

Erzurum yöresinde koyunlarda *Clostridium perfringens* toksin varlığının toksin nötralizasyon, ELISA ve lateks aglütinasyon test yöntemleri ile araştırılması

Şenay SEYİTOĞLU¹, Seyda CENGİZ², Serap KILIÇ ALTUN¹, Ömer Faruk KÜÇÜKKALEM¹, İbrahim SÖZDUTMAZ¹

¹ Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsü, ² Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD, Erzurum

Geliş Tarihi / Received: 21.05.2012, Kabul Tarihi / Accepted: 10.12.2012

Özet: Bu çalışmada, Erzurum yöresinde bulunan enterotoksemi şüpheli 70 adet koyuna ait bağırsak içeriğinin ELISA, toksin nötralizasyon ve lateks aglütinasyon testi (LAT) ile incelenerek; klostridial toksinlerin araştırılması ve tiplendirilmesi amaçlandı. Toksin testinde 25 (%35,7) örnekte *C.perfringens* yönünden pozitif sonuç alınırken, 45 (%64,3) adet örnek negatif olarak değerlendirildi. Bu test sonuçlarına göre, 14 örnek *C.perfringens* tip C, 2 örnek *C.perfringens* tip A, 9 örnek *C.perfringens* tip D olarak tanımlandı. İncelenen örneklerin ELISA sonuçları değerlendirildiğinde 70 adet bağırsak içeriğinin 37 (%52,8) adedi *C.perfringens* yönünden pozitif bulunurken, 33 (%42,7) adet örnek negatif bulundu. Yapılan ELISA tiplendirilmesinde 12 adet numunede alfa toksin (tip A), 7 adet örnekte alfa, beta, epsilon toksin (tip B), 9 tanesinde alfa ve beta toksin (tip C) ve 9 adet örnek de alfa ve epsilon toksini (tip D) belirlendi. Lateks aglütinasyon sonuçlarında ise 2 örnek alfa toksin yönünden pozitif sonuç verirken, 16 örnekte epsilon toksini belirlendi. Sonuç olarak Erzurum ilinde enterotoksemi kontrolünde aşılama kontrolü, yaygın bir şekilde yapılmasının ve uygulanacak aşılarda başta tip A olmak üzere, tip C, tip D ile tip B'nin de bulundurulmasının gerekli olduğu belirlendi.

Anahtar sözcükler: Enterotoksemi, ELISA, lateks aglütinasyon, toksin nötralizasyon.

Investigation of *Clostridium perfringens* toxins in sheep in the region of Erzurum by toxin neutralization, ELISA and latex agglutination tests

Summary: Investigation and typing of clostridial toxins after ELISA, serum neutralization and latex agglutination tests (LAT) of intestinal contents from 70 enterotoxemia suspected sheep in Erzurum region was aimed in this study. According to toxin neutralization results; 25 (35,7 %) and 45 (64,3 %) of the samples were determined as positive and negative, respectively. According to typing by toxin neutralization test; 14, 2 and 9 of the samples were typed as C, A and D, respectively. Thirty-seven (52,8 %) of the samples were positive for *C.perfringens* in the ELISA results. According to ELISA typing, 12 of the samples had alpha toxin (Type A), 7 of the samples had alpha, beta and gamma toxins (Type B), 9 of the samples had alpha and beta toxins (Type C), and 9 of the samples had alpha and epsilon toxins (Type D). According to latex agglutination test results, 2 of the samples had alpha and 16 of the samples had gamma toxins. As a result, the control of the province of Erzurum enterotoxemia, vaccination should be controlled and widely. Vaccines to be applied, especially in type A, type B, C and D must be present.

Key words: Enterotoxemia, ELISA, latex agglutination, toxin neutralization.

Giriş

Clostridium perfringens hareketsiz ve kapsüllü, gram pozitif, çomak şekilli, spor oluşturan, evcil hayvanlarda önemli enterik infeksiyonlara neden olan bir bakteridir. *C.perfringens*'e bağlı enterotoksemiler *C.perfringens*'in değişik tipleri tarafından oluşturulan, koyun, kuzu, buzağı ve diğer hayvanlarda toksemi ile karakterize infeksiyonlardır (1). *C.perfringens*'in oluşturduğu toksinler fazla sayıdadır ve etkenin tiplendirilmesinde bu toksinler kulla-

nılır. Toksin tiplendirmesine göre *C.perfringens* tipleri A, B, C, D ve E olarak ayrılmıştır (1, 5, 11, 13, 15). *C.perfringens* tipleri değerlendirildiğinde; Tip A en yaygın *C.perfringens* tipidir (11). Toksijenik özellikleri ve patojenitesi oldukça değişkendir. Yapısındaki alfa toksin, kimyasal olarak fosfolipaz C yapısındadır. Lesitini fosforilkolin ve digliseride hidrolize eder. Çoğu hücre membranı lesitin içerdiğinden dolayı alfa toksin yapısı ile yıkımlanır (10, 15).

C.perfringens tip B, alfa, beta ve epsilon toksinleri üretir fakat beta toksin çoğunlukla temel toksindir (12, 15). Hayvanlarda ani ölüm ile karakterize infeksiyonlara neden olan *C.perfringens* tip C'de alfa toksin yanında beta toksin üretir. Beta toksin tripsin ve diğer proteolitik enzimler ile kolayca inaktif hale getirilebilir (15, 16). *C.perfringens* tip D en iyi bilinen *C.perfringens* tipidir ve epsilon toksin üretir. Epsilon toksin sindirim enzimlerine karşı dirençlidir. Bağırsakta fazla miktarda üretilen epsilon toksin, sistemik dolaşım ile absorbe olarak organ ve dokularda kapiller geçirgenlik artışı meydana getirir (21, 23) Tip E'nin temel toksini Iota toksindir. Toksin proteolitik enzimler ile aktive olur. Bu toksin nekrotizan etkilidir ve kapillar permeabiliteyi artırır (5,13,15,18). Daha önce yapılan çalışmalarda *C.perfringens* infeksiyonlarının teşhisi ve tiplendirilmesinde toksin nötralizasyon testi, ELISA, lateks aglütinasyon metotları (LAT), PCR gibi çeşitli teknikler kullanılmış, hastalığın çıktığı bölge ve bireysel predizpozisyon gibi faktörlere bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmada enterotoksemi şüpheli 70 adet koyuna ait bağırsak içeriğinde *C.perfringens* ve klostridial toksin varlığının ELISA, toksin nötralizasyon ve lateks aglütinasyon testi ile araştırılması ve karakterizasyonu amaçlandı.

Materyal ve Metot

Çalışmada, enterotoksemi şüphesiyle Erzurum Veteriner Kontrol Enstitüsüne (EVKEM) getirilen 70 adet koyuna ait bağırsak örneği kullanıldı.

Bağırsak örnekleri aseptik koşullar altında alındıktan sonra ELISA için Bio-X Enterotoksemi Elisa Kit, (Bio K 270), Lateks Aglütinasyon testleri için Bio-X Diagnostics *C.perfringens* epsilon toksin (Bio K176), *C.perfringens* alfa toksin (Bio K170) test kitleri kullanıldı. Kit prosedürleri üretici firmanın direktifleri doğrultusunda uygulandı. Toksin nötralizasyon testi için Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Laboratuvar Metot Birliği tarafından hazırlanan protokol uygulandı (9).

Bulgular

İncelenen örneklerin ELISA sonuçları değerlendirildiğinde, 70 adet bağırsak içeriğinin 37 (%52,8) adeti *C.perfringens* yönünden pozitif bulunurken, 33 (%42,7) adet örnek negatif bulundu. ELISA tip-

lendirmesinde 12 adet numunede alfa toksin (tip A), 7 adet örnekte alfa, beta, epsilon toksin (tip B), 9 örnekte alfa ve beta toksin (tip C) ve 9 örnek de ise alfa ve epsilon toksini (tip D) belirlendi (Tablo 1).

Toksin nötralizasyon testi sonuçlarına göre; 25 (%35,7) örnekte *C.perfringens* pozitif bulunurken, 45 (%64,3) adet örnek negatif bulundu. Toksin nötralizasyon testi tiplendirmesine göre, 14 örnek *C.perfringens* tip C, 2 örnek *C.perfringens* tip A ve 9 örnek de *C.perfringens* tip D olarak tiplendirildi. (Tablo 1).

İncelenen örneklerin Lateks aglütinasyon sonuçlarında ise 2 örnek alfa toksin yönünden pozitif sonuç verirken, 16 örnekte epsilon toksini belirlendi.

Tablo 1. ELISA ve Nötralizasyon test sonuçlarına göre *C.perfringens* tipleri

<i>C.perfringens</i> tipleri	ELISA test sonuçları (%)	Nötralizasyon test sonuçları (%)
A	12 (%32,4)	2 (%8)
B	7 (%18,9)	-
C	9 (%24,3)	14 (56)
D	9(%24,3)	9 (36)
Toplam	37 (%100)	25 (%100)

Tartışma ve Sonuç

Enterotoksemiler *C.perfringens*'in farklı tipleri tarafından oluşturulan, toksemi ile seyreden infeksiyonlardır. *C.perfringens*'in oluşturduğu toksinlerin tiplendirilmesi ile *C.perfringens* tipleri A, B, C, D ve E olarak ayrılmıştır (1, 5 15). Tip A en yaygın tip olup, sahip olduğu alfa toksin fosfolipaz C yapısındadır ve hücre membranını yıkımlama özelliği bulunmaktadır (10, 15). *C.perfringens* tip B'nin temel toksini beta toksindir (12, 15). *C.perfringens* tip C'nin de temel letal toksini beta toksin yapısındadır (15, 16). *C.perfringens* tip D sindirim enzimlerine dirençli olan epsilon toksini üretir. Tip E'nin temel toksini Iota toksindir. Nekrotizan etkili olan bu toksin kapillar permeabiliteyi artırır (5,15,18).

C.perfringens pozitifliğinin ve toksin tiplerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan metotlar ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Nötralizasyon testi ile yapılan çalışmalarda, Uzal ve ark. (22) nötralizasyon testinin %62,7 oranında pozitiflik verdiğini belirlemişlerdir. Idrissi ve Ward (4) nötralizasyon

testi ile 151 adet ani ölen koyunun 21 adedinde *C.perfringens* tip C (beta toksin) saptarken, 39 adet *C.perfringens* tip D (epsilon toksin) bulmuşlardır. Özcan ve Gürçay (19) 132 örnekte yaptıkları bakteriyolojik muayenede 51 adet pozitifliğe (%38) rastlamışlar, toksin nötralizasyon testi sonucunda 7 (%13) örnekte tip A, 16 (%31) örnekte tip C, 28 örnekte ise (%54) tip D saptamışlardır. Bu çalışmadaki toksin nötralizasyon testi sonuçları, araştırmacıların bulguları ile karşılaştırıldığında *C.perfringens* oranı, Uzal ve ark. (22)'dan düşük bulunurken, Özcan ve Gürçay (19) ile Idrissi ve Ward (4)'ün çalışmalarının sonuçlarına yakın bulunmuştur. Örneklerin tiplendirilmesi yönünden, Özcan ve Gürçay (19) ile Idrissi ve Ward (4)'ün tiplendirme bulgularına göre tip C yüksek oranda bulunurken, tip D düşük oranda saptanmıştır. Tip A yönünden elde edilen sonuç Özcan ve Gürçay (19)'dan düşük bulunurken hem tip C hem de tip D'nin yaygın olarak bulunması araştırmacıların bulgularını desteklemektedir.

ELISA, *C.perfringens* toksin varlığının ve tipinin belirlenmesi için kullanılan hızlı, basit, duyarlı ve spesifik bir testtir. Özellikle bağırsak içeriğinde bulunan çok az miktardaki toksin yapısını saptayarak ve tiplendirerek sonuç verdiği için dolayı enterotoksemi vakalarının ayırımı da sağlamaktadır (5,14,21). Gökçe ve ark. (3)'nün ELISA ile yaptıkları çalışmada, 56 ishaller dışı örneğinde *C.perfringens* yönünden pozitif sonuç veren 32 adet (%57) örnek belirlenirken, toksin tiplendirmesinde, örneklerin 6'sı (%10,7) tip A, 7'si (%12,5) tip B, 9 tanesi (%16) tip C, 10 adedi (%17,8) de tip D olarak bulunmuştur. Koç ve Gökçe (8) ELISA metodu ile 150 adet dışkıda 122 (%81,3) adet pozitiflik belirlemişlerdir. Araştırmacılar toksin tiplendirmesinde 61 (%40,6) adet tip A, 19 (%12,6) adet tip B, 28 adet (%18,6) tip C ve 14 (%9,3) adet tip D bulmuşlardır. Islam ve ark. (5) ELISA metodunu kullanarak %68,75 oranında tip D, %25 oranında tip B, %6,25 oranında tip C belirlemişler ancak tip A'ya rastlamamışlardır. Naylor ve ark. (14) ise yaptıkları çalışmada 158 örneğin 56 (%35,4)'sında *C.perfringens* yönünden pozitiflik belirlemişlerdir. Tür düzeyinde yaptıkları tiplendirmede 9 (%16) örnekte tip A, 4 (%7,1) örnekte tip B, bir (%1,7) adet örnekte tip C ve 42 (%75) örnekte tip D pozitifliği elde etmişlerdir. Watson ve Scholes (23) yaptıkları çalışmada bir buzağıda ELISA ile alfa ve epsilon toksin yönünden pozitifliğe rastlarken beta toksin yönünden negatiflik tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen

ELISA bulguları *C.perfringens* pozitifliği yönünden Gökçe ve ark (3)'nün bulgularına benzerlik gösterirken, Koç ve Gökçe (8)'nin bulgularından düşük, Naylor ve ark. (14)'dan yüksek bulunmuştur.

C.perfringens toksin tiplerine bakıldığında ise tip A bulgusu Gökçe ve ark (3)'nün bulguları ile uyumluluk gösterirken, Koç ve Gökçe (8)'den düşük, Naylor ve ark. (14)'dan yüksek bulunmuştur. Islam ve ark. (5)'nün ise tip A tiplendirmesi yapmamış olması ile bu araştırmacılar ile karşılaştırılamamıştır. Tip B yönünden bakıldığında ise Gökçe ve ark. (8) ile Koç ve Gökçe (8)'nin çalışma bulguları ile uyumlu bulunurken, Islam ve ark. (5)'nün çalışmasından düşük, Naylor ve ark. (14)'dan yüksek bulunmuştur. Tip C bakımından Gökçe ve ark. (3) ile Koç ve Gökçe (8)'den düşük bulunurken, Naylor ve ark. (14) ile Islam ve ark. (5)'nün tip C bulgularından fazla bulunmuştur. Tip D değerlendirmesine göre ise Koç ve Gökçe (8)'den yüksek bulunurken, Gökçe ve ark (3), Naylor ve ark. (14), Islam ve ark. (5)'dan düşük bulunmuştur.

ELISA ve toksin nötralizasyon test sonuçları karşılaştırıldığında, Uzal ve ark. (21) *C.perfringens* tip D'nin epsilon toksini için ELISA ve toksin nötralizasyon test sonuçları arasında yüksek oranda benzerlik bulmuş, her iki tekniğinde benzer nitelikte ölçüm yaptığını belirtmişlerdir. Ancak ELISA metodunun daha kolay, duyarlı ve spesifik olarak sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada her iki metodu tekrar karşılaştırdıklarında ELISA testinin duyarlılığını toksin nötralizasyon testine göre daha fazla bulmuşlar, ELISA ile 43 adet örnek de pozitifliğe rastlarken toksin nötralizasyon testi sonucunda örneklerin 30 tanesinde pozitifliğe rastlamışlardır (22). Idrissi ve Ward (4) toksin nötralizasyon testi ile ELISA testi için yaptıkları karşılaştırmada ELISA testinin sensitivite ve spesifitesini toksin nötralizasyon testlerine göre daha fazla bulmuşlardır. Araştırmacılar ELISA testinin uygulama kolaylığı bakımından alternatif bir test olduğunu belirterek, toksin nötralizasyon testinin özellikle toksinin aktif-inaktif olma durumu, yıkılma gibi pek çok durumdan etkilenebileceğini bildirmişlerdir. Roskopf-Streicher ve ark. (20) da toksin nötralizasyon testlerine alternatif olarak ELISA testlerinin kısa sürede hızlı sonuç vermesi ve manipülasyon kolaylığı bakımından tercih edilebileceğini bildirmişlerdir. Moller ve ark. (13) *C.perfringens* ve toksinlerinin teşhisinde kullanılan toksin nötrali-

zasyon metodu ile ELISA yöntemini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar alfa toksin saptanmasında toksin nötralizasyon testinin sınırlı derecede yeterli olduğunu belirtmiş, beta toksin saptanmasında ELISA testinin iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan ELISA testi ve toksin nötralizasyon bulguları karşılaştırıldığında ELISA ile 37 örnekte pozitiflik saptanırken, toksin nötralizasyon testinde 25 adet örnekte pozitif sonuç alınmıştır. Bu çalışmada *C.perfringens*'in belirlenmesinde ELISA testinin toksin nötralizasyon metoduna göre daha fazla sayıda pozitiflik verdiği görülmüştür.

Lateks aglütinasyon testi de *C.perfringens* toksin tiplerinin belirlenmesi için kullanılan bir metottur. Kadra ve ark. (6) *C.perfringens* için toksin nötralizasyon ve lateks aglütinasyon testlerinin sonuçlarını karşılaştırmışlar, toksin nötralizasyon testi ile tip A olarak belirledikleri 47 örneğin lateks aglütinasyon testinde 4 adet tip A pozitifliği verdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar 5 adet tip B örneği için yaptıkları toksin nötralizasyon testinde örneklerin tamamını pozitif bulurken lateks aglütinasyon sonucunu negatif bulmuşlar, 11 adet tip C için toksin nötralizasyon testini pozitif belirlemişler, lateks aglütinasyon sonucunu ise negatif olarak bildirmişlerdir. Yirmi bir adet tip D örneği için toksin nötralizasyon testini pozitif bulurken, lateks aglütinasyonunda 1 adet pozitiflik, 1 adet tip E örneğinin ise hem toksin nötralizasyon hem de lateks aglütinasyonu için pozitiflik bulmuşlardır (6). Gökçe ve ark. (2) ELISA ve lateks aglütinasyon testlerini kullanarak yaptıkları çalışmada ELISA ile 260 bağırsak içeriğinin 220 tanesinde (%84,61), lateks aglütinasyonu ile 152'sinde (%58,46) *C.perfringens* toksinlerine rastlamışlardır. Bu örneklerin 40'ı (%15,8) ELISA, 108'i ise (%41,3) lateks aglütinasyonu ile negatif bulunmuştur. ELISA tiplendirmesinde 104'ü (%47,27) A, 20'si (%9) B tipinde, 10'u (%4,54) C tipinde ve 86'si (%39,7) D tipinde bulunmuş, lateks aglütinasyonu tiplendirmesinde ise 79'u (%51,97) A tipinde, 15'i (%9,86) B tipinde, 7 'si (%4,60) C tipinde, 51'i (%33,55) D tipinde tespit edilmiştir. İki test içinde en yüksek pozitiflik tip A ve tip D olarak belirlenmiştir. Enterotoksemi vakalarında, özellikle ani ölüm meydana gelen koyunlarda teşhis amaçlı sık kullanılan bir test olarak bildirilen lateks aglütinasyon testi ELISA ile karşılaştırıldığında hızlı ve kolay olmasına karşın duyarlılığı ve spesifitesi az olan bir test olarak belirlenmiştir (2). Lateks aglütinasyon testinde sonuçların yorumlanmasının bir

laboratuvar çalışması tarafından yapılması, ELISA testi sonucunun ise spektrofotometrik olarak verilmesi ELISA testinin duyarlılığını arttırmaktadır. Bu çalışmada incelenen örneklerin lateks aglütinasyon sonuçlarına bakıldığında; 2 örnekte alfa toksin, 16 örnekte epsilon toksin belirlendi. Elde edilen lateks aglütinasyon bulgularının toksin nötralizasyon ve ELISA sonuçları ile karşılaştırıldığında daha az sayıdaki örnekte pozitifliği belirlemesi bakımından bu testin *C.perfringens* toksinlerinin tiplendirilmesinde sınırlı sonuç verdiğini ve ek tiplendirme metodlarına gereksinim olduğu sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Bölgede yapılan enterotoksemi çalışmaları değerlendirildiğinde Kars ilinde %3,5 ile %84 arasında değişen oranlarda *C.perfringens* infeksiyonlarına rastlanırken (2,3,8), Elazığ ilinde %31 ile %50 arasında infeksiyona rastlanılmıştır (7,19). Toksin tiplendirilmesi değerlendirildiğinde Kars ilinde tip A %18-47 arasında, tip B %9-30, tip C %4-69, tip D %9-39 arasında bildirilirken, tip E ise belirlenmemiştir. Elazığ ilinde *C.perfringens* toksin tipleri değerlendirildiğinde tip A %13-95, tip C %15-31, tip D %5-54 oranlarında bildirilirken tip B ve tip E bildirim yapılmamıştır.

Bu çalışma sonuçları örneklerdeki *C. perfringens* pozitifliği üzerinden değerlendirildiğinde Kars ilindeki pozitif sonuçlar ile uyumlu, Elazığ ilinde yapılan çalışmalardan yüksek bulunmuştur. Tiplendirilen toksinler yönünden tip A bulguları Kars ilindeki çalışmalar ile benzer iken, Elazığ ilinden düşüktür. Tip B için Kars ili ile uyumlu bulunmuş ancak Elazığ ilinde tip B bulunmadığı için karşılaştırılamamıştır. Tip C bulguları Elazığ ili ile uyumlu bulunurken Kars ilindeki bulgulardan düşük bulunmuş, tip D bulguları her iki il ile de benzer bulunmuştur. Tip E ise bu çalışmada da belirlenmemiştir. Bu bulgu diğer araştırmacıların sonuçları ile paralel bulunmuştur. Erzurum iline yakın illerde yapılan çalışmalar ile bu çalışma bölgede enterotoksemisinin yaygınlığını ve toksinlerinin tip dağılımı da ortaya koymaktadır.

Bu çalışma ile Erzurum ilinde %52,8 oranı ile enterotoksemisinin yaygın bir infeksiyon olduğu belirlendi. Tiplendirme yöntemleri bakımından ELISA metodunun, toksin nötralizasyon ve lateks aglütinasyon metodlarına göre daha fazla örnekte pozitiflik verdiği görüldü. ELISA sonuçlarına göre tip A'nın en yüksek düzeyde olduğu, bunu tip C ve

tip D'nin takip ettiği, daha az oranda da tip B'nin bulunduğu tespit edildi. Bu sonuçlar diğer enterotoksemi çalışmaları ile karşılaştırıldığında, enterotoksemi vakalarının hayvan popülasyonu, merada beslenme, aşılamalar, coğrafik durum ve iklim gibi pek çok parametreden etkilendiğini göstermektedir.

Elde edilen bu sonuçlar ile Erzurum ilinde enterotoksemi kontrolünde aşılamaların kontrollü, yaygın bir şekilde yapılmasının ve uygulanacak aşılar da başta tip A olmak üzere, tip C, tip D ile tip B'nin de bulundurulmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma TC. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM/HS/09/01/02/148 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. **Akan M**, (2006). *Clostridium Hastalıkları*. Aydın N, Paracıkoğlu J. Eds. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). İlke Emek Yayınları, Ankara. p. 73-86.
2. **Gökçe Hİ, Genç O, Sözmen M, Gökçe G**, (2007). *Determination of Clostridium perfringens toxins types in sheeps with suspected enterotoxemia in Kars province*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31, 355-360.
3. **Gökçe E, Ünver A, Erdoğan HM**, (2010). *İshalli neonatal kuzularda enterik patojenlerin belirlenmesi*. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 16, 717-722.
4. **Idrissi AH, Ward GE**, (1992). *Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Clostridium perfringens enterotoxemias*. Vet Microbiol. 31, 389-396.
5. **İslam KBMS, Rahman MS, Ershauzzaman M, Taimur MJFA, Jang H, Song H**, (2010). *Detection of C.perfringens and its toxinotypes by ELISA from enterotoxaemic goats in Bangladesh*. Korean J Vet Serv. 33, 37-44.
6. **Kadra B, Guillou JP, Popoff M, Bourlioux P**, (1999). *Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic C.perfringens strains by classical methods and polymerase chain reaction (PCR)*. FEMS Immunol Med Microbiol. 24, 259-66.
7. **Kalender H, Ertas HB, Cetinkaya B, Muz A, Arslan N, Kılıc A**, (2005). *Typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased sheep by multiplex PCR*. Vet Med Czech. 50, 439-442.
8. **Koç R, Gökçe Hİ**, (2007). *Determination of the toxins and biotypes of C.perfringens in diarrhoeic calves in the Kars district of Turkey*. Turk J Vet Anim Sci. 31, 207-11.
9. **Laboratuvar Metot Birliği**. Koruma-Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara. Erişim adresi: <http://www.kkgm.gov.tr/genel/birimfaal.html>
10. **McClane B, Strouse RJ**, (1983). *Rapid detection of C.perfringens type A enterotoxin by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. J Clin Microbiol. 19, 112-115.
11. **Miyakawa MEF, Uzal FA**, (2005). *Morphologic and physiologic changes induced by Clostridium perfringens type A alfa toxin in the intestine of sheep*. AJVR. 66, 251-255.
12. **Miyakawa MEF, Fisher DJ, Poon R, Sayeed S, Adams V, Rood J, McClane BA, Uzal FA**, (2007). *Both Epsilon toxin and Beta toxin are important for the lethal properties of C.perfringens type B isolates in the Mouse intravenous injection model*. Infect Immun. 75, 1443-1452.
13. **Moller K, Ahrens P**, (1996). *Comparison of toxicity neutralization-ELISA and PCR tests for typing of Clostridium perfringens and detection of the enterotoxin gene by PCR*. Anaerobe. 2, 103-110.
14. **Naylor RD, Martin PK, Barker LT**, (1997). *Detection of Clostridium perfringens alfa toksin by enzyme-linked immunosorbent assay*. Res Vet Sci. 63, 101-112.
15. **Niilo L**, (1980). *C.perfringens in animal disease: a review of current knowledge*. Can Vet J. 21, 141-148.
16. **Niilo L**, (1986). *Experimental production of hemorrhagic enterotoxemia by C.perfringens tip C in maturing lamb*. Can J Vet Res. 50, 32-35.
17. **Niilo L**, (1987). *Toxigenic characteristics of C.perfringens tip C in enterotoxemia in domestic animals*. Can J Vet Res. 51, 224-228.
18. **OIE** (2004). *Epsilon toxin of Clostridium perfringens*. Institute for International Cooperation in animal biologics. Iowa State University.
19. **Özcan C, Gürçay M**, (2000). *Elazığ ve çevresinde 1994-1998 yılları arasında küçük ruminantlarda enterotoksemi insidensi*. Turk J Vet Anim Sci. 24, 283-286.
20. **Roskopf-Streicher U, Volkens P, Werner E**, (2003). *Control of Clostridium perfringens vaccines using an indirect competitive ELISA for the epsilon toxin component*. Pharmeuropa Bio. 2, 91-96.
21. **Uzal FA, Nielsen K, Kelly WR**, (1997). *Detection of Clostridium perfringens type D epsilon antitoxin in serum of goats by competitive and indirect ELISA*. Vet Microbiol. 51, 223-231.
22. **Uzal FA, Kellay WR, Thomas R, Hornitzky M, Galea F**, (2003). *Comparison of four techniques for the detection of Clostridium perfringens type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats*. J Vet Diagn Invest. 15, 94-99.
23. **Watson PJ, Scholes SFE**, (2009). *Clostridium perfringens type D epsilon intoxication in one day old calves*. Vet Rec. 164, 816-818.