ankara, 82-88.
- Uğur, M., Nazlı, B. ve Bostan, K. (2001). “Gıda Hijyeni”. Teknik Yayınevi: İstanbul.
- Uz, K. (2021). Çanakkale İli Sokak Yiyecekleri Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi, Denizli. <https://hdl.handle.net/11499/38841>
- Ünlütürk, A., ve Turantaş, F. (2015). “Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi” (3. Basım). Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri: İzmir.
- Ünver Alçay, A. (2019). “İstanbul’da Satılan Pişmiş Tavuk Dönerlerin Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması”. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 49(2), 74–85. <https://doi.org/10.5222/tmcd.2019.074>
- Vidal, A., Martín-Valls, G. E., Tello, M., Mateu, E., Martín, M. ve Darwich, L. (2019). “Prevalence of Enteric Pathogens in Diarrheic and Non-diarrheic Samples from Pig Farms with Neonatal Diarrhea in the North East of Spain”. *Veterinary Microbiology*, 237, 108419. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108419>

- Visser, M., Sepehrim, S., Olson, N., Du, T., Mulvey, M. R., Alfa, M. J., Visser, M., Sepehri, S., Olson, N., Du, T. ve Alfa, M. J. (2012). "Detection of *Clostridium difficile* in Retail Ground Meat Products in Manitoba". *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 23(1), 28–31. <https://doi.org/10.1155/2012/646981>
- Von Abercron, S. M. M., Karlsson, F., Wigh, G. T., Wierup, M. ve Krovacek, K. (2009). "Low Occurrence of *Clostridium difficile* in Retail Ground Meat in Sweden", *Journal of Food Protection*, 72(8), 1732–1734. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1732>
- Vuotto, C., Donelli, G., Buckley, A., ve Chilton, C. (2018). "Clostridium difficile biofilm". Editörler: Mastrantonio, P. ve Rupnik, M. *Updates on Clostridium difficile in Europe: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 8*. Vol 1050, Springer Cham. 97-115. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72799-8_7).
- Vural, H. ve Öztan, A. (1993). "Effects of Starter Cultures on Growth of *Staphylococcus aureus* in Fermented Meat Products", *Gıda*, 18(4): 259-263.
- Weese, J. S., Avery, B. P., Rousseau, J. ve Reid-Smith, R. J. (2009). "Detection and Enumeration of *Clostridium difficile* Spores in Retail Beef and Pork". *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 5009–5011. <https://doi.org/10.1128/AEM.00480-09>
- Weese, J. S., Reid-Smith, R. J., Avery, B. P. ve Rousseau, J. (2010). "Detection and Characterization of *Clostridium difficile* in Retail Chicken", *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 362-365. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02802.x>
- Wertheim H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., Willem, V. L., Belkum, A. V., Verbrugh, H.A. ve Nouwen, J. L. (2005). "The Role of Nasal Carriage in *Staphylococcus aureus* Infections". *Lancet Infectious Diseases*, 5: 751–62. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4)
- Wilson, I. (2002). "*Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Raw Retail Chickens from Different Producers: A Six Year Survey". *Epidemiology & Infection*, 129(3), 635-645. <https://doi.org/10.1017/S0950268802007665>

- Yang, X., Huang, J., Su, Y., Cai, S., Zhang, J., Guo, W., Wang, J., Cheen, M., Wu, S., Yang, S. ve Wu, Q. (2022). "Incidence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Serovars in Fresh Retail Aquatic Products from China". *LWT*, 171, 114123. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114123>
- Yıldırım, T., Siriken, B. ve Yavuz, C. (2016). "Sığır Kıyma ve Köftelerinde *Salmonella* spp. Varlığı". *Journal of Turkish Veterinary Medical Society*, 87(1), 11–23.
- Yıldırım, Z., Ceylan, Ş. ve Öncül, N. (2015). "Tokat Piyasasında Satışa Sunulan Tavuk Etlerinin Mikrobiyolojik Kalitesinin Belirlenmesi". *Akademik Gıda*, 13(4), 304–3016.
- Yibar, A., Cetin, E., Ata, Z., Erkose, E. ve Tayar, M. (2018). "*Clostridium perfringens* Contamination in Retail Meat and Meat-based Products in Bursa, Turkey". *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(4), 239-245. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2350>