

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ)**

**TÜRKİYE'DE İHRAÇ EDİLEN ÇİFT KABUKLU  
YUMUŞAKÇALARDAN (BİVALVE TÜRLERİNDEN)  
VİBRİO TÜRLERİNİN İZOLASYON VE  
İDENTİFİKASYONU**

**Yavuz DEMİR**

**Tez Danışmanı: Doç.Dr. T. Tansel TANRIKUL**

**Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu: 621.01.07**

**Sunuş Tarihi: 08.03.2011**

**Bornova - İZMİR**

**2011**

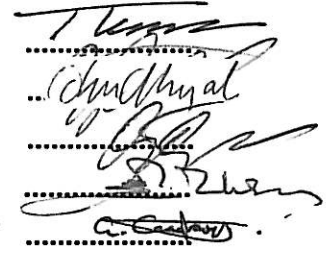


**Yavuz DEMİR** tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**TÜRKİYE’DE İHRAÇ EDİLEN ÇİFT KABUKLU YUMUŞAKÇALARDAN (BİVALVE TÜRLERİNDEN) VİBRİO TÜRLERİNİN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.03.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı** : Doç. Dr. T. Tansel TANRIKUL  
**Raportör Üye** : Prof. Dr. Okan AKYOL  
**Üye** : Prof. Dr. Osman ÖZDEN  
**Üye** : Doç. Dr. Erol TOKŞEN  
**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Çağatay CEYLAN





**ÖZET****TÜRKİYE’DE İHRAÇ EDİLEN ÇİFT KABUKLU YUMUŞAKÇALARDAN  
(BİVALVE TÜRLERİNDEN) VİBRİO TÜRLERİNİN İZOLASYON VE  
İDENTİFİKASYONU**

DEMİR, Yavuz

Doktora Tezi, Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç.Dr. T. Tansel TANRIKUL

Mart 2011, 93 sayfa

Bu doktora tezinde, Ege ve Marmara denizi kıyılarında kültürü yapılan ÇKY türlerinden kontaminasyon sonucu insanlarda enfeksiyona sebebiyet veren *Vibrio* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu yapılmıştır. Araştırmada materyal olarak Marmara ve Ege bölgesindeki üretim istasyonlarından 6 adet ÇKY türünden yaklaşık 958 adet kullanılarak bakteriyolojik yönden incelendi. Toplam olarak 35 adet *Vibrio* spp. fenotipik testlerle identifiye edildi.

Araştırma sonucunda kullanılan 6 adet ÇKY türünden, çoğunlukla *Vibrio paraheamolyticus* ve *Vibrio alginolyticus* izole edildi. Araştırmada esas alınan Marmara ve Ege sahil şeridinde bu bakterilerin yoğun olduğu belirlendi.

**Anahtar sözcükler:** Bivalve spp., *Vibrio* spp., İdentifikasyon



**ABSTRACT**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *VIBRIO* SPP. FROM BIVALVE  
SPP. WHICH ARE EXPORTED BY TURKEY**

DEMİR, Yavuz

Ph D. thesis, Department of Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. T. Tansel TANRIKUL

March 2011, 93 pages

In this Ph D. Project, *Vibrio* spp., causing infections in humans as a result of contamination, were isolated and identified from the costs of Egean and Marmara Sea in which bivalve species have been cultured. The material of this research was approximately sum of 958 Bivalve spp., chosen from 6 bivalve species which have been produced in regions of Egean and Marmara Sea, were investigated from the aspect of bacteriology. Totally 35 *Vibrio* spp. were identified by phenotypic tests.

As a result of this research, with a majority, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* were isolated from samples, chosen from 6 bivalve species. In Project, these microorganisms, detected in this project, were densely determined in the costs of Egean and Marmara Sea lines which are accepted main districts.

**Keywords:** Bivalve spp., *Vibrio* spp., Identification



## TEŞEKKÜR

Bu alıőma sũresince gerekli örneklerin sağlanmasında kolaylık gösteren Tarım Bakanlığı İzmir İl Kontrol Laboratuvarı çalıőanlarına, özellikle kıymetli görüşlerinden yararlandığım ve yakın ilgisini esirgemeyen Prof. Dr. Haőmet AğIRGAN ve Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY' a, tezin biçimlenmesinde değerli katkılarını aldığım değerli hocalarım Prof. Dr. Osman ÖZDEN, Prof. Dr. Okan AKYOL, Doç. Dr. T. Tansel TANRIKUL, Doç. Dr. Erol TOKŞEN ve Yrd. Doç. Dr. Çağatay CEYLAN' a teőekkũrũ bir borç bilirim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vii
TEŞEKKÜR .....	ix
İÇİNDEKİLER .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
ŞEKİL DİZİNİ .....	xiv
SİMGE VE KISALTMALAR .....	xv
1. GİRİŞ .....	1
2. MATERYAL VE METOT .....	24
2.1 Materyal .....	24
2.1.1 Örnekler .....	24
2.1.2 Standart <i>Vibrio cholerae</i> suşu .....	26
2.1.3 Standart <i>V. parahaemolyticus</i> suşu .....	26
2.1.4. Deney hayvanları .....	27
2.1.5 ONPG (Ortho-Nitro-Phenil-β-Galacto-Pyranoside) Reagent disk (Oxoid) .....	27
2.1.6 DD15/ 0129 (150 µg. / 10 µg.) Reagent disk (Oxoid) .....	27
2.1.7 Oksidaz kiti (Merck) .....	27
2.1.8 Besiyerleri .....	27
2.1.10 Ayıraçlar .....	32
2.1.11 Otomatize identifikasyon sistemi .....	33
2.2 Mikrobiyolojik Muayene .....	33
2.3 Metot .....	38
2.3.1 İzolasyon prosedürü .....	38
2.3.2 İdentifikasyon prosedürü .....	39
2.3.3 Vitec II cihazı ile identifikasyon (Vitek-II Compact Biomerioux) .....	48
2.4 Standart Serotiplerden Hiperimmun Antiserum Hazırlanması .....	49
2.4.1 Hiperimmun serumların titrasyonlarının belirlenmesi .....	49
3. BULGULAR .....	51
3.1 Mikrobiyolojik Muayeneler .....	51
3.2 İzole Edilen <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Suşlarının Serolojik Muayenesi .....	51
3.3 İdentifiye Edilen Saha Suşları .....	52

3.4 Sahadan İdentifiye Edilen <i>Vibrio</i> Türleri ve Sayıları.....	53
3.5 Numune Alınan Bölgelerde <i>Vibrio</i> Türlerinin Tespit Oranları.....	53
4. TARTIŞMA .....	56
5. SONUÇ.....	70
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	93

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Üretim tesislerinden alınan ÇKY türlerinin aylara göre dağılımı ve sayıları .....	26
2.2 Peptonsuz falkov besiyeri sarf madde miktarları.....	31
2.3 <i>Vibrio</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri .....	34
2.4 İnsan patojeni <i>Vibrionaceae</i> familyasının biyokimyasal özellikleri.....	36
2.5 Biyokimyasal testlerin yorumlanması. ....	37
3.1 Araştırmada kullanılan Bivalve spp. örneklerinden izole edilen <i>Vibrio</i> spp. saha suşlarının aylara ve ÇKY türlerine göre dağılımı .....	52
3.2. Araştırmada kullanılan ÇKY örneklerinden izole edilen <i>Vibrio</i> genusu izolatlarının dağılımı ve sayısı.....	53
3.3 Sahadan izole edilen <i>Vibrio</i> türlerinin idetifikasyon özellikleri.....	54
3.4 <i>Vibrio</i> türlerinin Çanakkale, Ayvalık ve İzmir bölgelerindeki yetiştirme istasyonlarında tespit oranları.....	55
4.1 <i>Vibrio</i> türlerinin insanlarda oluşturduğu klinik sendromlar.....	66
4.2 <i>V. cholerae</i> sıcaklık- zaman dayanıklılık çizelgesi.....	67
4.3 <i>V. parahaemolyticus</i> sıcaklık- zaman dayanıklılık çizelgesi.....	67
4.4 <i>V. vulnificus</i> sıcaklık- zaman dayanıklılık çizelgesi.....	68

## ŞEKİL DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Tez çalışmasında kullanılan örneklerin tedarik edildiği ÇKY üretim istasyonu bölgelerinin harita üzerinde gösterimi.....	25

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
$\beta$	Beta
$\mu\text{g}$	Mikrogram
Ad.	Adet
ADH	Arjinin dihidrolaz
APW	Alkali Pepton Water
CDC	Centers for Disease Control
ÇKY	Çift Kabuklu Yumuşakça
diğ.	Diğerleri
d.	Dakika
FDA	Food and Drug Administration
LDC	Lizin dekarboksilaz
LPS	Lipopolisakkarit
MR/VP	Metil red/Voges Proskauer
IDSC	Infectious Disease Surveillance Centre
ISO	International Organization for Standardization
IV	İntravenöz
ODC	Ornithin dekarboksilaz
TCBS	Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar
TCP	Toksin ilişkili pilus
SC	Subcutan
TDH	Termostabil Hemolizin
TRH	TDH related hemolizin
VBNC	Viable bu not culturable

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
yy.	Yüzyıl
WHO	Dünya Sağlık Ögütü

## 1. GİRİŞ

İnsanoğlu yaşadığı her devirde sahip olduğu hayatta daha iyi koşulları ve daha sağlıklı ve uzun hayat arayışı içinde olmuştur. Bu arayışın getirdiği talep doğrultusunda insanlar dünya çapında en iyi ve en sağlıklı gıdalar olarak bilinen esansiyel amino asit ve esansiyel yağ asidi kaynaklarını gıda olarak kullanmayı ön planda tutmuşlardır. Bu arayış, içinde bulunduğumuz yüzyılda insanlığın ardı ardına ortaya koyduğu bilimsel ve sağlık alanında keşiflerden sonra, yüzyılın getirdiği ekonomik refahın artması sonucu, insanların alım gücü artmış ve daha sağlıklı ve daha memnuniyet verici hayatın arayışı artmıştır.

Yukarıda belirtilen arayışların ortaya çıkardığı ihtiyaçlar sonucu, insanlar dünya çapında gıda olarak deniz ürünleri tüketimini daha çok tercih eder olmuşlardır. Deniz ürünleri, yüksek protein kaynaklı ve sağlıklı yaşamın gerektirdiği esansiyel amino asit ve yağ asitlerini içermesi ile ve insanlara farklı bir damak tadı sunması ile ülkelerde gıda sektörünün önde gelen lokomotiflerinden olmuş, geçen son 20 yılda büyük üretim şirketleri kurulmuştur. Böylece, gıda tüketimine sunulmak üzere büyük ve uluslar arası ticaret yapan ÇKY üretim tesisleri kurulmuştur. Bu gelişim özellikle denize ve okyanuslara kıyıda bulunan Avrupa ve Asya ülkelerinde yüksek oranda gelişim göstermektedir.

Ülkemiz de üç tarafı denizlerle çevrili, Akdeniz ve Karadeniz' e kıyıda olan ülkeler arasında olduğundan, ticari ÇKY üretimi yapan şirketlerin son yıllarda, arttığı gözlemlenmektedir. Bu ticari talebin getirdiği bir ihtiyaç olarak, bu üretim çiftliklerinden elde edilen deniz ürünü gıdaların insanlara en sağlıklı bir biçimde ulaştırılması ihtiyacı ortaya çıkmıştır. İşte bu ihtiyaçtan dolayı, gıda olarak insanların ÇKY tüketiminden ortaya çıkan sorunları çözmek için sağlık alanında birçok araştırma yapılmaktadır.

Cook (1994)' un ÇKY' ler üzerine yaptığı çalışmalarda, bu canlıların deniz suyunu filtre ederek beslenen canlılar olduğu için solungaç silialarından deniz suyunu transfer ederek patikülleri solungaç filamentlerine gönderdikleri, mukus salgılayan filamentler bir çok organizmayı ve inorganik partikülü yakalayarak

fiziksel ve kimyasal karakterlerine göre partikülleri ayırdıkları, partiküllerin mideye ulaştığı zaman kristalin tarzı enzimleriyle sindirime başladıkları ifade edilmektedir. Sindirim ürünleri digestiv divertiküle transfer edilerek oradan absorbe edilir. Absorbe olmayan partiküller barsakları geçerek anüsten atılırlar, Paster ve diğ., (1996) yaptıkları araştırmalarda bazı mikroorganizmaların digestiv aşamaya direndiklerini belirtmişlerdir.

Wright ve diğ., (1982) ve Charles ve diğ., (1992) yaptıkları çalışmalara göre, midyeler 1- 2 µm boyutundaki partikülleri tutma özelliklerine sahiptirler. Fakat ÇKY' lerin sudan direk bakteri tutma kapasiteleri hala tartışılmaktadır. ÇKY'lerin bakterileri direk kendileri mi yoksa trofik linkleri ile mi süzdükleri hala tartışma konusudur. Her ne şekilde olursa olsun deniz ortamında yaygın olarak bulunan *Vibrio spp.* türü bakteriler ÇKY' lerde bulunabilirler (Capello ve diğ., 2003).

Wright ve diğ., (1996); Daniels ve diğ., (2000) ve Volety ve diğ., (2001) ÇKY' lerin çok sayıda sucul ortam bakteri türleri için habitat teşkil ettiğini ifade etmektedirler. Bunların bazıları insan gıdası olarak tüketimi sonucu şiddetli gastroenteritis vakalarına sebep olmaktadır. ÇKY' lerin bakteriyel ekolojisini daha iyi anlamak, çiftliklerin daha yüksek üretimini sağlamak ve insan gıdası tüketimi olarak kullanımlarında güvenliklerini arttırmak açısından önemlidir.

Her ne kadar bu vertebraların mikrofloraları hakkında çok az yayın olsa da Colwell ve Listin (1960), Kueh ve Tamplin (1985), Prieur (1987), Olafsen ve diğ., (1993) gibi yazarlar *Vibrio spp.*lerin koloni sayımlarının 30'a varan oranlarda izole edildiklerini açıklamışlardır. *V. parahaemolyticus*'un, Şili'de pişmemiş kabuklu tüketimi ile ilgili çıkan gastroenteritis salgınlarının etiyolojik ajanı olduğu raporlanmıştır (Capello, 2003).

ÇKY' ler, deniz suyundaki partikülleri süzerek beslenirler. Gıdaları, deniz suyunda yaşayan mikroorganizmaların karışımı ve genişçe alana yayılan büyüklükteki inorganik partiküllerden oluşmaktadır. *V. parahaemolyticus* gibi bazı heterotropik mikroorganizmaların ÇKY'lerin sindirim sürecine girerek dokularına yerleştiği söylenmektedir. Çoğu *V. parahaemolyticus* serotipleri insanlar için patojen olduğundan, su ürünleri ve insan gıda tüketim sağlığında

daimi bir tehlike oluşturmaktadır. Deniz ürünleri tüketim güvenliğini arttırmak için *Tiostrea chilensis* (Şili istiridyesi) ve *V. parahaemolyticus*'un ilişkisi hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak önem arz etmektedir. ÇKY' ler genellikle dünya çapında yüksek sağlık riski taşıyan gıda grubu olarak kabul edilmektedirler (Capello, 2003).

Walne (1958); Tubiash ve diğ., (1965); Elston ve diğ., (1981); Lodeiros ve diğ., (1987); Dungan ve Elston (1988); Dungan ve diğ., (1989) ve Nicolas ve diğ., (1992) ÇKY üretim çiftliklerinde üretimi yapılan ÇKY' lere görülen bir çok hastalık problemlerini gram negatif mikroorganizmalara atfetmektedirler Hada ve diğ., (1984) yaptıkları yayında özellikle *Vibrio* türlerini, her ne kadar bazıları tanımlansa da (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus* ve *V. tubiashii*), çoğunu tür düzeyinde tanımlayamadıklarını ifade etmektedirler. Elston ve diğ (1982) enfeksiyonların şiddetini, dipte ölü birikimi ya da ölü larva, kontamine alg yemleri gibi bakteriyel gelişimi ve yoğunluğunu artırıcı ve enfekte larvaların immun sisteminin yetersizliğine neden olan kötü üretim koşulları ile ilişkilendirmişlerdir.. Fakat *Vibrio* türlerine hassasiyet çeşitlilik göstermektedir. Sindermann (1988),  $10^2$  adet / ml *Vibrio* spp. hücrelerinin midye larvalarında enfeksiyon oluşturmaya yeterli olduğunu belirtirken, Perkins (1993) diğer ÇKY' lerin  $10^5$  / ml yi tolare edebildiklerini belirtmiştir. Bu nedenle *Vibrio* türlerinin potansiyel enfekte konsantrasyonlarını genellemek mümkün olmamaktadır (McGladdery, 1999).

ÇKY' ler toplandıktan sonra kuruma ya da soğuk zincir dışında kalma gibi mikrobiyel kompozisyonlarını önemli oranda değiştirecek durumlarla karşı karşıya kalabilirler. Romero ve diğ., (2002) çalışmalarında *Tiostrea chilensis* (Şili istiridyesi)' in stoklanma süresince bakteri sayısının 50-100 kat değişebileceğini göstermiştir. *Crassostrea virginica* (Pasifik istiridyesi) ve *Crassostrea gigas* (Pasifik istiridyesi)' in  $10^0\text{C}$ ' nin altında stoklanması sonucu *Vibrio parahaemolyticus* ve *V. vulnificus*'un azaldığını gözlemlemişlerdir. Her nasılsa, ÇKY' ler  $20\text{ }^\circ\text{C}$ ' de stoklandıklarında bakteri konsantrasyonları çok yüksek seviyeye ulaşabilmektedir (Cook 1994, DePaola ve diğ., 1990). ÇKY' lerdeki patojenik *Vibrio* türleri su ısısına bağlıdır (Murphree ve Tamplin, 1995). DePaola (1990) yaptığı çalışmada *Vibrio. parahaemolyticus*' un ÇKY' lerdeki

yoğunluğunun, midye türlerine (*C.virginica* ve *C.gigas*) ya da su sıcaklığına bağlı olduğunu göstermektedir (Capello, 2003).

*Vibrio* türleri doğal ortamda ve deniz suyunda bol miktarda bulunurlar. Bu yüzden etiyolojik ajan olarak *Vibrio* türlerinin eradikasyonu imkânsızdır. *Vibrio* enfeksiyonları direkt olarak pestisit, ağır metal, toksik fitoplankton, petrol ürünü toksikantlarının etkilediği su kalitesine ve kötü üretim koşulları ile direk olarak bağlantılı olduğu görülmektedir. Enfeksiyon kaynakları, üretim alanları ve su kaynağındaki alg kültürleridir. *Vibrio* türleri, üretimi yapılan ÇKY alanlarındaki üretim metabolitleri ya da alg kültürlerinden kaynaklanan çözülmüş organik substratların üretim sisteminde artmasıyla tespit edilebilir (Austin ve diğ., 1988).

*Vibrio* spp.'lerden kaynaklanan su kaynaklı hastalıkların mortalite ve morbiditesi, potansiyel patojenitesini, duyarlılığını, bakteri kontaminasyon mevcudiyetinin aydınlatılması için hasat tespit teknikleri kullanılmalıdır. Bu genusun üyeleri, doğal ortamda mevcut olan deniz ve denize açılan akarsu ağzlarında tüm dünyada bulunurlar. Her ne kadar *Vibrio* spp.'lerin geniş çoğunluğu insanlar için nonpatojenik olsa da, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* özellikle su ve gıda kaynaklı hastalık oluşturabilen önemli insan patojenleridir. *V. cholerae* O1 ve O139 serogrubu en önemli patojenik türlerdir. Her ne kadar *V. cholerae*' ya benzer virulens faktörleri olsa da *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. mimicus* değişik virulens faktörlerle ilişkilendirilmişlerdir. Her ne kadar bu üyelerin oluşturdukları enfeksiyonlar arasındaki mekanizmal farklılıklar olsa da, bu türün üyelerinin her biri özellikle *V. cholerae* ve *V parahaemolyticus* serotip O3:K6 hala mevcut olan 2 pandeminin sorumlularıdır. Böylece *Vibrio* spp. enfeksiyonlarının oluşturduğu morbidite ve mortalite akvatik ortamlardan eradike edilememektedirler (Vora ve diğ., 2005).

*Vibrio* genusu, gram negatif, fakültatif, anaerobik, spor oluşturmeyen kıvrık basil formu ile oksidaz pozitif ve halofilik mikroorganizmalardır. *Vibrio* türlerinin çoğu insanlar için patojeniktir. Birçok ılık kıyı sularına sahip ÇKY ve diğer deniz ürünlerinin tüketildiği ülkelerde insanların sindirim sistemi enfeksiyonu etkeni olduğu belirtilmiştir. (Hayashi ve diğ., 2006).

*Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* fenotipik olarak birbirine yakın halofilik mikroorganizmalardır ve ılık sularda, akarsu ağızlarında, gıda olarak tüketilen deniz ürünlerinde bulunurlar (Lizzarga ve diğ., 1997 ve Oliver, 1989). Bu mikroorganizmaların çevreden insanlara bulaşma yolu, az pişmiş ya da çiğ deniz ürünlerinin ve ÇKY'lerin gıda olarak tüketilmesi sonucu görülür (Jaksic ve diğ., 2002).

*Vibrio* genusu, öncelikle denizde yaşayan sucul canlılarda bulunmaktadır. Bu yüzden mevcudiyetleri metal iyonları kirliliğinden bağımsız fakat denizdeki organik maddelere, sıcaklık ve tuzluluk oranına bağlıdır. *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* gibi bu türün bazı üyeleri insanlarda intestinal enfeksiyonlara neden olmaktadır (Daniels ve diğ., 2000; O'Neill ve diğ., 1992; DePaola ve diğ., 1994). *V. parahaemolyticus*, gram negatif, halofilik bakteri olarak doğal deniz ve deniz ortamına açılan su ağızlarında bulunur (Capello, 2003).

Geliştirilen laboratuvar metotları *Vibrio* spp. identifikasyonunda ve tespitinde konvansiyonel, serolojik ve biyokimyasal testlerin takip ettiği kültürel yöntemlere dayanmaktadır. Fakat bu metotlar, zaman kaybı, işgücü ve sarf madde kaybı oluşturmakta ve insanlarda enfeksiyonlarla ilişkili virülens faktörleri direk olarak tespit etmede bazen yetersiz kalmaktadırlar. Her ne kadar kullanımı kolay olsa da *Vibrio* spp. identifikasyonu için mevcut ticari ürünler yeterli olmamaktadır, tür ayırımında doğrulama için sıkça tamamlayıcı testler gerektirmektedir (Blackstore ve diğ., 2003). Bu yüzden, kullanılan mevcut patojen identifikasyon metotları zararlı vibrioları tanımlamada potansiyel hatalar görülebilmekte ve yetersiz kalmaktadır.

*Vibrio* türleri, anaerobik, oksidaz pozitif, O/129 vibriostatik ajana duyarlı, gram negatif kıvrık çubuklardır. İki türü hariç diğer tüm türleri halofilik mikroorganizmalardır. *Vibrio ordalii* Vibriosis' in fırsatçı etkenidir. *Vibrio* türleri, su ürünlerinde enfeksiyona sebep olan bilinen en eski ajanlardır. Bugün, organizma grubu, MacDonell ve Colwell ve Listin (1960) *V. anguillarum* ve *V. ordalii*'nin *Listonella* genusu içinde tekrar sınıflandırılmasını önerdiklerinde bir karışıklık içinde kalmıştır (Stickney, 2000).

*Vibrio* türleri, gerekli olarak, diğer birçok bakteride, özellikle *V. alginolyticus*'da yaygın olduğu gibi besiyerinde ürerken sukrozu fermente edebilme kabiliyetine dayanırlar. *V. alginolyticus* besiyerinde kolayca ürer ve *V. parahaemolyticus* kolonilerinin tespitini limitleyebilir. Bunun yanında izole edilen izolatların patojenitesini doğrulamak için tdh ve trh genlerini kontrol etmek gerekmektedir (Rosec ve diğ., 2009).

Birçok bilinen gıda zehirlenmesi sendromları çeşitli gıdalardan kaynaklanırken deniz ürünleri *Vibrio parahaemolyticus*'dan ileri gelen gıda zehirlenmelerinde hemen hemen tek kaynak olarak gösterilmektedir. *Vibrio parahaemolyticus* Japonya'da ve diğer dünya ülkelerinde hem gıda kökenli zehirlenmelerin nedeni olarak hem de sağlığı etkileyen bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu mikroorganizmanın ılık kıyı sularında yaygın olarak bulunması, bu sularda avlanılan deniz ürünlerinin dağıtımın, depolanmasının hatta işlenmesinin uygun koşullarda yapılmaması kontaminasyon riskini yükseltirken, üretim hızının da yüksek oluşu enfeksiyonda önemli bir faktör olarak ortaya çıkmakta ve zehirlenmelerin temel kaynağını oluşturmaktadır.

Su ürünleri ihracatımızda bir sorun olarak karşımıza çıkan önemli bir değişkeni oluşturduğu göz önünde bulundurularak Batı Anadolu ve Marmara bölgesinde bulunan çift kabuklu yumuşakça üretim istasyonlarından elde edilen canlı ÇKY' lerle çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Aydın ve Soytemiz, 2002).

Tüketiciler için güvenlik talebi, yüksek hidrostatik basınçla işlenmiş (HPP) metotlar gibi, ısıl işlem görmemiş ticari metotlarla hazırlanan ve sektörün itici gücü olacak taze ya da çiğ gıdaların besin kalitesi, tat, görünüş ve tazeliği ile tüketiciler için güvenliği talep konusu olmaktadır. HPP ler ısıl işlem görmüş uygun ya da düşük ısıda tat ve gıda kalitesi için gerekli olan besin yapılarını denatüre etmeden içindeki mikroorganizmalar ve zararlı enzimleri inaktive etmektedir (Berlin ve diğ., 1999).

Deniz kaynaklı *Vibrio* spp.'ler ABD ve Avrupa'daki çeşitli bölgelerde raporlandıkları gibi hastalık ve ölümlerden sorumlu tutulmaktadırlar, Elston (1984), Tubiash ve diğ., (1970) yaptıkları çalışmalarda *V. alginolyticus* ve

*V. anguillarum* olarak tanımlamışlardır. Belirtilen etkenlerin ÇKY larvalarında ölümlere sebep oldukları Avrupa ve ABD' de çeşitli tarihlerde yapılan bir çok çalışmada tespit edilmiştir. *Vibrio* türleri çeşitli coğrafik bölgelerden raporlanmışlardır. Elston (1984, 1993) yaptığı çalışmada, *Vibrio* türlerinin yoğun üretim yapılan ÇKY çiftliklerinde fırsatçı hastalık etkeni olduklarını belirtmiştir (Sugumar ve diğ., 1998).

Kıyı bölgeleri ve denize açılan akarsu ağızları birçok *Vibrio* türünün ortamı olarak kabul edilir. Amerika ve Avustralya'daki körfez kıyıları *V. cholerae*'nin endemik olarak görülmüş olduğu belirtilen yerlerdir. Çünkü *Vibrio* spp. ler sudaki asılı duran materyallere tutunurlar. Bu bölgelerde yaşayan ÇKY' ler, beslenmeleri sırasında *Vibrio* spp. ler de aldıkları düşünülmektedir (Lyon, 2001).

*Vibrio* türleri siliostatik faktör ve hemolizinler gibi eksotoksinler üretmektedir. Brown ve Roland (1984); Nottage ve Birkbeck (1986); Nottage ve diğ., (1989) çalışmalarında bu toksinlerin ÇKY larva dokularında nekrozlara neden olduklarını tespit etmişlerdir. Enfeksiyon şiddeti, yüksek su sıcaklıkları ve aşırı stoklama, yetişkinlerde ve özellikle premetamorfik larvalarda 'Larval Nekrozis' adı verilen enfeksiyonun şiddetini arttırmaktadır (Tubiash ve diğ., 1965). Yetişkin midyelerin perikardial sıvılarından ve kardiak ödemlerinden izole edilen *Vibrio anguillarum* ile larvalarda yapılan deneysel enfeksiyonlarla etkenin yüksek patojenik olduğu tespit edilmiştir. Fakat yetişkinlerde enfeksiyonlar seyrekdir. *Vibrio anguillarum* ve *Vibrio tubiashii*' nin düşük konakçı spesifitesi göstermekte olduğu ve geniş mollusk türlerine etki ettikleri tespit edilmiştir. (Brown 1981, Jeffries 1982 ve Garland ve diğ., 1983).

Kuzeybatı Avustralya'daki yüksek ölüm oranlarıyla seyreden durumlar *Vibrio* spp. enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. (Dybdal ve Pass 1985, Pass ve diğ., 1987). Klinik belirtileri göstermeyen midyelerden *Vibrio harveyi* izole edilmiştir. Enfeksiyon, inci midyelerinin (*Chamelea gallina*) yaban sahalarındaki çiftliklerinden yapılan taşıma koşullarından, özellikle su sıcaklığının 18 °C den yüksek olduğu durumlarda ilişkilendirilmiştir (McGladdery, 1999).

Toranzo ve Barja (1990), yaptıkları çalışmalarında ÇKY'lerde *V. anguillarum* izole ettiklerini belirtmişlerdir. Yayınladıkları listede ABD, İngiltere ve İspanya'da üretimi yapılan Avrupa midyesi'nden (*Ostrea edulis*) ve Pasifik istiridyesi'nden (*Crassostrea virginica*) *V. anguillarum* izolasyonları belirtilmiştir. Son yıllarda, özellikle çığ Bivalve spp. lerden ve yeteri kadar pişmemiş deniz ürünlerinin gıda olarak tüketilmesinden kaynaklanan ciddi enfeksiyonlar raporlanmıştır (Mascola ve diğ., 1996). Batı Avustralya'da inci midyelerin üretim yerlerinden toplanma ve taşınmasından sonra %80' den fazla ölüm görülmüş ve yapılan mikrobiyolojik analizler sonucu *V. harveyi* izole edilmiştir (Actis ve diğ., 1999).

Deneysel çalışmalar, ÇKY' lerde değişik *Vibrio* türlerinin enfeksiyona sebep olduğunu göstermiştir. Yetişkin ÇKY' ler, insanlarda *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus*'tan kaynaklanan gıda enfeksiyonlarında bir hastalık belirtisi göstermeden *Vibrio* türlerini taşımaktadırlar (Austin, 2002).

*Vibrio* türleri içinde su ürünleri ekonomisine zarar veren türler arasında *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. ordalii*, *V. vulnificus*, gibi önemli türler bulunmaktadır. *Vibrio vulnificus*, 2 biyotipten oluşmaktadır. Fakat bir biyotipi, çığ ÇKY' lerin gıda olarak kullanılması ve elle teması ile enfeksiyon oluşturan fırsatçı gıda patojenidir. Biotip-2 bir balık patojeni olmasına rağmen aynı zamanda balık çiftliklerinde potansiyel tehlike oluşturarak insanlarda da enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir. Fakat biyotip-1 ve 2 antijenik olarak birbirinden farklılık göstermektedir (Toranzo ve diğ., 1986).

*Vibrio* türleri, ısı ile kolayca öldürülebilirler. Bu yüzden uygun pişirme koşulları, birçoğunu elemine etmek için yeterlidir. Fakat tabii yollarla kontamine yengeçlerde *V. cholerae* O1 kaynama ısısında 8 d., buharda 25 d. dan fazla canlı kalabilmektedirler (Blake ve diğ., 1980).

Bu patojenlerin çok sayıda balıklardan ve ÇKY' lerden izole edildiklerini belirtmek önemlidir (Grisez ve diğ., 1997). Bu patojenlerin birçok antibiyotiğe dirençli olması nedeniyle bu enfeksiyonların tehlikeleri yüksektir (Lee, 1996). Wong ve diğ., (1999) yaptıkları çalışmalarda, gıda olarak kullanılan deniz

ürünlerinden izole edilen *V. parahaemolyticus*' a ait yüksek genetik çeşitliliğinin varlığını tespit etmişlerdir (Jaksic ve diğ., 2002).

*Vibrio* türleri, deniz ve deniz ortamına açılan akarsu yatakları ağız çevrelerinde çok yaygındır. Farmer ve diğ., (2003) bilinen *Vibrio* türlerinin 12'sinden kaynaklanan klinik vakalar oluşturduğunu tespit etmişlerdir. *V. parahaemolyticus*, akut gastroenteritise neden olmaktadır. Japonya 'da bu etken, yeteri kadar ya da hiç ısıtılmış deniz ürünlerinin gıda olarak tüketilmesinden sonra gıda kaynaklı oluşan gastroenteritislerin %50-70' inin sebebidir (Lhafi ve Kühne 2007).

*V. vulnificus*, yüzey suları ve kıyılarda yaygın olarak bulunur. Kontamine deniz ürünlerinden açık yara teması ile etken bulaşabilmektedir. İnsanlarda kusma, ishal ve karın ağrısı ilk belirtilerdir. Özellikle karaciğer hastalarında immun baskılanması ve ağırlı cilt lezyonlarına neden olmaktadır.

*V. vulnificus* biyotip-2 nin kültürde ilk izolasyon raporu 1991 de yapılmıştır. Valensiya'da kıyı bölgesindeki yılan balıkları çiftliklerinin 'vibriosis' hastalığının klinik belirtilerini gösterdiği zaman görülmüştür Bioca ve diğ., (1991) ve Leamaster ve diğ., (1997) de yaptıkları çalışmalarda balıkların mikroflorasının rutin kontrolünde *Vibrio* spp.'nin *S. aureus* ile gastrointestinal kanalın baskın patojenlerinden olduğunu belirtmişlerdir (Jaksic ve diğ., 2002).

*Vibrio vulnificus* kısa, gram negatif, oksidaz pozitif, tek flagella ile aktif hareketli kıvrık basildirler. 20- 37 °C de üreyebilirler. *V. vulnificus* biotip-2, tipik *V. vulnificus*'tan indol'un ve ODC nin negatif olması, 42 °C de üreyebilmeleri ile ayrılırlar. *Vibrio vulnificus* biovar-2, nin 1975 ve 1977 de Japonya'da yapılan çalışmalarda yılan balığı popülasyonlarında ciddi hastalık patlaklarına neden olduğu belirtilmiştir. Bu etkenin, İspanya'da Norveç ve İngiltere'de benzer sorunlara neden olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Stickney, 2000).

*V. vulnificus* insanlarda iki vaka çeşidi ile ilişkilendirilmiştir. Birincisi septisemi ve deri üzerinde şiddetli yaraların oluşumuyla karakterize seyreden enfeksiyonlarla, ikincisi hastaneye gelen gıda kaynaklı vakaların %0.1' inin ve

ABD' de gıda kaynaklı ölümlerin %1'inin sebebi olarak görülmektedir (Mead ve diğ., 1999). Hlady ve diğ., (1993) çalışmalarında, *V. vulnificus*' un ABD'nin Florida bölgesinde gıda kaynaklı enfeksiyonlardan esas alan ölümlerin ana sebebi olduğunu belirtmişlerdir. Arias ve diğ., (1999), Hoi ve diğ., (1998), Ripabelli ve diğ., (1999) daki çalışmalarında, avrupa ülkelerinde üretimi yapılan ÇKY' lerden de *Vibrio* spp. ile kontaminasyonlarını tespit etmişlerdir. (Lhafi ve Kühne, 2007).

Kıyısal bölgeler ve deniz ortamına açılan akarsu yatakları, *Vibrio cholerae* O1 de dahil birçok *Vibrio* türü için ortam oluşturmaktadır. *Vibrio* türleri, suda asılı duran materyallere bağlanabilirler, bu yüzden mollusklar ve diğer ÇKY' ler beslenirken vibrioları da alırlar. Hâlâ ortamda mevcut bulunan *Vibrio* spp. hücreleri, besin yetersizliği ve fiziksel stres sonucu canlı fakat izole edilemeyen, VBNC durumunda bulunabilirler. Bu durum belki gıda kaynaklı oluşan enfeksiyonlardan alınan kontamine gıda ve su örneklerinden bu organizmanın klasik yöntemlerle neden izole edilemediğini açıklayabilir. Colwell ve Listin (1960) inkübasyonla izole edilemeyen virülense sahip *V. cholerae* hücrelerinin, ligate edilmiş tavşan bağırsağı örneklerinin, gönüllülerin gıda olarak tüketmesi sonucu enfeksiyona neden olduğunu tespit etmiştir (Lyon, 2001).

Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen verilerden birçok gram negatif bakteri, *Vibrio* spp. ler dahil, eğer uyku safhasında ise yaşama şansı arttığı düşünülmektedir ki bu durum VBNC, yani mevcut fakat izole edilmeyen safha olarak bilinmektedir VBNC safhasındaki bir bakteri, metabolik olarak aktif fakat üreme için besiyerinde bölünemeyen hücreler demektir.

Genel bir yaklaşım olarak VBNC, bakteriler için fizyolojik bir hal olarak değerlendirilmekte ve çoğu gram negatif bakterinin uygun olmayan koşullara maruz kaldığında bu hale geçtiği bilinmektedir. *Vibrio cholerae* kontamine yüzey sularında genellikle VBNC formundadır. Yapılan çalışmalar, *V. cholerae* nin yıllarca çevrede canlı kalabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca VBNC halindeki *V. vulnificus* hücrelerinin farelerde öldürücü enfeksiyona neden olduğu saptanmıştır (Halpern ve diğ., 2006).

Mikroorganizmaların VBNC halinin fizyolojik bir hal olduğunu savunan mikrobiyologlara karşın Bogosian *ve diğ.*, (1998), VBNC olarak tanımlanan mikroorganizmaların aslında ölü olduklarını, Kell *ve diğ.*, (1998), bu mikroorganizmaların üreyebilmelerinin gerekli koşulların bilinmemesinden dolayı kültürlerinin yapılamadığını, Mizunoe *ve diğ.*, (2000), VBNC halinin doğal koşullarda oluşmadığını fakat laboratuvar koşullarında oluşturulduğunu, yani fizyolojik bir hal olmadığını yaptıkları yayınlarda savunmuşlardır (Ayaz ve Erol, 2005).

*Vibrio cholerae* çeşitli sucul çevrelerde bulunan kolera etkeninin etiyolojik ajanıdır. Son zamanlarda Long *ve diğ.*, (2005)' nin yapmış oldukları bir çalışmada, ısırmayan tatarcık (Chironomidae) yumurtalarında rezervuar olarak taşıdıkları *Vibrio cholera* non-O1 ve non-139 serotiplerinin yumurtadan çıkan tatarcıkların rüzgarla taşınarak bakterinin yayılmasını sağlamakta oldukları tespit edilmiştir. Dişiler su kenarlarına bolca yumurtaları bırakırlar. Yumurtalar, yumurta içinde jelatin matrixi taşıyan ortamda gömülü olarak muhafaza olurlar. *Vibrio cholerae*' nin ürettiği hemoglobin / proteaz olan bir extraselüler enzim yumurta ortamını degrade ederek yumurtaların canlı kalmasını sağlamaktadır. Yapılan bir senelik çalışma sonucu yumurtalardaki tatarcık popülasyonu ve *V. cholerae* fenotipik gelişme göstererek konakçı-patojen dinamiklerini geliştirirler. Bakterinin çevresel dağılımı için yapılan çalışmada, 2 adet değişik tatlı su ortamından tatarcık yumurtaları toplanmıştır. Yaptıkları çalışmalarda *V.cholerae* izolasyonunun yanında insanlar için 3 önemli bakteri olan *Aeromonas* spp. türü bakteriler de izole etmişlerdir. Yapılan bu ilginç çalışmada *V. cholerae* ile zooplanktonlar arasında, özellikle Copepod'lar arasında bir ilişki de tespit edilmiştir (Halpern *ve diğ.*, 2006).

*Vibrio cholerae* gram negatif kıvrık çomak tarzında, oksidaz, glikoz, sukroz (+) polar flagellalı, üyesi olduğu familyanın özelliklerini gösteren bir bakteridir. O1 ve O 139 tipi salgınlara yol açan kolera etkenidir. Non-kolera ve non-agglutinable *Vibrio cholerae*' lar da bulunur.

O grubu kolera etkeninde O1 ve O139 etkenleri kolera salgınları yapan etkenlerdir. O1 serogrubunda El-tor ve klasik kolera etkeni bulunmaktadır.

Koleranın diğer O grupları ile birlikte 200'den fazla serotipi bulunmaktadır. Plankton, copepod ve ÇKY' ler gibi canlılar, yaşadıkları ortamda bulunan *V. cholerae* etkenleri ile enfekte olduktan sonra, gıda tüketiminde kullanılan deniz ürünlerinin duodenumdaki mukus salgılayan epitelyum hücrelerine tutunurlar. Mikro villüslerde kolonize olan etkenin çoğalması sonucu ishalle başlayan enfeksiyon belirtileri görülür. Üreyen kolera etkenlerinin oluşturduğu toksinler hücre içinde yayılırlar.

Etken dünyada birçok salgına neden olmuştur. 1992 de Bangladeş'te O139 serotipinin oluşturduğu salgın görülmüştür. Güney Asya'da hala etkenin yayılımı devam etmektedir. İnsanlarda *Vibrio cholerae*'dan kaynaklanan toksikasyondan dolayı sulu ishal, kusma ve akut böbrek yetmezliği belirtileri görülür. Akut tubuler nekroz ve şok sonucu ölüm görülebilir. *Vibrio cholerae*'nın epidemiyolojik olarak üç serotipi bulunmaktadır. Ogawa tipinde A ve B serotipleri, İnaba tipinde A ve C serotipleri ve Hikojima tipinde ise A, B ve C serotipleri mevcuttur.

Türkiye'de kolera benzeri vaka son olarak 15 Ekim 1970 de İstanbul'da görülmüştür. Bu salgında 50 kişinin ölmesi sonucu WHO, salgın nedeniyle Türkiye'ye karantina uygulanması gerektiğini belirtmiş fakat bir bilim adamı tarafından, salgına yol açan hastalığın Parakolera olduğu iddia edilmesi sonucu karantina uygulamasından vazgeçilmiştir. Bu duruma Sağmacılar'da halen kullanılan içme sularına çevredeki binaların kanalizasyonlarının bağlanması sonucu neden olduğu tespit edilmiştir (Aygün, 2007).

*Vibrio cholerae* önemli su kaynaklı insan patojenidir. Gastrointestinal bozukluklarla karakterize kusma, diare gibi bir sıra klinik belirtiyile kendini gösterir. Kolera etkeni ile kontamine ÇKY' lerin tüketilmesi sonucu görülen vakalar dünyanın birçok yerinde raporlanmıştır. Isıl işlem görmemiş ya da yeterince görmemiş ÇKY' lerin tüketilmesi sonucu *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae* gibi birkaç *Vibrio* türü, insanlardaki gastrointestinal enfeksiyonlarla kuvvetli bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Lyon, 2001).

*Vibrio cholerae*, gastrointestinal düzensizliklerle birlikte, kusma ve ishal de dahil genişçe klinik semptomlarla karakterize, kontamine ÇKY ürünleri ve deniz suyunun gıda olarak kullanılması sonucu insanlarda enfeksiyona yol açan bir etkidir. Çiğ ya da yeterli ısıl işlem görmemiş ÇKY'lerin gıda olarak tüketimi ile ilişkili güçlü gastrointestinal enfeksiyonlar, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* da dahil birkaç *Vibrio* spp. ile ilişkilendirilir (Lyon, 2001).

Çevrede bulunan vibriolar, toksijenik *Vibrio cholerae* serotip O1 ve O139'un patojenik virülens faktör olarak bilinen toksin ilişkili pilusları kodlayan genden (tcp), kolera toksinini kodlayan genden (ctx) ve zonula occludens toksininden yoksundurlar. Diare sendromunu gösteren *Vibrio cholerae* O1 ve O139'un virülens şusları, merkezi düzenleyici protein (toxR) ve toksin ilişkili pilus bulundurlar. Bunun tersi olarak *V.cholerae* non-O1 ve non-O139 zincirleri virülens genlerden (ctx, zot ve ace) den yoksundurlar. Fakat diğer zincirler, termostable direct hemolysin, Shigella- like heamolysin gibi toksin üreten genlere sahiptirler (Lyon, 2001).

Kolera, kusma ile olduğu kadar, yüksek miktarda protein bulunmayan sıvı kaybı ile elektrolit, kısa zamanda iyon ve bikarbonat kaybı hipovolemik şok ve asidosis ile sonuçlanan bir hastalıktır. Eğer hastaya aciliyetle müdahale edilmezse dehidrasyon sonucu taşikardi, hipotansiyon ve vasküler kollaps meydana gelir. Bu koşullar altında hastalık birçok durumda ölümcül olabilir

Kolera sık sık epidemik ve pandemik patlamalarla meydana gelir. Bu hastalığın çıktığı yerde sönmesi uzun yıllar alabilir ve birçok ülkelere hatta kıtalara yayılabilir. Bu hastalığın çıkışında 19. yy. dan önce pratik olarak hiçbir kayıt bulunmamaktadır. 1817-1823 de Hindistan, Çin, Bengal'de, 1829-1851 Avrupa'da ve Kuzey Amerika kıyılarında 1852-1859 da Rusya ve Hindistan'da, 1863-1879 da Avrupa, Afrika, Kuzey Amerika'da, 1881-1896 da Güney Amerika'da, 1899-1923 de Rusya ve Hindistan'da, 1961-1970 de Bangladeş, Hindistan, Kuzey Afrika'da, İtalya ve Japonya'da görülmüştür (Chaudhuri ve Chatterjee, 2009).

1847-1854 yılları arası John Snow, Londra'da koleranın su ile transfer olduğunu tespit etmiştir. El tor tipi sindirim sistemi dışında uzun yıllar canlı kalabilir. 1992-1993 yılları arası, Hindistan ve Bangladeş'te bir kaç bölgede yeni bir serogrup olarak *V. cholerae* O139 tespit edilmiştir. O139 genetik olarak El tor pandemik zincirinden gelişmiştir.

*V. cholerae* olarak bilinen kolera ajanı diğer *Vibrio* türleri ile aynı fakat biraz daha ağır bir diareye neden olmaktadır. Koleranın tek doğal konakçıları insanlardır. Kolera, enfekte bireyin feçesle kontamine gıdaları alması sonucu gelişmektedir. Kolera etkeni asite duyarlı olduğu için birçok *V. cholerae* mide asidinde yok olur. Her nasılsa birey sindirilmiş gıda ya da yüksek miktarda kolera etkeni taşıyan suyu alırsa, bazı organizmalar sindirim siteminde yaşayacaklardır. İnce bağırsakta hızla çoğalan bakteri kolera toksin (CT) olarak bilinen toksini üretmeye başlar ki bu durum daha sonra sulu diareye dönüşür. Aynı zamanda da bireylerde kusma görülebilmektedir. Ciddi vakalarda, enfeksiyon, çok miktarda sıvı ve elektrolit kaybı sonucu ciddi bir dehidrasyona neden olabilir. Bu durumda böbreklerin dehidrasyonu böbrek yetmezliği ve ölümden kurtulmak için acil olarak sıvı ve elektrolit takviyesi yapılmalıdır.

*V. cholerae* serogruplarıyla enterotoksin üretimi ile ve epidemik dağılıma göre bu tür içinde önemli farklılıklara ayrılan bireyler içerir. Serogrupla ayırım, ısıya dayanıklı O antijenine göre yapılmaktadır. Serogrubuna göre şimdiye kadar yaklaşık 200 *V. cholerae* ayırımı yapılmıştır.

Öncelikle, bütün epidemik kolera etkenleri serogrup O1 tarafından neden olduğu düşünülmekteydi fakat şimdi bu fikir, 1992'de O139 serogrubu tespit edildiğinde geçerliliğini kaybetmiştir. Her ne kadar O1 ve O139 serogrubları seyrek olarak kolera salgınları oluştursa da bunlar geniş epidemik ya da pandemik salgınlarla ilişkilendirilememişlerdir.

Serogrup O1 üç adet serotipe ayrılmaktadır. Bunların isimleri, etyolojik orijinlerine atfen Inaba, Ogawa ve Hikojima'dır. Serotiplendirme kolera O1 etkeninin üç antijenik formuna göre yapılmaktadır. Serogrup O1'in antijenik grubu A, B ve C olan üç antijenik faktörden oluşmaktadır. Faktör A'nın

D- perosamine homopolymer yapıda olduğu sanılmakla beraber diğer 2 faktörün yapısı tam olarak bilinmemektedir. Serogrup O1'in DNA zincirinde yapılan moleküler çalışmalar, Inaba ve Ogawa'nın hemen hemen homolog olduğunu ortaya koymuştur. Inaba'dan Ogawa'ya oluşan bir çeşitlilik geçişi, arada bir çok O1 serogrup çeşidi oluşturmaktadır. Son zamanlarda yapılan serotiplendirme çalışmalarında Ogawa zincirinin 2 tane mutasyon oluşturmuş olabileceği düşünülmektedir.

*Vibrio cholerae* zincirleri Klasik ve El tor olmak üzere biyotiplendirmede 2 adet biyotipe de ayrılabilir. Bu alt ayırım, yapılan çeşitli testlerden köken almaktadır. Biyotiplendirmeye diğer yaklaşım olan DNA zincirindeki TCP' yi kodlayan gen ayırımı da son zamanlarda Klasik ve El tor zincirleri ayırımında kullanılmaktadır. El tor biyotipi, 7 pandemik kolera salgınının ajanı olarak tespit edilmiştir (Gallut, 1971). Koleranın aynı zamanda faj tiplendirme çalışmaları da yapılmaktadır. Klasik biyotipi, kolera fajına karşı duyarlı olduğu halde El tor biyotip buna dirençlidir.

*V. cholerae* hücrelerinin yüzeyinde değişik tarzda pili tespiti elektron mikroskobu çalışmalarıyla yapılmıştır. Fakat bunların hepsi fonksiyonel yönden karakterize edilememiştir. Kolera El tor da her bir pili hücresi çok küçük olmasına rağmen mannoza duyarlı hemaglutinin yapan zincirlerinde pili tespit edilmiştir. TCP kolera toksinini üreten pilus olarak tespit edilmiştir.

*V. cholerae* Hindistan'da 4 epidemik sahadan toplanmıştır. Bunlar aynı yapıda şeker yapıları gösterdiklerinden, kemotaksonamik olarak oldukça homojen (benzer) bir yapıda oldukları ve bu yüzden yeni bir non-O1 kolera LPS grubuna ait oldukları görülmüştür (Hisatsune ve diğ., 1993). Diğer non-O1 vibriolar, non-aglutinasyon özelliği gösteren 200'den fazla serogruptan oluşmaktadır. O15 ve O155 serogrubu pentasakkarit ünitelerinden (Senchenkova ve diğ., 1998), O6 serogrubu ve *V. mimicus* tetrasakkarit ünitelerinden oluşmaktadır (Bergstrom ve diğ., 2002 ve Landersjo ve diğ., 1998). Burada önemli nokta *V. mimicus* ve *V. cholerae* O155, *V. cholerae* O139 ile immuno dominant grubu içermektedir. Bu da *V. cholerae* O139 ve *V. cholerae* O155 ya da *V. mimicus* ile serolojik çapraz aktivite olduğunu düşündürmektedir.

Son zamanlarda, patojen kolera grupları arasında yapılan çalışmalar sayesinde, *V. cholerae*'nin O-PS ya da LPS yapısındaki kalıntılardan alınan oligo-mono sakkaritleri taklit eden sentetik mono-oligosakkaritler hazırlanmaktadır. Bu yapılar ile sentetik karbonhidrat yapısında anti kolera aşısı üretmek için monoklonal anti kolera etkileşimleri incelenmektedir. Kenne ve diğ., (1998) *V.cholerae* O1 serotip İnaba'dan elde ettiği ilk sentetik monosakkarik ünitesi çalışmalarını yayınlamıştır. Takibinde Gotoh ve diğ., (1994) de İnaba ve Ogawa sertiplerinden bu konuda yaptığı çalışmaları yayınlamıştır.

Chaudhuri ve Chetterjee, (2009) Ogawa ve İnaba'nın O-PS yapısının, O antijenik yapısının bu bölgenin sorumlu olduğunu tahmin ettiklerini söylemektedirler. Non-O1 ve non-O139 grubunun O-PS genetik yapısı tam olarak araştırılmamıştır. Bazıları O139 grubu O-PS yapısı ile non O139 serogrupları arasında benzerlik olduğunu söylemektedirler.

*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, gibi *Vibrio* spp. ler, gıda kaynaklı sağlık riski oluşturan türlerdir. Belirtilen türler, ÇKY ürünlerinden hazırlanan gıdaların tüketilmesi sonucu gıda zehirlenmelerine yol açtığı görülmektedir. ABD'de yıllardır yapılan çalışmalar sonucu, kıyı bölgelerinde ve ÇKY üretimi yapılan koylarda tespit edilmişlerdir. *V. parahaemolyticus*'tan kaynaklanan gastroenteritis genellikle kontamine ÇKY tüketimi ile ilişkilendirilmektedir (Berlin ve diğ., 1999).

Türkiye'de ve gerekse yurt dışında yapılan çalışmalarda çeşitli deniz ürünlerine ait *V. parahaemolyticus*'un izolasyon oranları büyük farklılıklar göstermektedir. Ürünlerin farklı bölgelerden elde edilmiş olmasının ve elde edildikleri suların hijyen kalitesinin etkenin bulunma oranı üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

*V. parahaemolyticus* deniz ürünlerinde ve özellikle kabuklu ve ÇKY' llerde bulunabilen, denizlerin kıyı sularında ve denize açılan akarsu yataklarının normal mikro florası içinde bulunurlar. İnsanlarda birçok deniz ürünü gıdalarından kaynaklanan gastrointestinal enfeksiyonlarla ilişkili *Vibrio* türüne ait patojenik

*Vibrio* türü 1950' de tespit edilmiştir. 1887 den önce, insanlardaki *V. parahaemolyticus*'tan kaynaklanan gastrointestinal enfeksiyonlar Asya'da görülmektedir. Bu yıldan sonra, O3:K6 serotipi ile ilişkili artan birçok enfeksiyon, Asya, Kuzey Amerika ve Şili'de görüldüğü bildirilmiştir. Bu serotipin aynı zamanda, Avrupa'nın Fransa ve İspanya ülkelerinde sporadik olarak görüldüğü raporlanmıştır (Rosec ve diğ., 2009).

*V. parahaemolyticus.*, gram negatif, halofilik, sporsuz, tek kısa kıvrımlı, çubuklardır. Sıvı besiyerinde tek polar flagellası ile hareketlidir (Baumann ve Schubert, 1984). Bivalve spp. türleri gibi deniz ürünlerinden sıklıkla izole edilen ve tabii olarak deniz ve denizle ilişkili çevrelerde mevcut olan bu mikroorganizmanın bir insan patojeni olduğu tespit edilmiştir (Liston, 1990). *V. parahaemolyticus*, yüzen hücre tipi ve sürünen hücre tipi gibi birkaç çeşit hücre şekline sahiptir (Makino ve diğ., 2003). Ayrıca mevcut fakat izole edilemeyen safhalarda bulunabilirler. *V. parahaemolyticus* ile kontamine düşük ısıda işlenmiş deniz ürünleri ve özellikle ÇKY' lerin tüketilmesi ile ishal, baş ağrısı, kusma, mide bulantısı, abdominal kramp ve düşük ateşle karakterize seyreden akut gastroenteritisin gelişmesine sebep olmaktadır. Kaysner ve Depaola (2001) yaptıkları çalışmalarında bu bakterinin, dünya çapında ve ABD'de deniz ürünü tüketimi ile oluşan gıda kaynaklı gastroenteritisin insanlarda önemli etkeni olduğunu farketmişlerdir (Su ve Liu 2006) .

*V. parahaemolyticus* ilk olarak 1951'de Japonya'nın Osaka şehrindeki gıda kaynaklı bir hastalığın etiyolojik etkeni olduğu tespit edilmiştir (Daniels ve diğ., 2000). Etkenin raporlanan en büyük septisemisi sardalya tüketimi sonucu enfekte olan 273 hastadan 20'sinin ölmesiyle sonuçlanmıştır. Bundan sonra Japonya'da *V. parahaemolyticus*, gıda kaynaklı zehirlenmelerin %20-30 unda rapor edilmiştir. (Alam ve diğ., 2002). *V. parahaemolyticus*, IDSC'nin 1999'da yayınlamış olduğu raporda 1996 ve 1998 yılları arasında 24,373 zehirlenmeden 1710 vaka ile gıda zehirlenmelerinin önde gelen etkenlerinden görülmüştür.

*V. parahaemolyticus*'un akvatik ortamlarda dağılımının su sıcaklığına bağlı olduğu bilinmektedir. Çalışmalar, deniz suyunun 15 °C ve üstüne çıkana kadar bu mikroorganizmanın çok seyrek tespit edildiğini ortaya koymuştur. Yapılan

etiyojik çalışmalar, *V. parahaemolyticus*'un kış sezonu boyunca sedimentte yaşamını sürdürdüğünü ve su sıcaklığının 14 °C nin üstüne çıktığı zaman sedimentten tekrar deniz suyuna salındığını ortaya koymuştur (Kaneko ve Colwell, 1973). 1984 ve 1985 yılları arasında Depoula ve diğ., (1990) ABD'de yaptıkları 9 çalışmadan tespit ettikleri sonuca göre; *V. parahaemolyticus*'un, sıcaklık 16 °C'nin altına indiği zaman deniz suyunda düşük yoğunlukta (4 hücre/100 ml) görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Her ne kadar gastroenteritise sebep olan *V. parahaemolyticus* enfeksiyonu sıklıkla kendi kendini sınırlandırır da, enfeksiyon, karaciğer yetmezliği ve immun sistem yetmezliği ile tedavi gören insanlarda hayati tehlike arz eden septisemiler oluşturmaktadır. 2005'de ABD de *V. parahaemolyticus*' tan kaynaklanan enfeksiyonlardan 2 kişinin öldüğü rapor edilmiştir (Su ve Liu, 2006).

Çiğ ÇKY' lerde *V. parahaemolyticus* kontaminasyon derecesinin tespiti aynı zamanda su sıcaklığı ile ilişkili olduğu için, ilkbahar ve yaz aylarında hasat zamanında ÇKY' lerden tespitinin ihtimali daha yüksek olmaktadır. Her ne kadar kontamine ÇKY' lerde *V. parahaemolyticus*' un tespiti genellikle 10<sup>3</sup> cfu/g dan düşük olsa da, hasat zamanı daha sıcak sulardan toplanan ÇKY' lerin ısıya maruz kalmasıyla hızlı bir şekilde bölünerek artabilirler (Kaysner ve Depaola, 2000). Yapılan çalışmalar, 26 °C'de hasat yapılan ÇKY' lerde *V. parahaemolyticus* popülasyonunun hasattan sonra buzdolabı ısısında saklanmamasıyla, 24 saatte hasattaki normal kontaminasyon miktarının 50-790 kat daha fazla arttığını ortaya koymuştur. Gooch ve diğ., (2002) ve Cook ve diğ., (2002) de yapmış oldukları yayında, 1998'de restoranlardan alınan 370 ÇKY' den yapılan bir izleme çalışmasında, marketlerde *V. parahaemolyticus*'un yüksek sezona bağlı dağılımda olduğunun ortaya koyulduğunu bildirmişlerdir (Su ve Liu, 2006).

Aynı zamanda *V. parahaemolyticus*'un bulunduğu yöre ile ilişkisi, sıcaklık ve salinite gibi parametrelere de bağlıdır. DePaula ve diğ., (2000) ve (2003) yılları arası yaptıkları araştırmalarının sonuçlarına göre, ortamdaki yüksek yoğunlukta *V. parahaemolyticus* yüksek sıcaklıklarla görülmektedir ki, bu ılık geçen aylardaki bol görülen enfeksiyonlar daha sıcak geçen aylarda daha fazla görülmektedir. Geneste ve diğ., (2000) ve Yeung ve Boor (2004) araştırmalarında

da aynı görüşü paylaşmaktadırlar. Depoula ve diğ., (2000), yaptığı çalışmada tuzluluğun *V. paraheamolyticus*'u sıcaklıktan daha az etkilediğini ortaya koymuştur. Her nasılsa, Martinez ve diğ., (2008) İspanya'da yaptıkları geniş bir istatistiki çalışmada, ÇKY'lerden izole edilen *V. parahaemolyticus*'un dağılımında tuzluluğun, sıcaklığı kontrolü altında tutan bir faktör olduğunu tespit etmişlerdir. Yine de Mc Layghlin ve diğ., (2005) ve Gonzales ve diğ., (2005) gibi araştırmacıların yaptığı çalışmalar, *V. parahaemolyticus*'tan kaynaklanan gıda kaynaklı Alaska gibi soğuk bölgelerdeki vakaları ya da soğuk sularda yaşayan ÇKY'lerden olan *Mytilus edulis*' den yapılan patolojik *V. parahaemolyticus* izolasyonlarını aydınlatmışlardır.

Bunlarla beraber, Fransa'da gıda kaynaklı vakalardan ve yaşadıkları ortamlardan izole edilen *V. parahaemolyticus* zincirlerinde beklenenden daha fazla daha yüksek trh pozitif *V. parahaemolyticus* suşu izole edildiği bildirilmiştir (Robert ve diğ., 2004 ve Hervio ve diğ., 2005). Her ne kadar bu veriler açıkça dünya çapındaki gastroenteritis vakaları ile ilişkilendirilemese de, deniz ürünlerindeki tüm patojenlerin ve de patojenik *V. parahaemolyticus*'un izlenmesi ihtiyacına etkili bir vurgu olmaktadır. Avrupa birliği komisyonu düzenlemesi 2073/ 2005 (EC regulation 2073/2005), ÇKY' lerde yaşayan *V. parahaemolyticus* gibi tehlike arz eden mikrobiyel çalışmalar için güvenilir metotların geliştirilmesi gerekliliğini belirtmişlerdir (Rosec ve diğ., 2009). ISO/ TS 21872-1 ve FDA- 2004 gibi dünya çapında geçerliliği olan referans metotlar bulunmaktadır. Yapılan bu doktora çalışmasında da FDA' nın yayınladığı metot esas alındı.

Asya ülkelerinin tersine, *V. parahaemolyticus* Avrupa'da seyrek rapor edilmiştir. Her nasılsa, İspanya ve Fransa gibi Avrupa ülkelerinde sporadik vakalar rapor edilmiştir. İspanya'da 1989 yılında ÇKY ve balık tüketimi ile ilişkili gastroenteritis vakalarının 8'i *V. parahaemolyticus*'dan kaynaklanmıştır. Çiğ ÇKY tüketiminden kaynaklanan vakalardaki hastaların 64 ünde görülmüştür (Lozano ve diğ., 2003). 1997'de Asya ülkelerinden ihraç edilen karideslerin tüketiminden kaynaklanan zehirlenmelerde 44 vakanın kaynağının *V. parahaemolyticus* olduğu tespit edilmiştir. Yakın zamanda tespit edilen zehirlenme olayında, 2004 yılı temmuz ayında İspanya'da bir restoranda yapılan düğünde davetliler arasında bu mikroorganizmadan kaynaklanan 80 vaka tespit

edilmiştir (Martinez ve diğ., 2005). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda sağlıklı koşullarda kanatılarak hazırlanan yengeçlerden elde edilen gıdaların tüketimi ile ilişkili vakalar tespit edilmiştir.

ABD de son zamanlarda 1998 yılı Temmuz ve Eylül ayları arasında 8 adet gibi küçük sayıda *V. parahaemolyticus*'dan kaynaklanan enfeksiyonlar görülmüştür. 2004 yazında Alaska'da üretilen çiğ ÇKY gıdalarını yiyen gezi gemisindeki 14 yolcunun aynı mikroorganizmadan enfekte olduğu görülmüştür (Mac Laughlin ve diğ., 2005). Daha yakın bir zamanda CDC'nin 2006'daki raporuna göre *V. parahaemolyticus*'un dahil olduğu 177 kontamine ÇKY tüketiminden kaynaklanan vaka tespit edilmiştir (Rosec ve diğ., 2009).

*V. parahaemolyticus* dünyanın her yerinde deniz kıyılarında ve kıyıya açılan tatlı su yataklarında genişçe bir alana yayılmıştır. Bu organizmanın gastroenteritisin etyolojik ajanı olarak ilk tespiti 1950 de yayınlanmıştır. Son zamanlarda akut gastroenteritisin etiyolojik ajanı olan O3:K6 serotipi gıda kaynaklı bir patojen olarak, yapılan bir araştırmayla büyük etkisinin olabileceği belirtilmiştir. Miyamoto ve diğ., (1969) ve Thompson ve diğ., (1976) gastroenteritislerle ilişkili olan *V. parahaemolyticus*'un yüksek tuz oranı olan Wagatsuma agar (Wagatsuma, 1968)' la yapılan çalışmalarda çevre ortamında bulunan mikroorganizmanın sadece %1-2 sinin hemoliz gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Kanagawa fenomeni olarak bilinen bu fenomen, TDH işlevi ile etkisini göstermektedir. TDH' ın 1998 den beri *V. parahaemolyticus*'un patojenitesinde önemli olan bir virülens faktör olduğu düşünülmektedir (Nishibuchi ve Karper, 1985). Klinik vakalardan elde edilen *V. parahaemolyticus* zincirlerinden yapılan çalışmalarda, negatif kanagawa reaksiyonu gösteren zincirlerde önemli bir virülens faktör olan TDH related hemolizin TRH'ın tespitini sağlamıştır (Honda ve Miwatani, 1988 ve Honda ve diğ., 1987). Her ne kadar mikroorganizmanın tdh üretimi Wagatsuma agar ve ticari olarak satılan kitlerle tespit edilse de, bunlar kullanışsız ve zaman kaybına neden olmaktadır.

*V. parahaemolyticus*'un patojenitesi tdh ve trh genlerinin varlığı ile ilişkili olduğu görüntüsü verse de, TDH ve TRH'dan başka virülens faktörler aydınlatılabilir. TDH ve TRH üretmeyen *V. parahaemolyticus* zincirleri son

zamanlarda anne bireyi emen farelerde sıvı birikimine neden olduğuna dair raporlar yayınlanmıştır. Daha yakın zamanda yapılan bir çalışmada, ısı ile parçalanan protein olan Serin proteaz'ın, ne *tdh* ne de *trh* geni bulundurmeyen *V. parahaemolyticus* zincirlerinin potansiyel virülens faktörü olduğu aydınlatılmıştır (Lee ve diğ., 2002). Saf haline getirilmiş proteaz'ın Çin hamsterlerinin ovaryumlarının büyümesine engel olan önemli etkiler yaptığı tespit edilmiştir. Bu protein, intraperitoneal ve intravenöz enjekte edildiği zaman, farelerde eritrositleri lize edip doku da hemoraji ve ölüme sebep olmaktadır. Fakat *V. parahaemolyticus*'un bu zincirlerinin çevrede ve klinik vakalarda tespiti kesinleşmemiştir (Su ve Liu, 2006).

Bu patojenin, hastalığa sebep olan faktörleri hala tam olarak açıklanamamıştır fakat iki tane virülens faktörü tamamıyla aydınlatılmıştır. Isıya dayanıklı direk hemolysin (TDH) ve TDH ilişkili hemolysin (TRH) (Nishibuchi ve Karper, 1995, Shirai ve diğ., 1990, Zhang ve Austin, 2005). *V. parahaemolyticus* tarafından üretilen TDH ve TRH hemolizini, genlerdeki *tdh+* ve *trh+* zincirlerinden izole edilir. Miyamoto ve diğ., (1969) ve Wong ve diğ., (2000) de belirtmiş olduğu yaygın olan görüş, TDH hemolizinin aşırı derecede klinik belirtiyeye sebep olan izolatlarda bulunduğu (Rosec ve diğ., 2009).

*V. parahaemolyticus*'un patojenitesi ve Kanagawa fenomenon (KP) hakkında yapılan epidemiyolojik çalışmalara rağmen K-negatif *V. parahaemolyticus* zincirleri TDH üretmez fakat görülen vakalardan izole edilen *V. parahaemolyticus* zincirlerinden TRH tespit edilmiştir (Honda ve diğ., 1987). Shirai ve diğ., (1990) çalışmalarında, yaptığı ishale seyreden 215 vakadan sorumlu olan *V. parahaemolyticus*' un TDH ve TRH üreten zincire sahip olduğu ve 52 vakanın (24.3%) sadece TRH üreten *trh+* genine sahip olduğunu belirtmiştir. Bu sonuçlar aynı zamanda TRH' ın da *V. parahaemolyticus*'un virülens faktörü olduğunu ortaya koymuştur. Karper ve diğ., (1984) ve Taniguchi ve diğ., (1985) çalışmalarında TRH (*trh*) ve TRH (*trh*) kodlayan geni klonlamışlardır (Su ve Liu, 2006).

Sadece trh+ üreten patojenin virülensinin gıda güvenliğinde tespiti, deniz ürünleri gıda güvenliği için özellikle bu zincirlerin tespiti önem arz etmektedir. TDH ve TRH, tdh ve trh adı verilen genlerle kodlanmakta ve bu genlerden yoksun olan zincirler, hemolizin üretme yeteneği bulunmamaktadır (Nishibuchi ve Kaper 1995). Bunun yanında, Kim ve diğ., (1999) de yaptıkları yayında TDH ve TRH üretimi kabiliyetine bağlı olmadan bütün *V. parahaemolyticus* zincirlerinin düzenleyici bir gen olan *toxR* genine sahip olduklarını ifade etmektedirler (Dileep ve diğ., 2003).

*V. parahaemolyticus* enfeksiyonlarının çoğu değişik serotiplerden kaynaklanmaktadır. Fakat, bu mikroorganizmadan kaynaklanan gastroenteritise neden olan ve 1996'dan beri bir çok ülkede görülen vakaların çoğunda serotip O3:K6 rapor edilmiştir (Chiou ve diğ., 2000; Wuddhakul ve diğ., 2000; Gonzalez ve diğ., 2005; Martinez ve diğ., 2005). Bu serovar, ilk önce 1994 ve 1996 yılları arasında Hindistan'da hastane tabanlı bir sürvelans çalışmasında tespit edilmiştir (Okuda ve diğ., 1997). Bu çalışmada, 1996 ve 1997 Nisanı arasında hastalardan izole edilen *V. parahaemolyticus*'lardan bu serovarla ilişkili olan vakaların %63 gibi bir oranda ani bir yükseliş görüldüğü tespit edilmiştir. Bu serotip ABD' de ilk olarak 1998 de gıda olarak ÇKY tüketimi sonucu ortaya çıkan en büyük salgında, 416 hastadan yapılan çalışmada tespit edilmiştir (Daniels ve diğ., 2000). Bundan sonra çeşitli yıllarda bu serovar ABD'de çeşitli bölgelerde ortaya çıkan vakalardan izole edilmiştir. Fakat bu serovar 1999'dan beri ısı ile işlenmemiş ÇKY'lerin gıda olarak tüketiminden kaynaklanan hastalıklarla ilişkilendirilmemiştir (Su ve Liu, 2006).

Almanya'da ticari olarak üretilen mavi midyeler (*Mytilus edulis*), genellikle Wadden denizi kıyılarında üretilmektedir. 1994 ve 2003 yılları arasında yıllık üretim yaklaşık 22.000 ton olarak belirlenmiştir. ÇKY' ler besinlerini filtre ederek beslenen canlılar olduklarından, akvatik ortamdaki birçok patojeni toplayabilmektedirler. Canlı ÇKY' ler direk olarak insan tüketimi ile sonuçlandıkları için, bunlarla ilgili mikrobiyolojik kriterler ve Avrupada yapılan yasalarda sadece *Salmonella* spp.'nin bulunmaması ve *Escherichia coli*'nin 100 gr. da 230'u geçmemesi belirtilmiştir (Lhafi ve Kühne, 2007). Diğer mikrobiyolojik kriterler henüz deniz ürünü gıda kategorisinde yer almamıştır.

Bu tez çalışmasında, ülkemizin Ege ve Marmara sahillerinde üretimi yapılan ÇKY türlerinden *Ostrea edulis*, *Tapes decussatus*, *Mytilus galloprovincialis*, *Modiolus barbatus*, *Venus verrucosa*, *Donax trunculus*, türü Bivalve spp. örnekleri kullanılarak, halk sağlığında ve ihracatta ciddi risk oluşturan *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* ve risk oluşturabilecek diğer *Vibrio* türlerinin tespiti amaçlanmıştır. Örnekler, kış ilkbahar ve yaz başlangıcında alınarak analizleri tamamlanmıştır. Analize alınan bölgelerden Çanakkale ili, Balıkesir ili Ayvalık ilçesi, İzmir ili Merkez ve Çeşme ilçesinden toplanan toplam 958 adet Bivalve spp. örneğinden *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio mimicus* ve *Vibrio metschnikovii* identifiye edilmiştir. 1 adet *Vibrio* suşu da yapılan biyokimyasal testlerle tanımlanamamıştır.

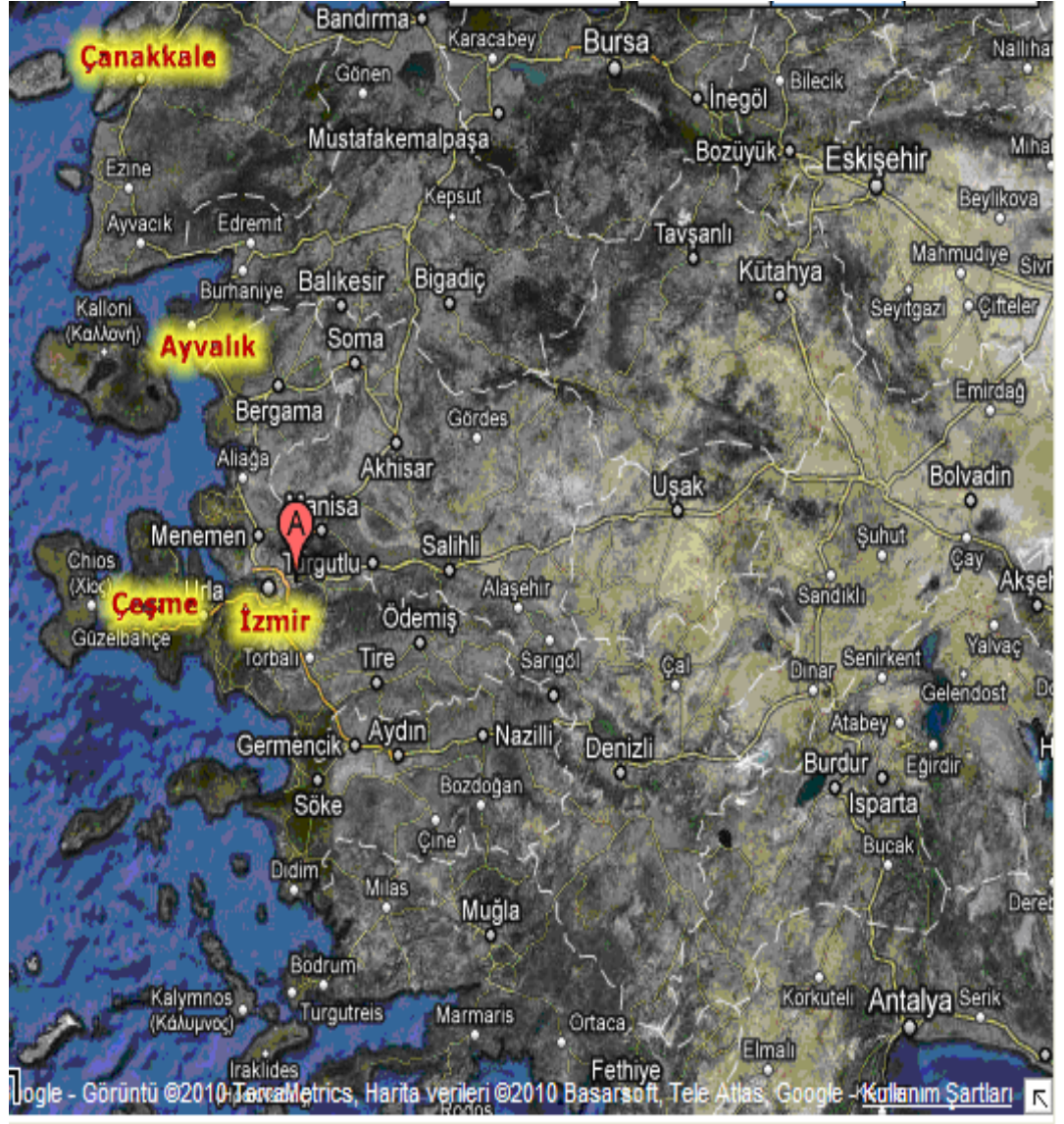
## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Örnekler

Bu çalışmada, gıda tüketiminde kullanılan *Ostrea edulis*, *Tapes decussatus*, *Mytilus galloprovincialis*, *Modiolus barbatus*, *Venus verrucosa*, *Donax trunculus* türlerinden oluşan toplam 958 adet Bivalve spp. örneği, Çanakkale ili, Balıkesir ili Ayvalık ilçesi, İzmir ili Merkez ve Çeşme ilçesindeki üretim çiftliklerinden temin edildi. Örnekler türlerin aylara göre hasat zamanında Ocak ayından Temmuz ayına kadar düzenli sayıda alındı. Alınan örnekler soğuk zincir kuralına uyularak 24 saat içinde FDA (2004) metoduna göre, ÇKY tüketiminden kaynaklanan gıda sorununa neden olan *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* ve insanlarda gıda zehirlenmelerine neden olan enterititis vakası etiyolojik ajanı diğer *Vibrio* türlerinin izolasyonuna başlandı.

Araştırmada, *Vibrio* spp. izolasyonu amacıyla kullanılan toplam 958 adet ÇKY numunesinden 304 adeti Balıkesir ili Ayvalık yetiştirme bölgelerinden, 113 adeti İzmir ili Merkez ve Çeşme bölgesi yetiştirme bölgelerinden, 541 adeti Çanakkale ili merkez üretim bölgelerinden temin edildi. Çalışmamızda 958 adet örneğin 97 adeti kидonya (*Venus verrucosa*), 570 adeti kum şırlanı (*Donax trunculus*), 116 adeti Akivades (*Tapes decussatus*), 67 adeti kara midye (*Mytilus galloprovincialis*), 53 adeti kılılı midye (*Modiolus barbatus*), 55 adeti İstiridye (*Ostrea edulis*) ÇKY türlerinden kullanılmıştır.



50 mm

100 Km

Google görüntü-2011, TerraMetrics, Harita verileri, Basarsoft, Europa Technologies

**Şekil 2.1:** Tez çalışmasında kullanılan örneklerin tedarik edildiği ÇKY üretim istasyonu bölgelerinin harita üzerinde gösterimi

Kullanılan örnekler, Çanakkale, Ayvalık, İzmir ve Çeşme’de bulunan istasyonlardan tedarik edildi. ÇKY türlerine göre ayrılmış üretim çiftliklerinden alınan numuneler, aylara göre analize alınarak değerlendirildi.

**Çizelge 2.1:** Üretim tesislerinden alınan ÇKY türlerinin aylara göre dağılımı ve sayıları

Aylar	Analize Alınan Tür Sayısı					
	İstiridye ( <i>Ostrea edulis</i> )	Kum şırlanı ( <i>Donax trunculus</i> )	Akivades ( <i>Tapes decussatus</i> )	Kara Midye ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	Kıllı Midye ( <i>Modiolus barbatus</i> )	Kidonya ( <i>Venus verrucosa</i> )
Ocak	3	30	10	4	-	3
Şubat	6	90	35	4	8	6
Mart	6	90	45	4	-	6
Nisan	12	150	55	-	4	12
Mayıs	6	-	25	-	-	3
Haziran	3	60	35	16	12	3
Temmuz	-	150	35	16	8	3
Toplam	36	570	240	44	32	36
<b>GENEL TOPLAM</b>						958

### 2.1.2 Standart *Vibrio cholerae* suşu

*Vibrio cholerae* ogawa non O1 suşu, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı SHAM/Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı Birimi'nden liyofilize olarak temin edilmiştir. Pandemik salgınlara neden olan kolera vakasının etyolojik ajanı olan *Vibrio cholerae* O1 ve O 139 suşları ülkemizde pandemik kolera vakasının uzun yıllardır görülmemesi ve eradike edilmesi nedeniyle güvenlik gerekçesi nedeniyle suş talebi kabul edilmemiştir.

### 2.1.3 Standart *Vibrio parahaemolyticus* suşu

*V. parahaemolyticus* O:3 K:6 serogrubu Community Reference Laboratory (Ulusal Referans Laboratuvarı)'den canlı olarak temin edilmiştir.

#### 2.1.4. Deney Hayvanları

Standart *Vibrio cholerae* ve *V. parahaemolyticus* suşlarından antiserum hazırlamak amacıyla her bir suş için 1'er adet olmak üzere 1.5 – 2 kg ağırlığındaki Yeni Zelanda tavşanlarından (*Oryctolagus cuniculus*) 3 adet kullanılmıştır. Yeni Zelanda tavşanları Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Deneme Hayvanları Yetiştirme Biriminden sağlanmıştır.

#### 2.1.5 ONPG (Ortho-Nitro-Phenil-β-Galacto-Pyranoside) Reagent disk (Oxoid)

Bakterinin laktozu fermente edebilmesi için laktozun hücre içine girmesini sağlayan β-galaktoside-permeaz enziminin varlığını ya da yokluğunu ortaya koymak için yapıldı. ONPG reagent içeren antibiyotik disk boyutunda hazırlanmış diskler bu test için kullanıldı. ONPG disk Oxoid ticari şirketinden temin edildi.

#### 2.1.6 DD15/ 0129 (150 µg. / 10 µg.) Reagent disk (Oxoid)

Bakterinin 0/129 diskinde duyarlı olup olmadığını tespit etmek için yapıldı. Diskler, Oxoid ticari şirketinden temin edildi.

#### 2.1.7 Oksidaz kiti (Merck)

Bakterinin Cytochrome oxidase enziminin varlığının tespiti için kullanıldı. Kit, Merck ticari şirketinden temin edildi.

#### 2.1.8 Besiyerleri

##### 2.1.8.1 İzolasyon besi yerleri

##### 2.1.8.1.1 Alkali Pepton Water (Merck)

Alkali Peptone Water	17 gr.
Distile su	1000 ml

Karışım belirtilen miktarda distile suda çözündürüldükten sonra homojen karışımın pH'sı 8,6 'ya ayarlanarak 121 °C de 15 d. otoklavda sterilize edildi.

**2.1.8.1.2 Kanlı Agar Base (Merck)**

Blood Agar	40 gr.
Mikrobiyolojik Sodyum Klorür	1,5 gr
Distile su	100 ml

Karışımın pH'sı 7,2 – 7,4'e ayarlanıp, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutulup, içine % 7 oranında steril defibrine koyun kanı ilave edildi ( Mutter *ve diğ.*, 1989).

**2.1.8.1.3 TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar) (Merck)**

TCBS Agar	88 gr.
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'si 8,6' ya ayarlanıp su banyosunda kaynayan suda 25 d. kıvamını bulana kadar bekletildikten sonra, manyetik karıştırıcıda ısı altında steril balık atılarak homojenize olması sağlandı. 50 °C'ye kadar soğutulup steril petri kutularına 4 mm kalınlığında 15 ml hacminde paylaştırıldı.

**2.1.8.1.4 Tryptic Soy Agar (Merck)**

Tryptic Soy Agar	40 gr.
Mikrobiyolojik Sodyum Klorür	1gr.
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,3' e ayarlanıp, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50–47 °C'ye kadar soğutulup, petrilere bölündü.

**2.1.8.1.5 Tryptic Soy Broth (Merck)**

Tryptic Soy Agar	30 gr.
Mikrobiyolojik Sodyum Klorür	1gr.
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,3' e ayarlanıp, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50 – 47 °C'ye kadar soğutulup, petrilere bölündü.

### 2.1.8.1.6 Mueller- Hinton Agar (Merck)

Mueller- Hinton Agar	34 gr.
Mikrobiyolojik Sodyum Klorür	1,5 gr.
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,3' e ayarlanıp, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50 – 47 °C' ye kadar soğutulup, petrilere bölündü.

### 2.1.9.1 İdentifikasyon besiyerleri

#### 2.1.9.2.1 Triple Sugar İron Agar (3'lü tüp) (Merck)

Triple Sugar İron Agar	65 gr.
Mikrobiyolojik Sodyum Klorür	1,5 gr.
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,4' e ayarlanıp 20 ml. lik tüplere 12-13 ml. paylaştırıldı. 15 dakika otoklav edildikten sonra, oda ısısında 30 derecelik eğimle katılaşmaya bırakıldı.

#### 2.1.9.2.2 Jelatin Hidrolizasyon Besiyeri (Merck)

Jelatin	12-14 gr.
Beef extract	1 gr
Pepton	1 gr.
Tuz	1,5 gr.
Distile Su	100 ml

Karışımın pH' si 7,2' ye ayarlanıp, 50 °C sıcaklığa ayarlı manyetik karıştırıcıyla yavaş yavaş belirtilen miktardaki jelatin karışıma ilave edildi. 10 ml. lik steril tüplere 3 ml paylaştırıldıktan sonra 10 d. 115 °C de otoklav edildi. Oda ısısında jel kıvamına gelmesi için bekletildi.

#### 2.1.9.2.3 Mannitol Besiyeri (Tüp II)

Pepton	5.0 gr.
Neopepton	5.0 gr.
Agar	2.5 gr.
Mannitol	2.0 gr.
KNO <sub>3</sub>	1.7 gr.

Fenol red (% 0.2)	20 ml
Distile su	1000 ml
Mikrobiyolojik Sodyum Klorür	1.5 gr.

Kompozisyonu oluşturan maddeler tartıldı, distile su ilave edildi ve agar eriyinceye kadar su banyosunda 60 °C de bekletildi. pH 7,2' ye ayarlanarak 10 ml lik tüplere 3-4 ml. dağıtıldı. 15 d. otoklavlandı. Oda ısısında dikey konularak jel kıvamını alması beklendi (Arda, 1997).

#### 2.1.9.2.4 Üre- İndol Besiyeri (Tüp III)

L- triptofan	0,3 gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 gr.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 gr.
Mikrobiyolojik Sodyum Klorür	0.5 gr.
Üre	2.0 gr.
Etil Alkol (%95)	1.0 ml
Fenol red (% 0.2 )	1.25 ml
Distile su	100 ml
Mikrobiyolojik NaCl	1.0 gr % 1.5 NaCl tuz oranı için.

Kompozisyonu oluşturan maddeler tartılarak distile su ilave edildi. Karışımın pH' si 7,2' ye ayarlanıp, filtre ile sterilize edildi ve steril 10 ml lik tüplere 3-4 ml hacminde paylaştırıldı (Arda, 1997).

#### 2.1.9.2.5 O/F Basal Medium (Merck)

OF Basal Medium	11 gr.
Mikrobiyolojik Sodyum Klorür	1,5 gr.
Distile su	100 ml
Steril Parafin	30 ml

Karışımın pH'sı 7,1' e ayarlanıp 10 ml. lik tüplere 2-3 ml. paylaştırıldı. 15 dakika otoklav edildikten sonra, oda ısısında jel kıvamını alması için bırakıldıktan 24 saat sonra tüplerin yarısına 1 cm. tabaka oluşturacak şekilde parafin ilave edildi (Bilgehan, 1992).

### 2.1.9.2.6. Peptonsuz Falkov Besiyerleri

**Çizelge 2.2:** Peptonsuz Falkov Besiyeri Sarf Madde Miktarları

	<u>Kontrol</u>	<u>ADH</u>	<u>LCD</u>	<u>ODC</u>
L- Arginine HCl	-	2,5 gr.	-	-
L- Lysine HCl	-	-	2,5 gr.	-
L- ornithine 2 HCL	-	-	-	2,5 gr.
Yeast extract	1.5 gr.	1.5 gr.	1.5 gr.	1.5 gr.
Glukoz	0,5 gr.	0,5 gr.	0,5 gr.	0,5 gr.
Brom krezol purpur sol*	0,5 gr.	0,5 gr.	0,5 gr.	0,5 gr.
Distile su	500 ml.	500 ml.	500 ml.	500 ml.
Mikrobiyolojik NaCl	7.5 gr. % 1.5 NaCl tuz oranı için			

- Brom Krezol Purpur Sol:

Brom Krezol Purpur 1.6 gr

Etil Alkol (%95) 100 ml

Belirtilen miktarda tartılan ve ölçülen maddeler distile suda çözündürüldü. pH; 6,4' e ayarlandı. 10 ml. lik tüplere 3-4 ml. dağıtılarak 15 d. otoklav edildi. Oda ısısında soğumaya bırakıldı (Arda, 1997).

### 2.1.9.2.7 Clark- Lups Besiyeri (Merck)

Ticari olarak Merck şirketinden temin edildi. Belirtilen miktarda hazırlanarak 10 ml. lik tüplere 5 ml paylaştırıldı. 15 d. otoklav edildi (Bekar, 2003).

### 2.1.9.2.8 MR-VP Broth (Merck)

MR-VP Broth 17 gr.

Mikrobiyolojik Sodyum Klorür 1,5 gr.

Distile su 1000 ml

Karışımın pH'ı 6,9' a ayarlanıp 10 ml. lik tüplere 5 ml. paylaştırıldı. 15 dakika otoklav edildikten sonra, oda ısısında jel kıvamına gelmesi için bırakıldı.

### 2.1.10 Ayıraçlar

#### 2.1.10.1 Kovacs ayırıcı

Para-dimetil-amino-benzaldehit	5 g
Amil alkol	75 ml
Hidroklorik asit (konsantre)	25 ml

İndol pozitif suşları belirlemek için Tüp-III' e 1-2 damla damlatıldı (Arda, 1997).

#### 2.1.10.2 Metil red ayırıcı

Metil kırmızısı	0.1 g.
Etil alkol (% 95-96)	300 ml
Distile su	200 ml

İnkübe edilen Clark-Lups besiyerinden 2 ml. kültürden alınarak üzerine 2-3 damla Metil red ayırıcı damlatıldı (Arda, 1997).

#### 2.1.10.3 Voges Proskauer ayırıcı

% 5'lik alfa-naftol sol	0.6 ml
% 40'luk KOH	0.2 ml

İnkübe edilen Clark-Lups besiyerinden 1 ml kültürden alınarak üzerine belirtilen miktarlarda ilave edildi (Arda, 1997).

#### 2.1.10.4 Katalase ayırıcı

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	%30'lük
-------------------------------	---------

Üreyen koloniden iğne uçlu öze yardımıyla lam üzerinde yapıldı (Arda, 1997).

### 2.1.11 Otomatize identifikasyon sistemi

Otomatize identifikasyon amacıyla, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü' nde bulunan Vitec II Compact (Fransa - Biomerieux) cihazı kullanılmıştır. Konvansiyonel yöntemlere ve yapılan biyokimyasal testlere göre *Vibrio* spp. olarak belirlenen suşlar, Tryptic Soy Agar'dan alınan saf kolonilerle Vitec II Compact cihazının gram negatif bakteri identifikasyonunda kullanılan identifikasyon kartları ile otomatik analiz yapılmış, 12- 24 saat inkübasyon periyodundan sonra sonuçlar alınmıştır.

## 2.2. Mikrobiyolojik Muayene

### 2.2.1.1. Örneklerden *Vibrio* spp. izolasyonu

Üretim yerlerinden alınan numuneler, soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir. FDA BAM (2004) standart analiz metoduna göre *Vibrio* türlerinin gıdalardan analizi için insanlarda sorun oluşturan *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* ve diğer vibrioların izolasyonu yapılmıştır. Üretim yerlerinden alınan ÇKY tür sayıları ve analizlerin aylara göre dağılımı Çizelge 2.2.de belirtilen şekilde yapıldı.

### 2.2.1.2 İzole edilen suşların identifikasyonu

İzolasyon besi yerlerinde üreyen kolonilerden, koloni morfolojileri dikkate alınarak, hareket muayenesi, jelatin degradasyon, oksidaz, gram boyama, katalaz gibi *Vibrio* spp. lere ait temel özellikler incelenerek, biyokimyasal özelliklerinin tespiti için hazırlanan besiyerlerinde identifikasyona devam edilmiştir. (FDA 2004, Bekar 2003, Arda, 1997, Austin ve Austin 2002)'e göre *Vibrio* türlerinin identifikasyonuna gidilmiştir.

**Çizelge 2.3 : *Vibrio* türlerinin biyokimyasal özellikleri**  
(FDA, 2004; Bekar, 2003; Arda, 1997; Austin ve Austin, 1987)

Fenotipik Özellikler	<i>V. alginolyticus</i> **	<i>V. cholerae</i> *	<i>V. parahaemolyticus</i> *	<i>V. furnissii</i> **	<i>V. holisae</i> ****	<i>V. metschnikovii</i> *	<i>V. mimicus</i> ***	<i>V. vulnificus</i> ***	<i>V. fluvialis</i> ***
TCBS Agarda Koloni Rengi	S	S	Y	S	NG	S	Y	Y	S
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Aktif Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSA' da yayılma	+	-	+	-	-	+	-	+	-
Jelatin Hidroliz	+	+	+	+	-	+	+	+	+
22 °C de üreme	-	-/V	+	+	+	+	+	+	
37 °C de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42 °C de üreme	+	+	+	-	nd	V	+	+	V
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Oksidasyon/Fermentasyon	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
ONPG	-	+	-	+		+	+	+	+
Ürease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	+	-	+	-	+	+		-
Hemoliz (KA) da	+	+/-	+	-	+	-	+	+	-
H <sub>2</sub> S/Gaz	-	-	-	+	-	-	-	-	+
MR/VP	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	-/+	+/-	+/-	-/-
%0 NaCl üreme	-	+	-	-	-	-	+	-	-
%3 NaCl üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%8 NaCl üreme	+	-	+	+	-	V	-	-	V
%10 NaCl üreme	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	-	-	-	+	+	-	-
ADH	-	-	+	+	-	+	-	+	+
ODC	+	+	+	-	-	+	+	+	-
10µg O/129	D	d	D	D	nd	d	d	d	D
150 µg O/129	d	d	d	d	nd	d	d	d	d

S= Sarı Y= Yeşil NG=Üreme yok/ az D= Dirençli d= Duyarlı V= Değişken nd= yapılmadı  
\*(FDA, 2004), \*\* (Arda, 1997), \*\*\* (Bekar, 2003), \*\*\*\* (Austin ve Austin, 1987)

İzolasyon için metotta belirtilen miktarda APW'a inoküle edilen materyal, 18-24 saat zenginleştirildikten sonra selektif besiyeri TCBS agara tek koloni düşürme yöntemiyle geçildi. Tek koloni halinde *Vibrio* spp. şüpheli koloniler genel besiyeri olan %1,5 TSA besiyerine öze yardımı ile tek koloni düşürme yöntemine göre ekildi.

Genel besiyerinde üreyen kolonilerden, hareket muayenesi, jelatin degradasyon, oksidaz, gram boyama, katalaz gibi *Vibrio* spp.'lere ait temel özellikler incelenerek, biyokimyasal özelliklerinin tespiti için hazırlanan besi yerlerinde identifikasyona devam edilmiştir.

### **2.2.1.3 Kullanılan identifikasyon tabloları**

Çalışmada yararlanılan kaynaklardan *Vibrio* spp. izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan identifikasyon tabloları aşağıda sırası ile belirtilmiştir. Çalışmada daha çok esas alınan FDA (2004) metodundaki identifikasyon tabloları kullanılmasına rağmen, bazı durumlarda diğer kaynaklarda belirtilen *Vibrio* spp. identifikasyon tabloları da kullanılmıştır. Aynı zamanda, halk sağlığı sorunlarına sebep olabilecek *Vibrio* türleri çizelge 2.4'de verildi

**Çizelge 2.4:** İnsan patojeni *Vibrionaceae* familyasının biyokimyasal özellikleri (FDA, May 2004)

	<i>V. algi-nolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschni-kovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahae-molyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>A. hydro-philia**</i>	<i>P. shigel-loides**</i>
TCBS agar	S	S	S	S	NG	S	Y	Y	Y	S	Y
mCPC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
CC agar	NG	P	NG	NG	NG	NG	NG	NG	Y	NG	NG
AGS	KA	Ka	KK	KK	Ka	KK	KA	KA	KA	KK	nd
Oxidase	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Ornithine decarboxylase	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Lysine decarboxylase	+	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+
0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
8% NaCl	+	-	V	+	-	V	-	+	-	-	-
10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42°C	+	+	V	-	nd	V	+	+	+	V	+
Sucrose	+	+	+	+	-	+	-	-	-	V	-
D-Cellobiose	-	-	+	-	-	-	-	V	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-
Arabinose	-	-	+	+	+	-	-	+	-	V	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-
D-Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	-
ONPG	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Voges-Proskauer	+	V	-	-	-	+	-	-	-	+	-
10 µg O/129	R	Z	K	K	nd	Z	Z	K	Z	K	Z
150 µg O/129	Z	Z	Z	Z	nd	Z	Z	Z	Z	K	Z
Gelatinase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-

\*\* *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*

Kısaltmalar: TCBS, thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose; mCPC, modified cellobiose-polymyxin B-colistin; AGS, arginine-glucose slant;

S = sarı NG = Üreme az/yok Z = zayıf nd = yapılmadı

Y = yeşil V = Değişken K = Kuvvetli P = Mor,

KK = Üst kısım alkalın / Alt kısım alkalın KA = Üst kısım alkalın / Alt kısım asidik, Ka = Üst kısım alkalın / Alt kısım zayıf asidik

**Çizelge 2.5:** Biyokimyasal testlerin yorumlanması. (ISO/TS 21872-1:2007E, 2007)

Test	<i>V. cholerae</i> <sup>a</sup>	<i>V. parahaemolyticus</i> <sup>a</sup>
Oxidase	+	+
Gaz üretimi (glucose)	-	-
Lactose	-	-
Sucrose	+	-
ODC	+	+
LDC	+	+
ADH	-	-
ONPG hidroliz	+	-
indole üretimi	+	+
Peptone water'da üreme		
0 % NaCl	+	-
2 % NaCl	+	+
6% NaCl	-	+
8 % NaCl	-	+
10 % NaCl	-	+

(a) işaret +; %76 -%89 pozitif anlamında.

## 2.3 Metot

### 2.3.1 İzolasyon prosedürü

- 1- ÇKY örneği steril eldiven, bıçak, havan ve steril pens, makas yardımı ile açılarak 25 gr. tartıldı. Steril kum vasıtası ile ezilerek homojen hale getirildi. Gerekli durumlarda homojenizatörde homojen hale getirildi.
- 2- APW'a inoküle edilen örnekler bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı (donmuş örnek kullanılırsa 2x APW'e inoküle edildi).
- 3- APW'den bir öze dolusu alınarak TCBS agara tek düşürme metodu ile çizme ekim yapıldı. Besiyeri 37°C' de bir gece inkübe edildi.
- 4- Saf olarak üreyen *Vibrio* spp. şüpheli sarı veya yeşil kolonilerden öze yardımı ile alınarak %1,5 – 2 NaCl TSA agara tek düşürme yöntemi ile çizme ekim yapıldı. Besiyeri 37°C' de bir gece inkübe edildi (FDA, 2004).

Çizelge 2.1'de alım tarihi ve sayıları belirtilen örnekler soğuk zincir kuralına uyularak laboratuvara getirildi. Diğer gün analize alınacak örnekler +4 °C'de muhafaza altına alındı. Getirilen örnekler, steril eldiven, steril bıçak ve steril pens-makas yardımı ile açılarak elektronik tartı yardımı ile 25 gr. tartılarak steril kum ile havanda homojen hale getirildi.

Homojen hale getirilen örnek, 225 ml.lik APW' ye 1/10 oranında inoküle edilerek 37°C de bir gece inkübasyona bırakıldı. Alınan örnekler donmuş halde laboratuvara gelmiş ise 2xAPW' ye inoküle edildi.

Bir gece inkübe edilen APW' den bir öze dolusu alınarak Merck'in TCBS selektif agarına çizme yöntemi ile tek düşürme metoduna uygun olarak ekim yapıldı. Ekim yapılan selektif katı besiyeri 37°C' de bir gece inkübasyona bırakıldı.

Saf olarak üreyen *Vibrio* spp. şüpheli sarı veya yeşil kolonilerden öze yardımı ile alınarak % 1,5–2 NaCl TSA' ya tek düşürme yöntemi ile çizme ekim yapıldı ve besiyeri 37°C' de bir gece inkübasyona bırakıldı.

% 1,5–2 NaCl TSA 'da saf olarak üreyen şüpheli kolonilerin identifikasyonu için hazırlanan biyokimyasal test çalışmalarına geçildi

### **2.3.2. İdentifikasyon prosedürü**

#### **2.3.2.1. Temel özellikler**

- 1-TSA'da üreyen saf koloniden; jelatin hidroliz testi yapıldı,
- 2-TSA'da üreyen saf koloniden; hareket muayenesi yapıldı,
- 3-TSA'da üreyen saf koloniden; katalaz testi yapıldı,
- 4-TSA'da üreyen saf koloniden; oksidaz testi yapıldı,
- 5-TSA'da üreyen saf koloniden; gram boyama yapıldı,

Yukarıda belirtilen özelliklere bakılan saf koloniden, aşağıda belirtilen testlerle identifikasyona devam edildi.

#### **2.3.2.2 Biyokimyasal testler**

- 1- 22 °C' de üreme
- 2- 42 °C' de üreme
- 3- Glikoz
- 4- Laktoz
- 5- Mannitol
- 6- Oksidasyon/Fermentasyon
- 7- Ürease
- 8- %0 NaCl üreme
- 9- %3 NaCl üreme
- 10- %8 NaCl üreme

- 11- %10 NaCl üreme
- 12- ONPG
- 13- 10 µg O/129
- 14- 150 µg O/129
- 15- Hemoliz (KA) da
- 16- H<sub>2</sub>S/Gaz
- 17- MR/VP
- 18- LDC
- 19- ADH
- 20- ODC
- 21- İndol

Belirtilen bütün biyokimyasal testler tamamlanarak identifikasyon tablosuna göre değerlendirildi (FDA, 2004; Bekar, 2003; Arda, 1997; Austin ve Austin 2002).

İdentifikasyonda ilk olarak şüpheli koloninin temel biyokimyasal testleri değerlendirildi. TSA'da üreyen saf koloniden jelatin hidroliz testi, 2.3.2.1.1'de anlatılan test yöntemine göre usülüne uygun olarak yapıldı. Hareket muayenesi, 2.3.2.1.2'de anlatılan yöntemine göre usülüne uygun yapıldı. Katalaz testi, katalaz testinin 2.3.2.1.3'de anlatılan yöntemine göre usülüne uygun olarak yapıldı. Oksidaz testi, 2.3.2.1.4'de anlatılan yöntemine uygun olarak yapıldı. Kolonilerin Gram boyamaları 2.3.2.1.5'de anlatılan yöntemine uygun olarak yapıldı. İdentifikasyon için temel özelliklere bakıldıktan sonra şüpheli kolonilerin biyokimyasal testlerine geçildi.

Şüpheli koloni için 22°C üreme kontrolü, 2.3.2.2.1'de anlatılan yöntemine göre yapılarak, besiyeri 22°C' de bir gece inkübasyona bırakıldı. 42°C üreme kontrolü, 2.3.2.2.2'deki yöntemine göre yapılarak besiyeri 42°C' de bir gece inkübasyona bırakıldı. Glikoz testi, 2.3.2.2.3'de anlatılan yöntemine göre usülüne uygun yapılarak besiyeri 37°C' de bir gece inkübasyona bırakıldı. Laktoz testi, 2.3.2.2.4'de anlatılan yöntemine göre yapılarak besiyeri 37°C' de bir gece

inkübasyona bırakıldı. Mannitol testi, 2.3.2.2.5’de anlatılan yöntemle göre usulüne uygun yapılarak, besiyeri 37°C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. Oksidasyon/Fermentasyon testi, 2.3.2.2.6’da belirtilen yöntemle göre usulüne uygun yapılarak tüp içindeki yarı katı besiyerleri 37°C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. Üre testi, 2.3.2.2.7’de anlatılan yöntemle göre usulüne uygun yapılarak tüp içindeki yarı katı besiyeri 37°C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. %0 NaCl üreme kontrolü, 2.3.2.2.8’de belirtilen yöntemle göre yapılarak sıvı besiyeri 37°C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. %3 NaCl üreme kontrolü, 2.3.2.2.9’da belirtilen yöntemle göre yapılarak sıvı besiyeri 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. %8 NaCl üreme kontrolü, 2.3.2.2.10’da belirtilen yöntemle göre yapılarak sıvı besiyeri 37°C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. %10 NaCl üreme kontrolü, 2.3.2.2.11’de belirtilen yöntemle göre yapılarak sıvı besiyeri 37°C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. ONPG testi, 2.3.2.2.12’de belirtilen yöntemle göre usulüne uygun yapılarak tüp içindeki FTS 37°C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. 10 µg ve 150 µg O/129 testi, 2.3.2.2.13’de belirtilen yöntemle göre usulüne uygun yapılarak katı besiyeri 37°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. Hemoliz Kontrolü, 2.1.8.1.2’de hazırlanışı anlatılan %7 defibrine koyun kanı ilaveli Kanlı agar ekimler yapılarak 37°C’de bir gece inkübasyon sonucu değerlendirildi. MR/VP testleri için Clark-Lups sıvı besiyerine ekimler yapıldı, 2.3.2.2.16’da belirtilen yöntemle göre değerlendirildi. ADH, LDC ve ODC testleri için, Peptonsuz Falkov besiyerleri’ne iğne uçlu öze yardımı ile 2.3.2.2.17’de anlatılan yöntemle uygun olarak ekimler yapılarak sıvı parafin ile kapatıldı. Anaerobik ortam oluşturulduktan sonra 37°C’ de bir gece inkübasyon sonucu 2.3.2.2.17’de bahsedilen yöntemle göre değerlendirildi. İndol testi, Üre- İndol Besiyeri (Tüp III) ne iğne uçlu öze yardımı ile ekimler yapılarak 37°C de bir gece inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonucu 2.3.2.2.18’e göre test uygulanarak, değerlendirmeler yapıldı.

### 2.3.2.1.1 Jelatin hidrolizasyon testi

*V. hollisae* hariç diğer bütün *Vibrio* türleri, jelatini hidrolize eden jelatinaz enziminin sentez yeteneğini ölçmede kullanılmaktadır. *Vibrio* türlerinin hepsi jelatini hidrolize edebilme yeteneğine sahiptirler. Protein karakterinde olan jelatin, jelatinaz enzimi ile polipeptidlere ve aminoasitlere kadar parçalanır.

İğne uçlu özeyle alınan koloni, %12-14 jelatin ilavesi ile hazırlanmış jelatinli buyyon'un ortasına kadar dik olarak daldırılarak ekim yapılır. 37 °C'de bir hafta inkübasyona bırakılır. Jelatin 37 °C de sıvı haldedir. Bu yüzden, inkübasyon süresi sonunda tüpler buzdolabı ısısına alınarak 1-2 saat bekletilir. +4°C de bekletildikten sonra kontrol edilen tüplerin içindeki besiyerindeki jelatin kullanıldığında besi yerinin katılaşmadığı görülür. Bu test için, pozitif kontrol olarak *S.aureus*, negatif kontrol olarak *A.hydrophila* kültürleri kullanılır (Arda, 1997).

### 2.3.2.1.2 Hareket muayenesi

Oda ısısına getirilmiş distile sudan bir öze dolusu alınarak lam üzerine konur. TSA' da üreyen saf kültürden iğne uçlu öze ile alınarak lam üzerine yayılır. Işık mikroskopunda önce x10 ve x40 lık büyütmede bakterinin hareketli olup olmadığı tespit edilir. Bu test gerek görüldüğünde APW ile de yapılabilir (Arda, 1997).

### 2.3.2.1.3. Katalaz testi

Bazı mikroorganizmalarda sentezlenen katalaz enziminin saptanması amacıyla uygulanmaktadır. Bu enzim, genellikle aerobik bazı fakültatif bakterilerde mevcuttur. *Vibrio* türlerinin hepsinde bu enzim bulunmaktadır. Katalaz enzimi, Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'i su ve oksijene parçalar.

%30 luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonundan bir öze dolusu lam üzerine konur. TSA'da üreyen saf koloniden iğne uçlu öze yardımıyla alınarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerine yayılarak 1-2 d. süre sonunda lam üzerinde kabarcıkların görülmesi pozitif reaksiyon olarak

değerlendirilir. Bu test için *S. aureus* pozitif, *S. faecalis* negatif kontrol olarak kullanılır (Arda, 1997).

#### 2.3.2.1.4. Oksidaz testi

Mikroorganizmalar tarafından intrasellüler olarak sentezlenen oksidaz enziminin varlığını ortaya koymak için yapılmaktadır. Mikroorganizmalarda oksidaz sistemi, Hidrojen alıcısı olarak oksijenin kullanımını sağlamaktadır. *Vibrio* spp. bütün türlerinde *V. metschnikovii* hariç bu sistem bulunmaktadır.

Merck ticari şirketinden temin edilen oksidaz test kitinden çubuk üzerine iğne uçlu öze yardımı ile alınan koloni yayılır. 1-2 d. süre sonunda çubukta mavi renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilir. Bu test için *P.aeruginosa* pozitif, *E.coli* negatif kontrol olarak kullanılır (Arda, 1997).

#### 2.3.2.1.5 Gram boyama

Bu yöntemde iki ayrı boya kullanılarak, mikroorganizmaların birbirinden ayırt edilmesi sağlanır. Bakteriler, hücre duvarının metilen mavisi boyasını tutup tutmadıklarına göre ikiye ayrılır. *Vibrio* türlerinin hepsi gram negatif özellik gösterirler.

Usülüne göre hazırlanmış, kurutulmuş ve tespit edilmiş preparat üzerine 1-2 d. süresinde metilen mavisi boyası konur. Süre sonunda boya dökülerek 1 d. süre ile lugol solüsyonu konur. Süre sonunda boya dökülerek preparat 5-10 sn. etil alkol ile berrak akıncaya kadar dekolarize edilir. Daha sonra preparat, zıt bir boya olan sulu fulksin ile 20-30 sn. boyanır. Süre sonunda preparat distile su ile yıkanarak kurutulur ve immersiyon objektif ile sedir yağı konularak mikroskop altında bakılır. Gram pozitif bakteriler mavi renkte, gram negatif bakteriler mor-kırmızı renkte görünürler (Arda, 1997).

#### **2.3.2.2.1 22°C' de üreme kontrolü**

Üreyen saf kolonilerden %1.5 TSA'da 22 °C' de üreme kontrolü yapılır (Austin ve Austin, 1987).

#### **2.3.2.2.2 42°C' de üreme kontrolü**

Üreyen saf kolonilerden %1.5 TSA'da 42 °C' de üreme kontrolü yapılır (Austin ve Austin, 1987).

#### **2.3.2.2.3 Glukoz testi**

İğne uçlu öze ile alınan saf koloni, 2.1.9.2.1 de hazırlanışı anlatılan TSI Agar (3'lü tüp) (Merck) yarı katı yatık besiyerinin ortasına kadar batırılarak ekim yapılır. 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılan besiyerinde, tüpün alt 1/3' lük kısmının kırmızıdan sarıya dönüşmesi testin pozitif olduğunu kanıtlar. *Vibrio* türlerinin hepsi karbonhidratlardan glikozu parçalayıp fermente edebildikleri için bu test bütün vibriolar için pozitifdir (Bekar, 2003).

#### **2.3.2.2.4 Laktoz testi**

İğne uçlu öze ile alınan saf koloni, 2.1.9.2.1 de hazırlanışı anlatılan Triple Sugar İron Agar (3'lü tüp) (Merck) yarı katı yatık besi yerinin ortasına kadar batırılarak ekim yapılır. 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılan besiyerinde, tüpün üst 1/3' lük kısmının kırmızıdan sarıya dönüşmesi testin pozitif olduğunu kanıtlar. *Vibrio* türlerinin hiçbiri karbonhidratlardan Laktozu parçalayıp fermente edemezler. Bu yüzden Laktoz testi bütün *Vibrio* spp. için negatiftir (Bekar, 2003).

#### **2.3.2.2.5 Mannitol testi**

İğne uçlu öze ile alınan saf koloni, 2.1.9.2.3'de hazırlanışı anlatılan Mannitol Besi yeri (Tüp II) yarı katı besi yerinin ortasına kadar batırılarak ekim yapılır. 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılan besiyerinde, tüpdeki besiyeri renginin kırmızıdan sarıya dönüşmesi testin pozitif olduğunu kanıtlar.

*Vibrio* türlerinin hepsi karbonhidratlardan mannitolu fermente ederler (Bekar, 2003).

#### **2.3.2.2.6 Oksidasyon/Fermentasyon testi**

İğne uçlu öze ile alınan saf koloni, 2.1.9.2.5. O/F Basal Medium (Merck) besiyerinin yarısına kadar batırılarak ekilir. Aynı koloniden 2 adet O/F besiyerine ekim yapılır. Bir tanesine 1 ml sıvı parafin ilave edilerek fermentatif ortam oluşturulur. 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılan besiyerinde, tüpdeki besiyeri renginin yeşil renkten sarıya dönüşmesi testin pozitif olduğunu kanıtlar. *Vibrio* türleri hem oksidatif hem de fermentatif ortamlarda gelişebilmektedirler (Bekar, 2003).

#### **2.3.2.2.7 Üre testi**

İğne uçlu öze ile alınan saf koloni, 2.1.9.2.4. de yapılışı anlatılan Üre- İndol Besiyeri (Tüp III)’ne iğne uçlu öze yardımı ile ekilir. 37°C de bir gece inkübasyona bırakılan besiyerinde, tüpdeki besiyeri renginin sarıdan kırmızıya dönüşmesi testin pozitif olduğunu kanıtlar. *Vibrio* türlerinin hemen hemen genelinde bu test negatiftir. Bu test bütün *Proteus* türlerinde pozitifdir (Arda, 1997).

#### **2.3.2.2.8 %0 NaCl Üreme kontrolü**

TSA’da üreyen saf kolonilerden %0 NaCl TSA ya ekilerek %0 NaCl üreme kontrolü yapılır. *Vibrio cholerae* tuz bulunmayan ortamlarda üreyebilmektedir (Austin ve Austin, 1987).

#### **2.3.2.2.9 %3 NaCl Üreme kontrolü**

TSA’da üreyen saf kolonilerden %3 NaCl TSA’ ya ekilerek %3 NaCl üreme kontrolü yapılır (Austin ve Austin, 1987).

### 2.3.2.2.10 %8 NaCl Üreme kontrolü

TSA'da üreyen saf kolonilerden %8 NaCl TSA' ya ekilerek %8 NaCl üreme kontrolü yapılır (Austin ve Austin, 1987).

### 2.3.2.2.11 %10 NaCl Üreme kontrolü

TSA'da üreyen saf kolonilerden %10 NaCl TSA' ya ekilerek %10 NaCl üreme kontrolü yapılır (Austin ve Austin, 1987).

### 2.3.2.2.12 ONPG testi

Bu test ONPG' nin ayrışmasını katalize eden beta-galaktosidaz (beta-galaktosidase) enziminin varlığının belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Pozitif kontrol için *E. coli* ve negatif kontrol için *P. morganii* suşları kullanılır.

Tüp içinde daha önceden hazırlanmış steril FTS içine, saf bakteri kültürün öze yardımı ile bırakılmasından sonra 2.1.5'de belirtilen ticari şirketten sağlanan ONPG kitlerinden bir adet tüp içine atılır. 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılan tüplerde sarı rengin görülmesi testin pozitif olduğunu gösterir (Arda, 1997).

### 2.3.2.2.13 10 µg / 150 µg O/129 testi

2.1.6'da bahsedilen O/129 diskleri (Oxoid) tedarik edilerek, 2.1.8.1.6'da bahsedilen Mueller- Hinton Agar (Merck) besiyerine, antibiyotik duyarlılık test tekniğine uygun olarak saf bakteri kültürü ekilir, O/ 129 (10 µg ve 150 µg) test kitleri usulüne uygun şekilde besiyeri üzerine konulur.37°C'de bir gece inkübasyondan sonra antibiyogram besiyerinde oluşan zonlar, antibiyogram test tekniğine göre değerlendirilir. Bu test *Vibrio* türleri için identifikasyonda önem arz etmektedir (NHS, 2005).

#### 2.3.2.2.14 Hemoliz testi

TSA'da üreyen saf koloniden, 2.1.8.1.2.'de hazırlanışı bahsedilen kanlı agara öze yardımı ile ekim yapılarak 37 °C bir gece inkübasyona bırakılır. Süre sonunda, mikroorganizmanın hemoliz oluşturup oluşturmadığı tespit edilir. *V. parahaemolyticus*'un birçok serogrubu ve *V.cholerae*'nin El tor serogrubu kuvvetli beta hemoliz oluşturmaktadır. Fakat *V. cholerae*'nin non-O1 ve non-O139 serogubları hemoliz oluşturmazlar (Arda, 1997).

#### 2.3.2.2.15 H<sub>2</sub>S kontrolü

TSA'da üreyen saf koloniden 2.1.9.2.1.'de hazırlanışı bahsedilen TSI agara (Merck) yapılan ekimlerden sonra inkübasyon süresi sonunda besiyerinde siyahlaşma (H<sub>2</sub>S ) oluşup oluşmadığı gözlemlenir. *Vibrio* türlerinin hiçbiri bu besiyerinde H<sub>2</sub>S oluşturmazlar (FDA, 2004).

#### 2.3.2.2.16 MR/VP testleri

Metil Kırmızısı testinde, glukozun fermentatif metabolize olması sonucu meydana gelen organik asitlerin pH'ı düşürmesi ile oluşan renk gözlemlenmektedir. pH 6.0'da sarı, pH 4.4'de kırmızı renk oluşumu gözlenir. 2.1.9.2.7' de hazırlanışından bahsedilen Clark-Lups Besiyeri (Merck) 'ne yapılan ekimler sonrası inkübasyon sonunda 1 ml alınarak üzerine 4-5 damla metil kırmızısı solüsyonu eklenir ve karıştırılır. 1-2 d. sonra kırmızı renk oluşumu testin pozitif olduğunu gösterir. Bu test için pozitif kontrol olarak *E. coli* kullanılır.

VP testinde mikroorganizmanın glukozu fermente ederek nötral bir ürün olan asetoin'i meydana getirme yeteneği tayininde kullanılır. 2.1.9.2.7'de hazırlanışından bahsedilen Clark- Lups Besiyeri (Merck)'ne yapılan ekimler sonrası inkübasyon sonunda 1 ml alınarak üzerine 2.1.10.3'de bahsedilen Voges Proskauer ayırıcından sırası ile 0.6 ve 0.2 ml damlatılarak iyice karıştırılır. 37 °C'de 4 saat inkübe edilir. Pembe rengin oluşumu acetoin'in varlığını ortaya koyduğu için poziftir. Sarı ve bakır rengin görülmesi negatif olarak kabul edilir. Pozitif kontrol olarak taze *E.coli* kültürü kullanılır (Arda, 1997).

### 2.3.2.2.17 ADH – LDC - ODC testleri

TSA’da üreyen saf koloniden 2.1.9.2.6’da hazırlanışı bahsedilen Peptonsuz Falkov Besiyerleri’ne iğne uçlu öze yardımı ile ekimler yapıp sıvı mikrobiyolojik parafin ile 1 ml kapatılarak fermentatif ortam oluşturulur.

37 °C’de bir gece inkübasyondan sonra şahit tüpte sarı renk oluşumu testin doğru çalıştığıının göstergesi kabul edilir. ADH, LDC, ODC tüplerinde menekşe renk oluşumu, mikroorganizmanın bu tüplerdeki arjinin, lizin ve ornitini kullanma yeteneğinin olduğunu ortaya koyar. Bu tüplerde menekşe rengi pozitif kabul edilir (Bekar, 2003).

### 2.3.2.2.18 İndol testi

Bu test, mikroorganizmaların aminoasit olan triptofan’ı ayrıştırarak indol meydana getirme yeteneğini belirler. İndol testi aynı zamanda *Salmonella* spp. (-), *E.coli* (+), *Klebsiella* spp. (+), *Enterobacter* spp. (+), *P. multocida* (+), *P. haemolytica* (-) nın identifikasyonunda kullanılır.

TSA’da üreyen saf koloniden 2.1.9.2.4’de hazırlanışı bahsedilen Üre- İndol Besiyeri (Tüp III)’ne yapılan ekim ve inkübasyon sonunda, 2.1.10.1’de hazırlanışı bahsedilen Kovacs ayırıcı (Bilgehan, 1992)’ndan 5 damla damlatılarak oluşan kırmızı halkanın gözlemlenmesi testin pozitif olduğunu gösterir (Arda, 1997).

### 2.3.3 Vitec II cihazı ile identifikasyon

2.3.2’de bahsedilen identifikasyon prosedüründe belirtilen tüm testlerin uygulanmasından sonra, TSA’da üreyen saf kültürden gram boyama yapılarak, Vitec II Compact cihazının (Biomerioux) gram negatif bakteri identifikasyonunda kullanılan identifikasyon kartları ile cihaza verildi, yaklaşık 12-24 saat cihazdaki inkübasyon periyodundan sonra sonuçlar okundu.

## 2.4 Standart Serotiplerden Hiperimmün Antiserum Hazırlanması

TSA'da üreyen saf kültürden 2.1.8.1.5'de hazırlanışı bahsedilen Tryptic Soy Broth (Merck)'da iğne uçlu öze yardımı ile ekim yapıldı. Bir gece 37 °C inkübasyondan sonra saf koloni elde edebilmek için tekrar TSA' ya ekim yapılarak bir gece 37 °C'de inkübe edildi. Üreyen saf koloniden daha önceden FTS ile hazırlanan %0,3'lük formalin içine alındı. Bu süspansiyon önce 56 °C lik su banyosunda 30 d. bekletildi. Su banyosundan sonra +4 °C'de 15 d. 3000 g.lik devirde santrifüje edildi. Santrifüj sonunda tüpteki süpernatant alınarak Mc Farland tüp: 4'e eşdeğer olacak şekilde ayarlandı.

Her iki standart kültür için ayrı ayrı hazırlanan bu süspansiyondan tavşanlara 4'er gün ara ile kulak venasından İV yolla sırası ile 0,2- 0,5- 1,0- 1,5 ve son olarak da 2 ml miktarında enjekte edildi. Son aşama olarak 1 hafta sonra formalin kullanılmadan aynı şekilde hazırlanan canlı kültür süspansiyonundan 0,5 ml SC yolla enjekte edildi. Enjeksiyon periyodu bitiminden 10 gün sonra tüm tavşanların kanları alınarak, kan serumları -20 °C'de saklandı (OIE, 2004).

### 2.4.1 Hiperimmün serumların titrasyonlarının belirlenmesi

Steril 10 adet tüpün birincisine 0,8 ml FTS, 0,2 ml titrasyonu belirlenecek serum konuldu. Diğer 9 tüpe 0,5 ml FTS konuldu. 1. tüpten sırası ile 0,5 ml steril pipet yardımı ile 2.- 3.- 4. ve en son tüpe kadar aktarıldı. Son tüpten 0,5 ml dışarı atıldı. Eldeki hiperimmün serum ile aynı türdeki antijen solüsyonundan 0,5 ml sırası ile 1. tüpten son tüpe kadar ayrı pipet ucu kullanılarak eklendi. Böylece tüplerdeki dilüsyon sırası ile 1. tüpte 1/10, 2. tüpte 1/20, 3. tüpte 1/40 ve sırası ile 1/80, 1/160, 1/320 ve en son tüpte 1/4720 ye kadar seyreltilmiş oldu. 15-20 d. süre sonunda 1. tüpten 6. tüpe kadar tüp dibinde presipitasyon reaksiyonları gözlemlendi 7. tüpte bu reaksiyon gözlenmedi. Böylece hiperimmün antiserumun titrasyonu; gözlenen en son presipitasyon tüpünden bir sonraki tüp olan 7. tüpte 1/640 olarak tespit edildi (OIE, 2004).

#### **2.4.1.1 Aglutinasyon tekniği ile saha suşlarının serotiplendirilmesi.**

Lam üzerine 1 damla FTS damlatıldı. Üzerine serotiplendirilmesi amaçlanan tek bir koloni alındı ve bir damla titrasyonu belirlenmiş antiserum ilave edilerek iğne uçlu öze ile karıştırıldı. 30 sn. sonunda içinde verdiği foliküler aglutinasyon'a göre değerlendirildi (OIE, 2004). Yapılan serolojik identifikasyonda, hiç *Vibrio cholerae* non-O1 şuşuna rastlanmadı. Anı zamanda identifiye edilen 18 adet *V. parahaemolyticus* izolasyonunun hiçbirinin O:3K:6 serotipi olmadığı tespit edildi (Erbaş, 2007).

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Mikrobiyolojik Muayeneler

Ayvalık bölgesinden alınan 113 adet örneğin 20 (%17.6) sinden *Vibrio* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu yapıldı. Çanakkale bölgesi yetiştirme istasyonlarından alınan 541 adet örnekten 14 (%2.5) adet *Vibrio* genusu tespit edildi. İzmir merkez ve Çeşme ilçesi üretim yerlerinden alınan 113 adet örnekten 1 adet (%0.8) *Vibrio* spp.'nin izolasyon ve identifikasyonu yapıldı.

#### Otomatize sistemle *Vibrio* spp. identifikasyonu

Konvansiyonel izolasyon ve identifikasyon yöntemleriyle tespit edilen 18 adet *V. parahaemolyticus*, 11 adet *Vibrio alginolyticus* ve 1 adet *Vibrio vulnificus* otomatize identifikasyon sistemle aynı sonucu verdiği görüldü. Konvansiyonel yöntemlerle tespit edilen 3 adet *Vibrio furnissii*, 1 adet *Vibrio mimicus*, 1 adet *Vibrio metschnikovii*'nin otomatize sistemle tespit edilemediği görüldü.

#### 3.2 İzole Edilen *Vibrio parahaemolyticus* Suşlarının Serolojik Muayenesi

İzole ve identifiye edilen 35 adet *Vibrio* spp. türünden 2.1.2 ve 2.1.3'de belirtilen standart *Vibrio cholerae* ve *Vibrio parahaemolyticus* suşlarından 2.4 ve 2.4.1' de belirtilen metotla hiperimmün serumları elde edildi. 2.4.1.1'de belirtilen metotla titrasyonları belirlenen hiperimmün serumlarıyla 36 adet saha suşunun serolojik muayenesi yapıldı.

Yapılan serolojik muayene sonucu hiçbir saha şusu 2.1.2'de belirtilen *Vibrio cholerae* ogawa non-O1 standart suşu ile aglutinasyon vermedi. 2.1.3'de belirtilen *Vibrio parahaemolyticus* O:3 K:6'dan hazırlanan hiperimmün serumla

yapılan serolojik muayene sonucunda 18 adet *V. parahaemolyticus* dan hiçbirinin *Vibrio parahaemolyticus* O:3 K:6 serogrubu olmadığı tespit edildi.

### 3.3 İdentifiye Edilen Saha Şusları

Elde edilen bulgular çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Araştırmada kullanılan Bivalve spp. örneklerinden izole edilen *Vibrio* türlerinin aylara ve ÇKY türlerine göre dağılımı

Aylar	Analiz Edilen Türler					
	İstiridye ( <i>Ostrea edulis</i> )	Kum şırlanı ( <i>Donax trunculus</i> )	Akivades ( <i>Tapes decussatus</i> )	Kara Midye ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	Kıllı Midye ( <i>Modiolus barbatus</i> )	Kidonya ( <i>Venus verrucosa</i> )
Ocak	-	-	<i>V.alginolyticus</i>	-	-	<i>V.alginolyticus</i>
Şubat	-	-	-	-	-	-
Mart	<i>V.furnissii</i>	<i>V.furnissii</i>	<i>V.mimicus</i> <i>V.parahaemolyticus</i>	-	-	<i>V.hollisae</i> <i>V.furnissii</i>
Nisan	-	<i>V.metschnikovii</i>	<i>V.alginolyticus</i>	-	-	-
Mayıs	<i>V.parahaemolyticus</i>		<i>V.alginolyticus</i> <i>V.parahaemolyticus</i>			<i>V.parahaemolyticus</i>
Haziran	-	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i> <i>V.alginolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.alginolyticus</i>
Temmuz	-	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i> <i>V.alginolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	-	<i>V.alginolyticus</i>

### 3.4 Sahadan İdentifiye Edilen *Vibrio* Türleri ve Sayıları

**Çizelge 3.2** Araştırmada kullanılan ÇKY örneklerinden izole edilen *Vibrio* genusu izolatların dağılımı ve sayısı

Bulunan Türler	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18 Ad.
<i>Vibrio alginolyticus</i>	11 Ad.
<i>Vibrio vulnificus</i>	1 Ad.
<i>Vibrio furnissii</i>	3 Ad.
<i>Vibrio mimicus</i>	1 Ad.
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1 Ad.
<i>Vibrio</i> spp. (identifikasyon yapılamadı)	1 Ad.

Yapılan doktora çalışmasında toplam 35 adet *Vibrio* genusu izole ve identifiye edildi. 1 adet *Vibrio* spp.'nin identifikasyonu yapılamamadı.

**Çizelge 3.3 : Sahadan izole edilen *Vibrio* türlerinin identifikasyon özellikleri**

Fenotipik Özellikler	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>Vibrio</i> spp. (identifikasyon yapılamadı)
TCBS Agarda Koloni Rengi	S	Y	Y	Y	Y	S	S
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	+	+	+	+	-	+
Aktif Hareket	+	+	+	+	+	+	+
TSA' da yayılma	+	+	+	-	-	+	-
Jelatin Hidroliz	+	+	+	+	+	+	-
22 °C de üreme	+	+	+	+	+	+	+
37 °C de üreme	+	+	+	+	+	+	+
42 °C de üreme	+	+	+	-	+	+	+
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	+	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Oksidasyon/Fermentasyon	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
ONPG	-	-	-	-	+	+	-
Ürease	-	-	-	-	-	-	-
İndol	+	-	-	+	+	+	+
Hemoliz (KA) da	+	+	+	-	+	-	-/-
H <sub>2</sub> S/Gaz	-	-	-	+	-	-	-
MR/VP	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-
%0 NaCl üreme	-	-	-	-	+	-	+
%3 NaCl üreme	+	+	+	+	+	+	+
%8 NaCl üreme	+	+	+	+	-	NG	+
%10 NaCl üreme	+	-	-	-	-	-	-
LDC	+	-	-	-	+	+	-
ADH	-	+	+	+	+	+	-
ODC	-	+	+	-	+	-	-
10µg O/129	D	D	d	D	d	d	D
150 µg O/129	d	d	d	d	d	d	d

S= Sarı Y= Yeşil NG=Üreme yok/ az D= Dirençli d= Duyarlı V= Değişken Nd= yapılmadı

### 3.5 Numune Alınan Bölgelerde *Vibrio* Türlerinin Tespit Oranları

**Çizelge 3.4** *Vibrio* türlerinin Çanakkale, Ayvalık ve İzmir bölgelerindeki yetiştirme istasyonlarında tespit oranları

<u>Bölgedeki İstasyonlar</u>	<u>% Tespit Oranları</u>
Ayvalık	17.6
Çanakkale	2.5
İzmir-Çeşme	0.8

Bulunan verilere göre, en fazla *Vibrio* spp. tespit oranı Ayvalık bölgesindeki deniz kıyılarımızda tespit edildi

#### 4. TARTIŞMA

Bütün dünyada gıda olarak tüketilen ÇKY'lerden kaynaklanan ve etiyolojik ajanını *Vibrio* türlerinin oluşturduğu gıda zehirlenmeleri gıda sektöründe ciddi problemlere yol açmaktadır. Bu nedenle insanlarda görülen gastroenteritlerin çoğunluğunun kaynağını *V. parahaemolyticus* oluşturmaktadır. Bu durum, ÇKY üretim tesislerinde ve ihracatta her geçen gün daha fazla ekonomik zararlara neden olmaktadır.

Bu tez çalışmasında çizelge 3.3'de verilen *Vibrio* türleri tespit edildi. Kullanılan örneklerden yapılan analizler sonucu 35 Ad. *Vibrio* spp. tanımlanmasına rağmen 1 Ad. *Vibrio* spp. tanımlanamadı.

Yapılan identifikasyonlar sonucu, kullanılan örneklerden *Vibrio cholerae* tespit edilmedi. Tanımlanan biyokimyasal testlere göre *Vibrio parahaemolyticus* identifikasyonu, çizelge 2.3 ve çizelge 2.4 (FDA 2004) de verilen biyokimyasal değerlerle aynı olduğu görüldü.

*Vibrio alginolyticus*, yapılan çalışmada tespit edildiği halde, yukarıda belirtilen çizelgelerde verilen tanımlama tablolarında verilen bazı değerlerin farklı olduğu görüldü, tanımlama çizelgelerinde verilen değerlere göre, bu tür için 22 °C' de üreme verilmediği halde, yapılan tez çalışmasında 22 °C' de üreme tespit edildi. İndol testi verilen tanımlama çizelgelerinde negatif (-) olduğu halde tez çalışmasında pozitif (+) olarak tespit edildi. Aynı zamanda ODC testi *Vibrio alginolyticus'* da pozitif (+) olduğu halde, tez çalışmasında yapılan tanımlamada bu testin negatif (-) olduğu görüldü.

*Vibrio vulnificus* bu çalışmada, yukarıda belirtilen identifikasyon tablolarında verilen değerlerden 2 adet biyokimyasal değeri ile farklılık gösterdi. Bunlardan ONPG testi, tanımlama tablolarında pozitif (+) verildiği halde bu çalışmada negatif (-) sonuç verdi. %8 NaCl sıvı buyyonda üreme testi sonucu, verilen tanımlama tablolarında (-) olmasına rağmen, bu tez çalışmasında pozitif olduğu (+) tespit edildi.

Tez çalışmasında tespit edilen *Vibrio furnissii*, identifikasyon tabloları ile sadece ONPG testinde farklılık gösterdi. Verilen tanımlama tablolarında bu test *Vibrio furnissii* için pozitif (+) olduğu halde, yapılan çalışmada negatif (-) olduğu görüldü.

Çalışma sonunda bu tezde tespit edilen *Vibrio mimicus*'da aynı şekilde tanımlama tablolarından sadece 1 Ad. test ile farklılık gösterdi, ADH testi verilen tanımlama tablolarında bu bakteri için negatif (-) olduğu halde, yapılan çalışmada pozitif (+) olduğu görüldü.

Yapılan identifikasyonda biyokimyasal testler sonucu 1 Ad. *Vibrio metschnikovii* izole edildi, fakat bu *Vibrio* spp. türü bakteri, verilen tanımlama tablolarından 3 Ad. biyokimyasal test ile farklılık gösterdi, bu biyokimyasal değerlerden Metil kırmızısı/Voges-Proskauer (MR/VP) testi, negatif/pozitif (-/+) verildiği halde, bu çalışmada zıddı tespit edildi, *Vibrio metschnikovii* için 42 °C'de üreme testi, tanımlama tablolarında değişken olarak verildiğinden, tez çalışmasında izole edilen *Vibrio metschnikovii* türü, yapılan testlerle 42 °C'de üremenin pozitif olduğu görüldü.

Aynı şekilde ODC testi, bu *Vibrio* spp. türü için pozitif (+) olarak belirtildi halde, bu test, tez çalışmasında yapılan biyokimyasal testler sonucu negatif (-) olduğu görüldü.

Bu bulgular, verilen tanımlama tablolarından bir miktar farklılık gösterse de, bakterilerin biyokimyasal değerlerinin yapılan testlerde % 70-80 oranında aynı görülen değerlerin, bakterinin asıl biyokimyasal değeri olarak kabul edildiği bilinmektedir. Bundan dolayı bazı değerlerin bir bakteri için farklılık göstermesi tanımlama sonucunu değiştirmeyeceği kaynaklarda belirtilmektedir.

Mchenery ve Birkbeck (2006), Prieur (1987), Charles ve diğ (1992), Murphree ve Tamplin (1995) yapmış oldukları çalışmalarda araştırmalar Bivalve spp.'lerin, özellikle insanlar için patojen bakterileri sudan direk olarak filtre edebildiklerini belirtmişlerdir. Le Gall ve diğ., (1997) ve Dupuy ve diğ, (2000)

vermiş oldukları hipotezlerinde ÇKY'lerin direk olarak bakteriyi filtre etmelerinden çok bakterilerle beslenen planktonları filtre ederek kontamine olduklarını belirtmişlerdir.

Tez çalışmasının yapıldığı ocak ve temmuz arası dönemde, ocak ayında kullanılan örneklerden sadece *V. alginolyticus* izole edilmiş olup şubat ayında hiçbir *Vibrio* spp. izole edilmemiştir. *V. parahaemolyticus* izolasyonu yapılan çalışmada Çizelge 3.1'de verilen tabloda mayıs- haziran- temmuz aylarındaki dönemde görülmektedir. Mayıs ayında kullanılan örneklerden sadece İstiridye (*Ostrea edulis*) de *V. parahaemolyticus* izolasyonu görülürken, haziran ve temmuz aylarında alınan kum şırlanı (*Donax trunculus*), akivades (*Tapes ecussatus*), kara midye (*Mytilus galloprovincialis*), kıllı midye (*Modiolus barbatus*) numunelerinde *V. parahaemolyticus* izolasyonu görülmektedir. Bu durum, akvatik ortamda su sıcaklığının 15°C' nin üstüne çıktığı zaman *Vibrio* türlerinin ve özellikle *V. parahaemolyticus*'un bölünme kabiliyetinin artarak, ÇKY'ler tarafından akvatik ortamdan daha çok filtre edildiklerini göstermektedir.

Bunun yanında *V. parahaemolyticus*'a paralel olarak, mayıs- haziran-temmuz aylarında *V. alginolyticus*'da izole edilmiştir. Bu durum *V. alginolyticus*'un *V. parahaemolyticus*'la birlikte aynı ortamlarda rahatlıkla bulunabileceğini, aynı akvatik koşullarda birbirlerine rekabet oluşturmadan üreyebildiklerini göstermektedir.

Mart ayındaki alınan örneklerde *V. furnissii*, *V. mimicus*, *Vibrio metschnikovii* gibi *Vibrio* türlerine de rastlanmıştır. Bu durum, bu türlerin uygun çoğalma ısılarının *V. parahaemolyticus* ve *V. alginolyticus*' tan biraz daha düşük seviyelerde seyrettiklerini düşündürmektedir.

Bununla birlikte yapılan tüm çalışmada, kara midye (*Mytilus galloprovincialis*) ve kıllı midye (*Modiolus barbatus*) örneklerinden sadece *V. parahaemolyticus* izolasyonu yapılmıştır. Bu durumun, bulunduğu ortamdan mı, yoksa midye türünden mi kaynaklandığı çok açık değildir. Yapılan birçok araştırmada bu durumla ilgili bir veriye rastlanmamıştır. Kara midye (*Mytilus galloprovincialis*) ve kıllı midye (*Modiolus barbatus*)'in tür bazında

*V. parahaemolyticus* ve *V. alginolyticus* dışında diğer *Vibrio* türlerine direnç gösteren bir fizyolojik özelliğinin bulunabileceğini akla getirmektedir. Ya da bu ÇKY türlerinin birçok *Vibrio* türünün çoğalmasını engelleyen mevcut bir enzimatik fonksiyonunun olabilme ihtimalini düşündürmektedir. Bu konular yapılan bu çalışmayla ortaya çıkan fakat açıklanamayan konulardır. İleride araştırmacılar için bu konunun değerlendirilmesinde bir fikir verebilmesi açısından önem arz etmektedirler.

Aydın ve Soytemiz, (2002) çalışmalarında üretim sahalarından alınan toplam 70 adet kum midyesi ile çalışıldığı belirtilmiş ve bu örneklerin 10 unda (%14,3) *Vibrio parahaemolyticus* izolasyonu yapıldığı ifade edilmiştir. Bu örneklerin kasım- ocak- şubat ve eylül dönemlerinde alındığı belirtilmektedir.

Aydın ve Soytemiz' in yaptığı çalışma, bu tez çalışmasındaki verilerle tezat arz etmektedir. Sonbahar döneminde Ocak ve Şubat da alınan hiçbir Bivalve spp. örneğinde *Vibrio parahaemolyticus*'a rastlanmadı. Ancak Mart ve diğer aylarda alınan örneklerden *Vibrio parahaemolyticus* izole edilmeye başlandı. Aydın ve Soytemiz' in yaptığı çalışmada ÇKY örneklerinin tam olarak hangi üretim sahalarından tedarik edildikleri belirtilmediği halde, yapılan bu çalışmada örnek alınan bölgelerden olma ihtimali bulunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan 958 adet örnekten sadece 18 adet (yaklaşık %1,9) *V. parahaemolyticus* izole edildi. Oysa bahsedilen çalışmada tek ÇKY türü kullanılmasına rağmen %15'e varan *Vibrio parahaemolyticus* izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bulunan bu oran, bu çalışmada bulunan *V. parahaemolyticus* oranından çok farklı olduğu görülmektedir.

Aydın ve Soytemiz (2002)' in yaptığı bu çalışmada, ön zenginleştirme için %3 lük NaCl APW kullanıldığı belirtilmiştir. Bunun yanında selektif agarda üreyen şüpheli *Vibrio parahaemolyticus* kolonileri %0 NaCl TSA'ya geçilerek identifikasyona gidilmiştir. Bu durum, 2002'de yapıldığı bahsedilen çalışma ile bu çalışmada kullanılan (FDA, 2004) *Vibrio* spp. izolasyon metodu ile tezat arz etmektedir. Esas alınan metoda paralel olarak, ön zenginleştirme NaCl ilavesi yapmadan kullanılan APW'da gerçekleştirildi. Ayrıca *Vibrio* türleri için seçici

(selektif) olarak kullanılan TCBS agardan sonra %1,5 TSA'ya geçilerek identifikasyona devam edildi.

Akalın ve Tuna (1999)' nin yapmış oldukları çalışmada, 583 adet ÇKY örneğinin %11,5 inde *V. parahaemolyticus* izole ettiklerini, örneklere göre izolasyon sıklığının ise midyelerde %7,3 olduğunu bildirmişlerdir. 583 adet ÇKY örneği içinde %11,5 lik *V. parahaemolyticus* izolasyonu, sayıca yaklaşık 125 adet *V. parahaemolyticus* izolasyonu olduğunu ifade etmektedir. Belirtilen araştırmada, bu tez çalışmasındaki araştırmaya göre çok yüksek *V. parahaemolyticus* izolasyonu yapıldığı görülmektedir. Bu çalışmada kullanılan 958 adet örnekten sadece 18 adet (yaklaşık %1,9) *V. parahaemolyticus* izole edildi. Araştırmada kullanılan örnek sayısının, ifade edilen çalışmada kullanılan örnek sayısından daha fazla olmasına rağmen, *V. parahaemolyticus* izolasyon oranının %1,9 oranında kalması önem arzeden bir durum olarak ortaya çıkmaktadır.

Yılmaz ve Bilgin (2003), Marmara denizinden (Gelibolu bölgesi) kum midyesi (*Venus gallina*) ve kara midyelerin (*Mytilus galloprovincialis*) mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmalarda 60 örnekten 35 adet kara midye (*Mytilus galloprovincialis*) ve 25 adet kum midyesi (*Venus gallina*) kullanmışlardır. Örnekler bölgedeki balıkçılardan tedarik edilmiştir. Yapılan izolasyondan sonra konvansiyonel yöntemlerle yapılan identifikasyonun yanında API 20E identifikasyon sistemi ID 32 (Bio Merieux) identifikasyonu kullanılarak, yapılan identifikasyon desteklenmiştir.

Marmara, Gelibolu bölgesinde yapılan bu araştırmada alınan örneklerden *Vibrio* spp. için yapılan hiçbir analizde *V. cholerae* ve *V. parahaemolyticus* identifikasyonu elde edilmemiştir. Bu sonuç, bu çalışmada yapılan *V. cholerae* analizleri ile örtüşmektedir. Yapılan çalışmada kullanılan 958 adet ÇKY örneğinin hiçbirisinde *V. cholerae* izole edilmedi fakat kullanılan aynı örnek sayısından 18 adet *V. parahaemolyticus* izole edildi.

Gelibolu bölgesinde yapılmış olduğu belirtilen çalışma ile bu çalışma *V. cholerae* izolasyonu yönünden paralellik göstermektedir. Yapılan çalışmada ve bu çalışmada alınan örneklerden *V. cholerae* izole edilmemesinin, Marmara ve

Ege sahil bölgelerimize kanalizasyon ve atık sularının karışmadığından dolayı olduğunu düşündürmektedir. Fakat bahsedilen çalışma ile bu tez çalışması arasında *V. parahaemolyticus* yönünden tezat arz ettiği görülmektedir. Bu tez çalışmasında alınan örneklerden 18 adet *V. parahaemolyticus* izole edilmesine rağmen, 2003 de Gelibolu bölgesinde yapılan çalışmada 70 örnekten hiç *V. parahaemolyticus* edilmemiştir. Bunun nedeninin de her ne kadar alınan örneklerin hangi mevsimsel dönemde alındığı tam olarak belirtilmemiş olmasına rağmen, örnek sayısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan çoğu araştırmada *V. parahaemolyticus*'un TDH ve TRH enzimlerini tespit ederek mikroorganizmanın patojenitesinin tespiti amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında izole edilen *V. parahaemolyticus* suşları ile mevcut olan standart *Vibrio parahaemolyticus* O:3 K:6 suşundan elde edilen hiperimmün serumla serolojik olarak lam-aglutinasyon testi yapıldı. Bu mikroorganizmanın insanlar için patojenitesi en güçlü olarak bilinen serogrubu ile yaptığımız serolojik muayenede elde ettiğimiz *V. parahaemolyticus* saha suşlarımızdan hiçbiri aglutinasyon vermedi. Bu yüzden örneklerimizi aldığımız Marmara ve Ege sahillerindeki deniz suyu ortamında bulunan *V. parahaemolyticus* suşlarının çoğunun insanlar için önemli bir serotipi olan O:3 K:6 olmadığı sonucuna varıldı.

Jaksic ve diğ., (2002), 117 adet deniz balığı ve ÇKY örnekleri bölgede mevcut otellerden ve balık marketlerinden tedarik edilmiştir. Yapılan çalışmada %47,83 oranındaki pozitif *Vibrio* spp. izolasyonunun %9,4 oranını *V. parahaemolyticus*, 8 adet örnekten % 3.42 oranında *V.alginolyticus* oluşturmuştur. *V.alginolyticus* izolasyonu otellerden alınan 4 örnekten ve marketlerden alınan 3 örnekten izole edilmiştir. Örneklerin sadece 1 tanesinde ise *V. vulnificus* izole edilmiştir. *V. parahaemolyticus* izolasyonu yapılan 4 adet örnek ise otellerden, 7 adet örnek de marketlerden tedarik edilmiştir. Yapılan çalışmada izole edilen *Vibrio* türlerinin çalışma için alınan örneklere spesifitesi olan mikroorganizmalar olmadığı, lakin yapılan izolasyonların örneklerin hasat edildikleri akvatik ortamla bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Bahsedilen çalışma, her ne kadar Adriyatik denizi gibi insanlarda gıda problemi oluşturan mezofilik *Vibrio* türlerinin çoğalması için su sıcaklığı yeterli seviyede yüksek olmamasına rağmen aranan *Vibrio* türü mikroorganizmaların, özellikle *V. parahaemolyticus*,

*V.alginolyticus*, *V. vulnificus* gibi türlerinin deniz ortamında mevcudiyetlerini koruduklarını göstermektedir. Bahsedilen çalışma, bu tez çalışması ile paralellik göstermektedir. Nitekim, bu tez çalışmasında yapılan örneklendirmede alınan numuneler kış, bahar ve yaz başlangıcı dönemi dahil edildi. Yapılan bu tez çalışmasında her ne kadar örneklerden yapılan izolasyon sayısı alınan dönemlere göre değişse de *Vibrio* türü mikroorganizmaların Ege ve Marmara sahil şeridinde her dönemde mevcut oldukları ortaya koyuldu.

Vural ve Erkan (2006), yapılan diğer bir çalışmada gıda riski oluşturan çoğu mikroorganizmalar araştırılmış olup bununla beraber *V. cholerae* ve *V. parahaemolyticus* yönünden de kontrol edilmiştir. Bahsedilen bu çalışmada Dicle Nehrinin üç farklı noktasından 51 adet balık örneği alınmış olup çalışmada kullanılmıştır. Araştırmanın bulgular kısmında numunenin alındığı nehrin mikrobiyolojik kalite parametrelerinde araştırma sonucunda *V. cholerae* ve *V. parahaemolyticus*'un da bulunduğu açıklanmıştır. Bununla beraber yapılan bu çalışmada hiçbir analiz metodu açıkca belirtilmediği gibi, *V. cholerae* ve *V. parahaemolyticus* izolasyon identifikasyon metodları da belirtilmemiştir. Tespit edilen mikroorganizmaların mikrobiyolojik değerleri hiçbir şekilde yazılmamıştır. Aynı zamanda, tespit edilen *V. cholerae* suşlarının Mısır'da bulunan Kolera Enstitüsü'ne gönderilip teyit ettirilmediği için kolera etkeninin tespiti uluslararası bir kesinlik kazanmamıştır. Bahsedilen çalışma, yapılan bu tez çalışmasıyla tezat oluşturmaktadır. Bu çalışmada yapılan bütün analizlerden elde edilen suşların biyokimyasal değerleri açıklandı. Bunun yanında örneklerde *V. cholerae* tespiti görülmedi. Yukarıda bahsi geçen çalışmada bulunan identifikasyonlar, özellikle de *V. cholerae* izolasyonları, bu çalışmada iki şekilde değerlendirildi. Ya bahsi geçen nehirde Diyarbakır kenti kanalizasyonundan kaynaklanan kontaminasyon, ya da analizlerin metodunda bir hata şüphesi olarak algılandı.

Erdoğrul ve Bülbül (2002), Kahramanmaraş Balık Halinde Satılan Tahta Balığından (*Acanthobrama marmid*) 41 adet örnek kullanılmıştır. Yukarıda Dicle Nehrinde yapıldığı bahsedilen çalışmada olduğu gibi, bu çalışmada da örnekler gıda riski taşıyan mikroorganizmalar yönünden analize alınmıştır. Yapılan çalışma sonucu örneklerin 31'inde (%75,6) *V. cholerae* ve 22'sinde (%53,6) *V. parahaemolyticus* saptanmıştır. Bu çalışmada da kullanılan analiz metodlarının

hangi standart metot olduğu belirtilmemekle beraber, metot çok yüzeysel yazılmış olup, hiçbir analiz tam olarak açıklanmamıştır. Ayrıca *V. cholerae* ve *V. parahaemolyticus*'un izolasyonundan sonra sadece serolojik olarak identifikasyona gidilmiştir. Fakat hangi standart suşları ve bu suşların hangi serotiplerinin kullanıldığı açık değildir. Hatta serolojide kullanılan suşların standart suş olup olmadıkları bile açık değildir. Bahsedilen araştırma, bu araştırmayla tezat oluşturmaktadır. Çünkü bu tez çalışmasında yapılan identifikasyonda önce belirtilen metotlardaki biyokimyasal testler değerlendirildi ve sadece mevcut bulunan tek tip *V. cholerae* serotipi ve tek *V. parahaemolyticus* serotip suşundan elde edilen antiserumlarla seroloji yapıldı. Bunun sonucunda elde edilen saha suşları bu serotiplere göre değerlendirildi. Oysa yukarıda bahsedilen çalışmada nasıl antiserum elde edildiği belirtilmemiştir. Ya da antiserumların, kolera etkeninin tüm serotip serumlarının alınıp alınmadığı belirtilmemiştir. Antiserumların üretildiği ya da satın alındığı aşıkardır. Bu da yanlış pozitif ve yanlış negatif ihtimalinin sonuçlara yüksek oranda yansıdığını düşündürmektedir.

Lhafi ve Kühne (2007), Wadden denizinden alınan 90 adet ÇKY örneğinde gıdalarda sorun oluşturan diğer mikroorganizmalar yanında *Vibrio* türlerinin analizini yapmışlardır. Yapılan çalışmanın sonuçlarında kullanılan örneklerden, en sık olarak (%51,2)'sinde *V. alginolyticus*, (%39,5)'inde *V. parahaemolyticus* ve *V. cholerae* O1 ve non-O139, (%3,5) *V. vulnificus* ve (%1,2) sinde *V. harveyi* izole edilmiştir. *V. vulnificus* izolasyonu su sıcaklığının 15 °C ile 20 °C olduğu ilk üç örnekten yapılmıştır. Araştırmacılar bu bakterinin daha soğuk sulara da adapte olabildiğini düşünmektedirler. Su sıcaklığının en yüksek olduğu zamanlarda *V. parahaemolyticus* izolasyonunun en yüksek oranda olduğu belirtilmiştir. Bulunan *V. cholerae* izolasyonları non-O1 ve non-O139 olarak tespit edilmiştir.

Bununla beraber Sugumar ve diğ., (1998), Japonya'da *Vibrio* spp. lerin *Crassostrea gigas* larvalarındaki etkilerini ve antibiyotik dirençlerini inceledikleri çalışmalarında iki ayrı larva grubu kullanılmıştır. 25°C'de yapılan bu çalışmada, bir tanktaki larvalar için 7,2 µg dozunda streptomisin (streptomycine) kullanılmıştır. İki tankta da *Vibrio* türleri için yapılan bakteriyolojik analizlerde

*Vibrio splendidus* biovar II, *V. harveyi* ve *V. alginolyticus* izolasyonları yapılmış olup, antibiyotik kullanılan tanktaki larvaların bu mikroorganizmalara daha dirençli oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışmada, ÇKY larvalarında enfeksiyona neden olan *Vibrio* türlerinin yanında ayrıca insanlarda gıda problemi yapan *Vibrio* türlerinin de ÇKY larvalarının ölümünde sekonder olarak etkili oldukları görülmüştür. Bu tez çalışmasında ortaya koyulan *Vibrio* türlerinin, Türkiye'deki üretim sahalarındaki alanlardan alınarak gıda tüketimine sunulan ÇKY türlerinin insanlarda oluşturdukları gastroenteritis riskinin yanında Japonya'da yapılan bu çalışma dikkate alındığında, insanlarda gastroenteritis riski oluşturan *Vibrio* türlerinin aynı zamanda ÇKY larvalarında görülen enfeksiyonlara sekonder olarak katıldıklarını düşündürmektedir.

Epidemik kolera zincirlerinin hala ABD'de Gulf kıyıları ve Australya'da endemik olarak mevcudiyetini devam ettirdiği belirtilmiştir (Lyon, 2001). Değişik tarihlerde ABD, Hindistan, Peru, İngiltere'den toplanan 67 adet *Vibrio* spp. zincirinin kullanıldığı bu çalışmada, *V. cholerae* zincirleri hazırlanan TaqMan primer problemlerinin duyarlılığının (sensivitesinin) değerlendirilmesinin yanında, Standart *V. cholerae* serotype O1 (ATCC 14035) ya da *V. cholerae* serotype O139 (ATCC 51394) 'un Brain Heart Broth (BHI) agarda bir gece üretilmesinden sonra 10 katlı dilüsyonları hazırlanarak  $6.7 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> miktarında, taze olarak hasat edilen midyelerden 25 gr. tartıldıktan sonra, homojenizatlara eklenmiştir. PCR 'de bu belirtilen standart *V. cholerae* serotipler 6 ila 8 CFU ml<sup>-1</sup> limitinde tespit edilmiştir. Bahsedilen çalışma ile bu çalışmada örneklerin toplandığı sahil şeritlerinde ÇKY'lerde yapılan *Vibrio* spp. taramasında kolera etkeni tespit edilmemesine rağmen, tespit edilen kolera sahalarının günümüzde ulaşım ve temas olanaklarının çok hızlı ve yoğun olduğu düşünüldüğünde, bizim için de kolera etkeninin hızlı ve doğru bir şekilde tespiti önem arz etmektedir.

Japonya'da Kyoto Üniversitesinde Bivalve spp. örnekleriyle yapılan çalışmada, 86 örnekten hem konvansiyonel çalışma hem de *V. parahaemolyticus* 'un toxR geninin tespitini amaçlayan PCR çalışması yapılmıştır (Dileep ve diğ., 2003). Konvansiyonel yöntemle 28 adet, moleküler yöntemle 53 adet *Vibrio parahaemolyticus* tespit edilmiştir. Sadece bir örnekten tdh ve trh genleri pozitif sonuç vermiştir. Moleküler yöntemle PCR yönteminin bu

mikroorganizmayı tespitindeki sayı farklılıklarının, bakterinin Bacteriological Analytical Manual of US (FDA)'da açıklanan biyokimyasal özelliklerinin elde edilen izolatların biyokimyasal testlerinde bir ya da iki adet değişiklik olduğu için kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu değişikliğin konvansiyonel yöntemle identifikasyonda zorluk çıkardığını ve konvansiyonel yöntem dışında PCR ile tespit edilen 32 adet *Vibrio parahaemolyticus*'un 28'inin kimyasal özelliklerinin bir kaçında FDA'da belirtilen tablodan farklı olduğunu belirtmişler.

Aynı şekilde Rosec ve diğ., (2009)'nin yapmış olduğu benzer çalışmada, ISO'nun yayınlamış olduğu kültürel metotla 57 adet doğal ortamdan alınan ÇKY örneği incelenmiştir. Daha sonra bu sonuç *Vibrio parahaemolyticus*'un tox-R geni ile yapılan PCR çalışması ile karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda 57 örnekten kültürel çalışmada sadece 3 adet *Vibrio parahaemolyticus* tespit edilirken PCR çalışması sonucu olarak toxR genine göre 8 adet, pR72H genine göre 25 adet *Vibrio parahaemolyticus* tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan örneklerden tespit edilen 35 adet *Vibrio* spp. izolasyonunda, serolojik olarak sadece *Vibrio parahaemolyticus* ve *Vibrio cholerae* değil aynı zamanda diğer elde edilen izolatlar lam- aglutinasyon yöntemi ile bakıldı. İzolatların, mevcut bulunan standart suşlarla, homolog olmadığı anlaşıldı. Fakat tüm örneklerin moleküler yöntemle identifikasyonu yapılamadığından, mevcut olan fakat izole edilemeyen *Vibrio* türlerini tespiti yapılamadı.

**Çizelge 4.1** *Vibrio* türlerinin insanlarda oluşturduğu klinik sendromlar (Pavia ve diğ., 1989).

<http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt20.htm#Top>

Türler	Klinik Sendrom				
	Gastroenteritis	Yara enfeksiyonu	Kulak enfeksiyonu	Primer Septisemi	Seconder Septisemi
<i>V. cholerae</i> O1	+++	+			
<i>V. cholerae</i> non-O1	+++	++	+	+	+
<i>V. mimicus</i>	++		+		
<i>V. fluvialis</i>	++				
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+		+
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
<i>V. cincinnatiensis</i>				+	
<i>V. hollisae</i>	++			+	
<i>V. vulnificus</i>	+	++		++	++
<i>V. furnissii</i>	(+)				
<i>V. damsela</i>		++			
<i>V. metschnikovii</i>	(+)			(+)	
<i>V. carchariae</i>		+			

<sup>a</sup>+++ = Sıklıkla rapor edilen, ++ = Daha az yaygın (6-100 rapor); + = Seyrek (1-5 rapor), and (+) = Açık değil. <sup>b</sup> Pavia ve diğ., (1989).

Çizelge 4.1’de belirtildiği üzere, *Vibrio* türleri bütün dünya üzerinde insanlarda gıda kaynaklı sorunlara neden olmaktadır. Özellikle risk grubu insanlar bu durumdan en fazla etkilenen gruba girmektedir. Bu tez çalışmasında yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen *Vibrio parahaemolyticus* (18 Ad.) ve *Vibrio alginolyticus* (11 Ad.)’un özellikle yurdumuzun sahil şeridinde yaşayan risk grubu insanlarda Çizelge 4.1’de belirtilen deniz ürünlerinden elde edilen gıda kaynaklı gastroenteritis vakaları sıklıkla görüldüğü bilinmektedir.

Bunun yanında, bu çalışmada izole edilen diğer *Vibrio* türleri, yurdumuzda gastroenteritis vakalarının yanında birçok yara enfeksiyonunun da etkeni olduğunu düşündürmektedir. Özellikle deniz ürünlerinin işlenmesi ve gıda olarak hazır hale getirilmesindeki tüm aşamalarda görev alan risk grubu insanlarda bu

durumun görülme sebebinin, Ege ve Marmara sahil şeridimizde tespit edilen *Vibrio* türlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

**Çizelge 4.2** *V. cholerae* sıcaklık- zaman dayanıklılık çizelgesi.

<http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt20.htm#Top>

Sıcaklık(°C)	Zaman (dk.)	Medium	Referanslar
48.9	9.17	Karides homojenatı	Hinton ve Grodner, 1985
49	8.15	Yengeç eti	Schultz ve diğ., 1984
54	5.02	Yengeç eti	Schultz ve diğ., 1984
54.4	0.43	Karides homojenatı	Hinton and Grodner, 1985
60	2.65	Yengeç eti	Schultz ve diğ., 1984
60	0.39	Karides homojenatı	Hinton ve Grodner, 1985
65.5	0.32	Karides homojenatı	Hinton ve Grodner, 1985
66	1.60	Yengeç eti	Schultz ve diğ., 1984
66	1.22	Kerevit homojenatı	Grodner ve Hinton, 1985
71	0.30	Yengeç eti	Schultz ve diğ., 1984
71	0.30	Kerevit homojenatı	Grodner ve Hinton, 1985
71.1	0.31	Karides homojenatı	Hinton ve Grodner, 1985
76.7	0.30	Karides homojenatı	Hinton ve Grodner, 1985
77	0.27	Kerevit homojenatı	Grodner ve Hinton, 1985
82	0.27	Kerevit homojenatı	Grodner ve Hinton, 1985
82.2	0.28	Karides homojenatı	Hinton ve Grodner, 1985

**Çizelge 4.3** *V. parahaemolyticus* sıcaklık- zaman dayanıklılık çizelgesi.

<http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt20.htm#Top>

Sıcaklık (°C)	Zaman (dk.)	Medium	Referanslar
47	65.1	7.5% NaCl	Beuchat ve Worthington, 1976
49	0.82	Midye homojenatı	Delmore ve Chrisley, 1979
51	0.66	Midye homojenatı	Delmore ve Chrisley, 1979
53	0.40	Midye homojenatı	Delmore ve Chrisley, 1979
55	0.29	Midye homojenatı	Delmore ve Chrisley, 1979

**Çizelge 4.4** *V. vulnificus* sıcaklık- zaman dayanıklılık çizelgesi.

<http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/chapt20.htm#Top>

Sıcaklık(°C)	Zaman (dk.)	Medium	Referanslar
47	2.40	Tamponlanmış tuzlu su (Buffered saline)	Cook ve Ruple, 1992
50	1.15	Tamponlanmış tuzlu su (Buffered saline)	Cook ve Ruple, 1992

Çizelge 4.2, 4.3, 4.4'de deniz ürünü gıdalarından insanlarda sorunlara yol açan en önemli 3 *Vibrio* türü olan *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*'un hangi ısı derecelerinde ne kadar dayanabildikleri verilmiştir. Belirtilen çizelgelere göre, hijyen şartlarında ve deniz ürünlerinin işlenmesi sırasında uygulanan ısı işlemlerde en büyük sorunu *V. cholerae*'nin oluşturduğunu görmekteyiz. *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus*'un pastörizasyon sıcaklığı altındaki 50-55 °C'lik ısıda çok hızlı bir şekilde yok olduklarını gördüğümüz halde, *V. cholerae* 80 °C'nin üstündeki sıcaklıkta kısa süre de olsa dayanabilmektedir.

Bu durum, Ege ve Marmara sahil şeridimizde yoğun olarak tüketilen deniz ürünlerinin, özellikle kontrolsüz olarak yapılan midye tüketiminin, insanlarda görülen deniz ürünü gıdalarından kaynaklanan gastroenteritis vakalarının kaynağı olduğunu düşündürmektedir. Deniz ürünü gıdalarının işlenmesi sırasındaki hijyenik koşulların kontrolünde aksaklıkların oluştuğu aşıkardır. Hiç değilse gıda işlemi sırasında mutlaka pastörizasyon kurallarına uyulması gerektiğini düşündürmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasındaki araştırma sonucu, Türkiye'de insan gıdası olarak Bivalve spp. tüketiminden kaynaklanabilecek sorunların her zaman ciddiyetini koruduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmadan her ÇKY türünden *V. parahaemolyticus* izolasyonu yapılabildiği ortaya konuldu.

*V. parahaemolyticus* halk sağlığı bakımından hâlâ önemli bir risk teşkil etmektedir. Kirlilik oranının deniz ve tatlı sularımızda yükselmesi durumunda, bu sorunun daha belirgin bir şekilde ortaya çıkması olasıdır. Bu yüzden gıda olarak kullanılacak ÇKY ürünlerinin hasatından sonra tüketiciye sunuluncaya kadar geçen tüm aşamalarında, gerekli hijyenik tedbirlerin ve pişirme işlemlerinin en uygun şekilde dikkate alınması gerekmektedir.

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada kullanılan örnekler, FDA (2004) *Vibrio* spp. izolasyon ve identifikasyon metoduna göre konvansiyonel yöntemlerle analize alınıp, elde edilen izolasyonların biyokimyasal testlerle tanımlanması yapılmıştır. Aynı zamanda tedarik edilen *V. cholerae* ve *V. parahaemolyticus* standart suşları ile serum elde edilip, elde edilen izolatların serolojik yönden analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, Ege ve Marmara sahillerimizde kolera tehdidinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Her ne kadar alınan örneklerden *V. parahaemolyticus* izolasyonları yapılsa da, bu izolatların O:3 K:6 serotipi olmadığı serolojik analizlerle tespit edilmiştir. Bu sayede bahsedilen sahil kıyılarımızda ve bu bölgelerde üretilip tüketime sunulan ÇKY türlerinde O:3 K:6 serotipi yönünden ciddi gıda riski oluşturacak bir durum olmamasına rağmen, hijyen kurallarına uyulması ve gıda olarak tüketime sunulan ÇKY ürünlerinin mutlaka pastörizasyona tabii tutulması gerektiği sonucuna varılmıştır.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- **ACTIS, L.A., TOLMASKY, ME., CROSA, J.H., (1999)** Vibriosis, CAB international, Fish diseases and disorders, vol:3, viral, bacterial, fungal infections (eds P.T.K. Woo and D.W Bruno), Dept.of Microbiology, Miami-USA, 523- 557 pp.
- **AKALIN, N., TUNA, I., (1999)** 1998- 1999 Yıllarında muayene edilen çift kabuklu yumuşakça ve deniz suyu örneklerinden *Vibrio parahaemolyticus* izolasyonu, Bor. Vet. Knt. Arş. Enst. Derg., 24 (38), 85-90 s.
- **ALAM, M.J., TOMOCHIKA, K.I., MIYOSHI, S.I., SHINODA, S., (2002)** Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Scto- Inland Sea, Japan, FEMS Microbiol. Lett., 208, 83-87 pp.
- **AOAC., (1995)** *Vibrio cholerae* in oysters: Elevated temperature enrichment method. Sec. 17.11.01, Method 988.20. In Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., P.A. Cunniff (Ed.), p. 106B-108. AOAC International, Gaithersburg, MD.  
<http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium>
- **ARDA, M., (1997)** Temel Mikrobiyoloji, Medisan yayınları, 4. baskı, Ankara-Türkiye, 294-315 pp.
- **ARIAS, C.R., MACIAN, M.C., AZNAR, R., GARAY, E., PUJALTE, M.J., (1999)** Low incidence of *Vibrio vulnificus* among vibrio isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. J. Appl. Microbiol. 86, 125- 134 pp.
- **AUSTIN, B., AUSTIN, D.A., (1987)** Bacterial Fish Patogens, Ellis Harwood Limited, England, 263- 324 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **AUSTIN, B., AUSTIN, D.A., (2002)** Bacterial Fish Patogens, Ellis Harwood Limited, 3.th Ed.,England
- **AUSTIN, B., BUCKE, D., FEIST, S.W., HELM, M., (1988)** Disease problems among cultured bivalve larvae. Internal Report, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research, Lowestoft 16, 1-22 pp.
- **AYAZ, N.D., EROL, I., (2005)** Canlı fakat kültürü yapılmayan bakteriler ve gıda güvenliği yönünden önemi, Etlik Vet. Mikrobiology Dergisi, 2004, cilt:15, sayı:1-2, 61-74 pp.
- **AYDIN, A., SOYTEMİZ, E., (2002)** Balık türlerinden ve kum midyelerinden (*Venus gallina*) *Vibrio parahaemolyticus* izolasyonu ve identifikasyonu, Turk. J. Vet. Anim. Sci.Tubitak, Turkiye, 5 p.
- **AYGUN, G., (2007)** Türkiye'de kolera, *V. cholerae* O1 ve O139, Kolera etkeni ve non-cholera vibriolar ya da non-agglutinable vibriolar, Mikrobiyoloji ders notları, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.
- **BAUMANN, P., SCHUBERT, R.H.W., (1984)** Family II. Vibrionaceae In: Krieg N.R., Holt J.G. (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins co., Baltimore, 516- 550 pp.
- **BEKAR, M., (2003)** Enfeksiyon hastalıkların tanısı ve bakteriyolojik tanıda kullanılan rutin yöntemler, Merk.Vet.Knt.Arş.Ens.Md.,yayın no: 2003/4, Etlik- Ankara, 33-82 pp.
- **BEKAR, M., (2003)** Enterobacteriaceae familyası, mikroorganizmaların genel karakterleri ve tanı yöntemleri, Merk.Vet.Knt.Arş.Ens.Md.,yayın no: 2003/3, Etlik- Ankara, 160-216 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- **BEKAR, M., (2003)** Gram negatif mikroorganizmalar, genel karakterleri ve tanı yöntemleri, Merk.Vet.Knt.Arş.Ens.Md.,yayın no: 2003/2, Etlik- Ankara, 429 p.
- **BEKAR, M., (2003)** Gram pozitif patojen mikroorganizmalar, genel karakterleri ve tanı yöntemleri, Merk.Vet.Knt.Arş.Ens.Md.,yayın no: 2003/1, Etlik- Ankara, 189-205 pp.
- **BERGSROM, N., NAIR, GB., WEINTRAUBA., JANSSON PE. (2002)** Structure of the O- polysaccharide from the lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* O6 Res 337, 813-817 pp.
- **BERLIN, D.L., HERSON, D.S., HICKS, D.T., HOOVER, D.G., (1999)** Response of pathogenic vibrio species to high hydrostatic pressure, Applied and Environmental Microbiology, june 1999, vol:65, no:6, 2776- 2780 pp.
- **BEUCHAT, L.R., ve WORTHINGTON, R.E., (1976)** Relationships between heat resistance and phospholipid fatty acid composition of *Vibrio parahaemolyticus*. Appl. and Environmental Microbiol., 31 (3), 389- 394 pp.
- **BILGEHAN, H., (1992)** Klinik mikrobiyolojik tanı, Fakülteler kitapevi, Barış yayınları, İZMİR
- **BIOSCA, E.G., AMARO, C., ESTEVE, E., ALCAIDE, E., GARAY, E., (1991)** First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* L., J. fish Diseases, 14, 103-109 pp.
- **BLACKSTORE, G.M., NORDSTROM, J.L., VICKERY, M.C.L., BOWEN, M.D., MEYER, R.F., DePAOLA, A., (2003)** Journal of Microbiological Methods (53), USA, 147-155 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **BLAKE, P.A., ALLEGRA, D.T., SNYDER, J.D., BARRETT, T.J., McFARLAND, L., CARAWAY, C.T., FEELEY, J.C., CRAIG, J.P., LEE, J.V., PUHR, ND., FELDMAN, R.A., (1980)** Cholera- a possible endemic focus in the United States, N. Engl. J. Med. 6, 305-309 pp.
- **BOGOSIAN, G., MORRIS, P.J.L., O'NEIL, J.P., (1998)** A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state, Appl. Environ. Microbiol. 64, 1736- 1742 pp.
- **BROWN, C., (1981)** A study of two shellfish pathogenic vibrio strains isolated from a LongIsland hatchery during a recent outbreak of disease, J. of Shellfish Research 1.
- **BROWN, C., ROLAND, G., (1984)** Characterization of exotoxin produced by a shellfish- pathogenic *Vibrio* spp., J. of Fish Disease 7, 117-126 pp.
- **CABELLO, A.E., ROMILIO, T., ROMERO, E.J., (2003)** Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a green fluorescent protein tag, Lab. de biotecnologia, Universidad de Chile, Santiago- Chile, 10p.
- **CHARLES, F., AMOUUROUX, J.M., GREMARE, A., CAHET, G., (1992)** Filtration of the enteric bacteria *Escherichia coli* by two filter-feeding bivalves, *Venus verrucosa* and *Mytilus galloprovincialis*, Mar. Biol., 113, 125-131 pp.
- **CHAUDHURI, K., CHATTERJEE, S.N., (2009)** Cholera toxins, Indian Institute of Chemical Biology, Springer Science, Berlin- Germany, 322 p.  
[www.springer.com](http://www.springer.com)

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- **CHIOU, C-S., HSU, S-Y., CHIU, S-I., WANG, T-K., CHAO, CS. (2000)** *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of foodborne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999, J. Clin. Microbiol., 38, 421- 4625 pp.
- **COOK, D.W., (1991)** Microbiology of bivalve molluscan shellfish. In: Ward D.R., Hackney C.R. (Eds.), Microbiology of Marine Food Products, New York, 19-40 pp.
- **COOK, D.W., (1991)** Effect of time and temperature on multiplication of *Vibrio vulnificus* in postharvest gulf coast shellstock oysters, Appl. Environ. Microbiol. 60, 3483- 3484 pp.
- **COOK, D.W., O'LEARY, P., HUNSUCKER, J.C., SLOAN, E.M., BOWERS, J.C., OLDGETT, R.J., DePOLA, A., (2002)** *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in US retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999, J. Food Prot., 65, 79-87 pp.
- **COOK, D.W., RUPLE, A.D., (1992)** Cold storage and mild heat treatment as processing aids to reduce the number of *Vibrio vulnificus* in raw oyster, J.Food Protect., 55 (12), 985- 989 pp.
- **COLWELL, R., LISTIN, J., (1960)** Bacteriological study of natural flora of pacific Oysters (*Crassostrea gigas*), Appl. Microbio., 8, 19-40 pp.
- **ÇAĞIRGAN, H., (1993)** Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata L.*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax L.*) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma, İzmir- Türkiye, 117 s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- **DANIELS, N.A., MacKINNON, L., BISHOP, R., ALTEKRUSE, S., RAY, B., HAMMOND, R.M., THOMPSON, S., WILSON, S., BEAN N.H., GRIFFIN, P.M., SLUTSKER, L., (2000)** *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998., J. Infect. Dis., 181, 1661-166 pp.
- **DELMORE, R.P., CHRISLEY, F.D., (1979)** Thermal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in clam homogenate, J. Food Protect., 42 (2), 131- 134 pp.
- **DePAOLA, A., HOPKIN, L.H., PEELER, J.T., WENTZB., McPHEARSON, R.M., (1990)** Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters ad oysters, Appl. Environ. Microbiol., 56, 2299- 2302 pp.
- **DePAOLA, A., CAPERS, G.M., ALEXANDER, D.M., (1994)** Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf Coast., Appl. Environ. Microbiol., 60, 984-988 pp.
- **DePAOLA, A., KAYSNER, C.A., BOWERS, J.C., COOK, D.W., (2000)** Environmental investigation of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington , Texas and New York (1997 and 1998). Allied and Environmental Mic. 66, 4649- 4654 pp.
- **DILEEP, V., KUMAR, H.S., KUMAR, Y., NISHIBUCHI, M., KARUNASAGAR, I., (2003)** Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment, The Society for Applied Mic., Letters in Applied Microbiology 2003, 36, 423-427 pp.
- **DUNGAN, C.F, ELSTON, R.A., (1988)** Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destructing of hinge ligaments of cultured juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Aquaculture 72, 1-14 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **DUNGAN, C.F., ELSTON, R.A., SCHIEWE, M.H., (1989)** Evidence for colonisation and destruction in hinge ligaments of cultured juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by by Cytophaga-like bacteria, App. Environ. Microbiol. 55, 1128- 1135 pp.
- **DUPUY, C., VAQUER, A., LAM- HOAI, T., ROUGIER, C., MAZOUNI, N., LAUTIER, J., COLLOS, Y., Le GALL, S., (2000)** Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. Marine Ecology Progress Series, 205, 171- 184 pp.
- **DYBDAHL, PASS, D.A., (1985)** An investigation of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima*, in Western Australia. Fisheries Department of Western Australia, Report No.71, Perth, Western Australia, 78 pp.
- **ELSTON, R.A., LEIBOVITZ, L., RELYEA, D., ZATILA, J., (1981)** Diagnosis of vibriosis in a commercial hatchery epizootc: diagnostic tools and management features, Aquaculture 24, 53- 62 pp.
- **ELSTON, R.A., ELLIOT, E.L., COLWELL, R.R., (1982)** Conciolin infection and surface coating *Vibrio* spp. shell fragility growth depression and mortalities in cultured oysters and clams *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis* and *Mercenaria mercenaria*, Journal of Fish Diseases 5, 265-284 pp.
- **ELSTON, R.A., (1984)** Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry, J. World Maricult Soc:15, 284- 300 pp.
- **ELSTON, R.A., (1993)** Infectious diseases of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Annu Rev. Fish Dis.3, 259- 276 pp.
- **ERBAŞ, G., (2007)** Aydın ve İzmir bölgesindeki sığırlardan *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu, tiplendirmesi ve antibiyotiklere duyarlılıkları, Aydın- Türkiye, 42 s.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **ERDOĞRUL, Ö., BÜLBÜL, O., (2006)** Kahramanmaraş balık halinde satılan *Acanthobrama marmid* ve halin genel hijyenik durumunun mikrobiyolojik yönden değerlendirilmesi, KSU. Journal of Science and Engineering 9(2), 2006, 41-45 pp.
- **FDA, BAM., (2004)** U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual Online, chapter: 9, 40 p., [www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9html](http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9html), erişim tarihi: 23.11.2007
- **FARMER III, J.J., JANDA, M., BIRKHEAD, K., (2003)** *Vibrio*, In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. (Eds.), Manual of Clinical Microbiology, 8th edition. ASM Press, Washington D.C., 706- 718 pp. Gubernator M., 11.11.2005 ( <http://www.muschelfischer.de/>).
- **GALLUT, J., (1971)** The 7th. cholera pandemia (1961-1966, 1970), Bull Soc Pathol Exot Filiales 64, 551-560 pp.
- **GARLAND, C.D., NASH, G.V., SUMMERC, E., McMEEKIN, T.A., (1983)** Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in Tasmanian hatchery, Australian Journal of Marine and Freshwater Research 34., 483- 487 pp.
- **GENESTE, C., DAB, W., CABANES, P.A., VAILLANT, V., QUILCI M.L., FOURNIER, J.M., (2000)** Les Vibrios non cholériques en France: cas Identifiés de 1995 – 1998 par le centre national de référence. Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire 9, 38-40 pp.
- **GONZALES-ESCALONA, N., CACHICAS, V., ACECEDO, C., RIOSECO, M.L., VERGARA, J.A.I., CABELLO, F., ROMERO, J., ESPEJO, R.T., (2005)** *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chil, 1998 and 2004, Emerging infectious Diseases ,11, 129- 131 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **GOOCH, J.A., DePAOLA, A., BOWERS, J., MARSHALL, D.L., (2002)** Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters j., Food Prot., 65, 970-974 pp.
- **GOTOH, M., BARNES, CN., KOVAC, P., (1994)** Improved synthesis and the crystal structure of methyl alpha-dideoxy-4-3-deoxy-L-glycero-tetronamido- alpha-D-mannopyrano side, the methyl alpha-glycoside of intracatenary repeating unit of the O-polysaccharide of *Vibrio cholerae* O:1, Carbohydr Res 260, 203-218 pp.
- **GRISEZ, L., REYNIERS, J., VERDONCK, L., SWINGS, J., OLLIVIER, F., (1997)** Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from hatcheries, during larval development. Aquaculture, 155 (1-4), 387- 399 pp.
- **GRODNER, R.M., HINTON, A., (1985)** Determination of the thermal death time of *Vibrio cholerae* in crayfish meat homogenate (*Procambarus clarkii* gerard). In Proceedings of the Ninth Annual Tropical and Subtropical Fisheries conference, R. Nickelson (Ed.), 15- 20 pp. TAMU-SG-85-106, Texas A&M Univ., College Station, TX.
- **HALPERN, M., LANDSBERG, O., RAATS, D., ROSENBERG, E., (2006)** Culturable and VBNC *Vibrio cholerae*: Interactions with chironomid egg masses and their bacterial population, Dept. of Molecular Mic. and Biotechnology, Tel Aviv University, Israel, Microbial ecology, Springer Science vol:53, 285- 293 pp. [www.springer.com](http://www.springer.com)
- **HAYASHI, S., OKURA, M., OSAWA, R., (2006)** Soft agar coated filter metod for early detection of viable and thermostable direct hemolysin (TDH)- or TDH- related hemolysin producing *Vibrio parahaemolyticus* in seafood, Applied and Environmetal Microbiology, American Society for Microbiology, vol:72, no:7, 4576- 4582 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **HERVIO-HEATH, D., ZIDANE, M., LE SAUX, J.C., LZACH, S., VAILLANT, V., LE GUYADER, S., POMMEPUY, M., (2005)** Toxi-infections alimentaires collectives liees a la consommation de moues contaminees par *Vibrio parahaemolyticus*: enquete environnementale, Bulletin Epidemiyologyque Hebdomadaire, 17, 1-2 pp.
- **HINTON, A., GRODNER, R.M., (1985)** Determination of the thermal death time of *Vibrio cholerae* in shrimp (*Penaeus setiferus*). In proceedings of the Ninth Annual Tropical and Subtropical Fisheries Conference, R. Nickelson (Ed.), TAMU-SG-85-106, Texas A&M Univ. College Station, TX, 109-119 pp.
- **HISATSUNE, K., KONDO, S., ISSHIKI, Y., IGUCHI, T., HAISHIMA, Y., (1993)** Occurrence of 2-O- methyl-N-(3-deoxy- L- glycer- tetronyl)-D-perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-D-manno-pyranose) in lipopolysaccharide from Ogawa but not from Inaba O forms of O1 *Vibrio cholerae*, Niochem Biophys Res Commun 190, 302- 307 pp.
- **HLADY, W.G, MULLEN, R.C., HOPKIN, R.S., (1993)** *Vibrio vulnificus* from raw oyster. Leading cause of reported deaths from foodborne illness in Florida, The Journal of the Florida Medical Assciation 80, 536- 538 pp.
- **HOI, L., LARSEN, J.L., DALSGAARD, I., DALSGAARD, A., (1998)** Occurrence of *Vibrio vulnificus* bitypes in Danish marine environments, Appl. And Environ. Microbiol. 64, 7-13 pp.
- **HONDA, S., GOTO, I., MINEMATSU, I., IKEDA, N., ASANO, N., ISHIBASHI, M., KINOSHITA, Y., NISHIBUCHI, M., HONDA, T., MIWATANI, T., (1987)** Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*, Lancet i., 331- 332 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **HONDA, T., NI, Y., MIWATANI, T., (1988)** Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolates of Kanagawa phenomenon- negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin, *Infect. Immun.* 56, 961-965 pp.
- **ISO/TS 21872-1:2007(E), (2007)** First edition, Interpretation of biochemical tests, Microbiology of food and animal feeding stuffs , Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*, [www.iso.org/iso/catalogue\\_detail.htm?csnumber=38279](http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=38279)
- **JAKSIC, S., UHITIL, S., PETRAK, T., BAZULIC, D., KAROLYI, L.G. (2002)** Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea, *Food Control* 13, Elsevier, 491- 493 pp. [www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)
- **JEFFRIES, V.E., (1982)** Three vibrio strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*, *Aquaculture* 29, 201- 226 pp.
- **KANEKO, T., COLWELL, R.R., (1973)** Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay., *J. Bacteriol.*, 113, 22-24 pp.
- **KARPER, J.B., CAMPEN, R.K., SCIDLER, R.J., BALDINI, M.M., FALKOW, S., (1984)** Cloning of the thermostable direct or Kanagawa phenomenon- associated hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*, *Infect Immun.* 45, 290- 292 pp.
- **KELL, D., KAPRELYANTS, A.S., WEICHART, D.H., HARWOOD, C.R., BARER, M., (1998)** Viability and activity in readily culturable bacteria: A review and discussion of the practical issues, *Antonie vanLeeuwenhoek*, 73, 169- 187 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- **KENNE, L., LINDBERG, B., SCHWEDA, E., GUSTAFSSON, B., HOLME, T., (1998)** Structural studies of the O- antigen from *Vibrio cholerae* O:2. Carbohydr Res 180, 285-294 pp.
- **KIM, Y.B., OKUDA, J., MATSUMOTO, C., TAKAHASHI, N., HASHIMOTO, S., NISHIBUCHI, M., (1999)** Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to toxR gene. Journal of Clinical Microbiology 37, 1173- 1177 pp.
- **KUEH, C.W., TAMPLIN, M., (1985)** Bacteria in bivalve shellfish with special reference to oysters., J. Appl. Bacteriol.,59, 41-47 pp.
- **KYASNER, C.A., DePAOLA, A., (2000)** Outbreaks of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis from raw oyster consumption: assessing the risk of consumption and genetic methods for detection of pathogenic strains. J. Shellfish Res., 19, 657 p.
- **KYASNER, C.A., DePAOLA, A., (2001)** Vibrio. In: Downes, f.p., Ito, K. (Eds), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th. Ed., American Public Health Association, Washington, DC., 405-420 pp.
- **LEE, H.K., (1996)** The vibrios isolated from saltwater fish aquaria of raw slice markets in winter. Journal of Korean Society of Microbes, 31 (5), 503-510 pp.
- **LEE, C.Y., CHENG, M.F., YU, M.S., PAN, M.J., (2002)** Purification and characterization of putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiol. Lett. 209, 31-37 pp.
- **LANDERSJO, C., WEINTRAUB, A., ANSARUZZAMAN, M., ALBERT, M., WIDMALM, F., (1998)** Structural analysis of the O antigenic polysaccharide from *Vibrio mimicus* N-1990, Eur J Biochem 251, 986-990 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **LEAMASTER, B.R., WALSH, W.A., BROCK, J.A., FUJIOKA, R.S., (1997)** Cold stress- induced changes in the aerobic heterotrophic gastrointestinal tract bacterial flora of red hybrid tilapia, *Journal of Fish Biology*, 50 (4), 770- 780 pp.
- **Le GALL, S., HASSEN, M.B., Le GALL, P., (1997)** Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension- feeders. *Marine Ecology Progress Series*, 152, 301- 306 pp.
- **LHAFI, S.K., KUHNE, M., (2007)** Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden sea, *International Journal of Food Microbiology* 116 (2007) 297-300 pp.  
[www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)
- **LISTON, J., (1990)** Microbial hazards of saffron consumption, *Food Technol.*, 44, 56-62 pp.
- **LIZZARGA – PARTIDA, M.L., MONTOYA- RODRIGEZ, L., GENDROP-FUNES, V., (1997)** The use of bacterial counts in two Mexican shrimp hatcheries, *Ciencia Mar*, 23, 129- 140 pp.
- **LONG, R.A., ROWLEY, D.C., ZAMORA, E., LIU, J., BARTLETT, D.H., AZAM, F., (2005)** Antagonistic interactions among marine bacteria impede the proliferation of *Vibrio cholerae* , *Appl Environ Microbiol.*, 71, 8531- 8536 pp.
- **LOZANO- LEON, A., TORRES, J., OSORIO, C.R., MARTINEZ-URTAZA, J., (2003)** Identification of tdh- positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 281- 284 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **LYON, W.J., (2001)** TaqMan PCR detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non- O1 and non- O139 in pure cultures, raw oysters and synthetic seawater, Applied and Environmental Microbiology, American Society for Microbiology vol:67, no:10, 4685- 4693 pp.
- **MacDONNEL, M.T., COLWELL, R.R., (1985)** Syst. And Appl. Micro. 6, 171- 182 pp.
- **Mac LAUGHLIN, J.B., DePAOLA, C.A., BOP, K.A., MARTINEK, N.P., NAPOLILLI, C.G., ALLISON, S.L., MURRAY, E.C., THOMPSON, M., BIRD, M., MIDDAUGH, J.P., (2005)** Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with alaskan oysters, New England, Journal of Medicine, 353, 1463- 1470 pp.
- **MAKINO, K., OSHIMA, K., KUROKAWA, K., YOKOYAMA, K., UDA, TAKAYUKI., TAGOMORI, K., (2003)** Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*; a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*, Mechanisms of disease, The lancet 2003 Vol: 361, 742- 749 pp.  
[www.thelancet.com](http://www.thelancet.com)
- **MARTINEZ-URTAZA, J., SIMENTAL, L., VELASCO, D., DePAOLA, A., ISHIBASHI, M., NAKAGUCHI, Y., NISHIBUCHI, M., CARRERA-FLORES, D., REY- ALVAREZ, C., POUSA, A., (2005)** Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe, Emerg. Infect Dis., 11, 1319- 1320 pp.
- **MARTINEZ – URTAZA, J., LOZANO –LEON, A., VARELA- PET, J., TRINANES, J., PAZOS, Y., GARCIA – MARTIN, O., (2008)** Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* from the rias of Galicia, App. Environ Microbiol. 74, Spain, 265 -274 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **MASCOLA, L., TORNEY, M., DASSESY, D., ILMAN, L., HARVEY, S., MEDINA, A., TILZER, A., WATERMAN, S., (1996)** *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oyster- Los Angeles, morbidity and mortality weekly report 45, 621- 624 pp.
- **McGLADDERY, S.E., (1999)** Shellfish diseases (Viral, Bacterial and Fungal), Department of fisheries and oceans, Gulf fisheries centre, New Brunswick- Canada, 723-842 pp.
- **McHENERY, J.G., BIRKBECK, T.H., (2006)** Journal of Fish Diseases, Vol:9, Issue:3, 257- 261 pp.
- **MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L.F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M., TAUXE, R.V., (1999)** Food related illness and death in the United States, Emerging infectious Disease 5, 607- 625 pp.
- **MIYAMOTO, Y., KATO, T., OBARA, Y., AKIYAMA, S., TAKIZAWA, K., YAMAI, S., (1969)** In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus* : its cose correlation with human patogeniticy, J.bacteriol. 100, 1147-1149 pp.
- **MIZUNOE, Y., WAI, S.N., ISHIKAWA, T., TAKADE, A., YOSHIDA, S., (2000)** Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature unde starvation, FEMS Microbiol. Lett., 186, 115- 120 pp.
- **MURPHREE, R.L., TAMPLIN, M.L., (1995)** Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, Appl. Environ. Microbiol. 61 (10), 3656- 3660 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **MUTTER, R., MANNHEIM, W., BISGAARD, M., (1989)** *Taxonomy of the group.*, 3-34 pp, In: Adlam C. F., Rutter J. M. (Eds): *Pasteurella and Pasteurellosis*, Academic Press Inc., New York
- **NHS., (2005)** Susceptibility testing, National Standart Metod, Standarts unit, evaluation and standarts laboratory, Health protection agency, BSOP 45 i.2, [www.evaluations-standarts.org.uk](http://www.evaluations-standarts.org.uk), erişim tarihi: 20.11.2007
- **NICHIBUCHI, M., KAPER, J.B., (1985)** Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*, *J. Bacteriol.* 162, 558- 564 pp.
- **NICHIBUCHI, M., KAPER, J.B., (1995)** Minireview, Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* : a virulence gene acquired by a marine bacterium, *Infect. Immun.* 63, 2093- 2099 pp.
- **NICOLAS, J.L., ANSQUER, D., COCHARD, D.S., (1992)** Isolation and characterization of a pathogenic bacterium specific to Manila clam *Tapes philippinarum* larvae, *Diseases of Aquatic Organisms* 14, 153-159 pp.
- **NOTTAGE, A.S., BIRKBECK, T.H., (1986)** Toxicity to marine bivalves of culture supernatant fluids of bivalve- pathogenic vibrio strain NCMB 138 and other marine vibrios, *J. of fish disease* 9, 249- 256 pp.
- **NOTTAGE, A.S., SINCLAIR, P.D., BIRKBECK, T.H., (1989)** Role of low molecular weight ciliostatic toxins in vibriosis of bivalve molluscs, *J. of Aquatic Animal Health* 1, 180- 186 pp.
- **OIE., (2004)** Manual of Diagnostic Tests and Vacines for Terrestrial Animals, 5th edition, 1-16 pp. [http:// www.oie.int/eng/normes/mmanal/a\\_00063.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanal/a_00063.htm) erişim tarihi: 13.11.2009

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- **OKUDA, J., ISHIBASHI, M., HAYAKAWA, E., NISHINO, T., TAKEDA, Y., MUKHOPADHYAY, A.K., GRAG, S., BHATTACHARYA, S.K., NAIR, G.B., NISHIBUCHI, M., (1997)** Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from southeast Asian travelers arriving in Japan, *J. Clin. Microbiol.*, 35, 3150-315 pp.
  
- **OLAFSEN, J.A., MIKKELSEN, H.V., GIAEVER, H., HANSE, G.H., (1993)** Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1848- 1854 pp.
  
- **OLIVER, J.D., (1989)** In M.P. Doyle (Ed.), *Vibrio vulnificus*, foodborne bacterial pathojens, New York: Marcel Dekker, 569- 600 pp.
  
- **O'NEIL, K.R., JONES, H., GRIMES, D.J., (1992)** Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay Estuary of New Hampshire and Maine., *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3257- 3262 pp.
  
- **PASS, D.A., DYBDAHL, R., MANNION, M.M., (1987)** Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster (*Pinctada maxima*), In western Australia, *Aquaculture* 65, 149- 169 pp.
  
- **PASTER, B., PELLETIER, D.A., DEWHIRST, F.E., WEISTBURG, W.G., FUSSING V., POULSEN, L.K., DANNENBERG, S., SCHROEDER, I., (1996)** Phylogenetic position of spirochetal genus *Cristispira*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 942-946 pp.
  
- **PAVIA A.T., BRYAN, J.A., MAHER, K.L., HESTER, T.R., FARMER, J.J. III., (1989)** *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Ann. Intern. Med.*, 111, 85-86 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- **PERKINS, F.O., (1993)** Infectious diseases of molluscs. In: Crouch J.A. and Fournie J.W. (eds) *Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 255- 287 pp.
- **PRIEUR, D., (1987)** A review of the relationships between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Symbiosis* 4, 37-50 pp.
- **RIPABELLI, G., SAMMARCO, M.L., GRASSO, G.M., FANELLI, I., CAPRIOLI, A., LUZZI, I., (1999)** Occurrence of *Vibrio* and the other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* harvested from Adriatic Sea, Italy, *International J. Food Microbiol.*, 49, 43-48 pp.
- **ROBERT, A., GUENOLE, A., LESNE, J., DELESMONT, R., FOURNIER, J.M., QUILICI, M.L. (2004)** Occurrence of *thd* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two french coastal areas and from seafood imported into France, *International J. food Microbiol.* 91, 319-325 pp.
- **ROMERO, J., GONZALEZ, N., ESPEJO, R., (2002)** Marine *Pseudoalteromonas* spp. Composes most of the bacterial population developed in oysters (*Tiostrea chilensis*) spoiled during storage. *J. Food Sci.*, 67 (6), 2300- 2303 pp.
- **ROSEC, J.P., SIMON, M., CAUSSE, V., BOUDJEMAA, M., (2009)** Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: Comparison of PCR protocols using *Pr72H* or *toxR* targets with a cultured method, *International Journal of Food Microbiology*, 129 (2009), 136-145 pp. [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro) erişim tarihi: 07.05.2010

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **SCHULTZ, L.M., RUTLEDGE, J.E., GRODNER, R.M., BIEDE, S.L., (1984)** Determination of the thermal death time of *Vibrio cholerae* in blue crabs (*Callinectes sapidus*), J. Food Protect 47 (1), 4-6 pp.
- **SENCHENKOVA, SN., ZATONSKY, GV., SHASHKOV, AS., KNIREL, YA., JANSSON, PE., WEINTRAUB, A., ALBERT, MJ., (1998)** Structure of the O-antigen of *Vibrio cholerae* O155 that shares a putative D- galactose 4,6-cyclophosphate- associated epitope with *V.cholerae* O139 Bengal, Eur J. Biochem 254, 58-62 pp.
- **SHIRAI, H., ITO, H., HIRAYAMA, T., NAKAMOTO, Y., NAKABAYASHI, N., KUMAGAI, K., TAKEDA, Y., NISHIBUCHI, M., (1990)** Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin TDH and THD- related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis, Infection and Immunity ,58, 3568-3573 pp.
- **SINDERMANN, C.J., (1988)** Vibriosis of larval oysters. In: Sindermann C.J. and Lightner D.V (eds) *Disease Diagnosis and Control in North American Aquaculture*, Developments in Aquaculture and Fisheries Science 17, Elsevier, Amsterdam, 271- 273 pp.
- **STICKNEY, R.R., (2000)** Bacterial disease agent, Encyclopedia of aquaculture, Texas USA, 82-107 pp.
- **SU, Y-C., LIU, C., (2006)** *Vibrio parahaemolyticus*; A concern of seafood safety, International Journal of Food Microbiology, 24 (2007), 549-558 pp. [www.elsevier.com/locate/fm](http://www.elsevier.com/locate/fm) Erişim tarihi:12.10.2009
- **SUGUMAR, G., NAKAI, T., HIRATA, Y., MATSUBARA, D., MUROGA, K., (1998)** *Vibrio splendidus* biovar II as causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae, Disease of aquatic organisms, published June 19, vol: 33, 111- 118 pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- **TANIGUCHI, H., OHTA, H., OGAW, M., MIZUGUCHI, Y., (1985)** Cloning and expression in *E.coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabil hemolysin genes, J. bacteriol., 162, 10-515 pp.
- **THOMPSON, C.A., VANDERZANG, C., (1976)** Effect of processing distribution and storage on *Vibrio parahaemolyticus* and bacterial counts of oysters (*Crassostrea virginica*), J. Food Sci. 41, 123-127 pp.
- **TORANZO, A.E., BAYA, A.M., ROBERSON, B.S., BARJA, J.L., GRIMES, D.J., HETRICK, F.M., (1986)** Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish patojens, Elsevier science publishers B.V., Amsterdam- Nederlands, 81-97 pp.
- **TORANZO, A.E., BARJA, J.L., (1990)** A review or the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain, Disease of Aquatic Organisms 9, 73- 82 pp.
- **TUBIASH, H.S., CHANLEY, P.E., LEIFSON, E., (1965)** Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile mollusks. J. Bacteriology 90, 1036- 1044 pp.
- **TUBIASH H.S., COLWELL R.R., SAKAZAKI R. (1970)** Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusk, J Bacteriol 103, 271- 272 pp.
- **VOLETY, A., McCARTHY, S.A., TALL, B.D., CURTIS, S.K., FISHER, W.S., GENTHNER, F.J., (2001)** Responses of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes to environmental and clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus* . Aquat. Microb. Ecol., 25, 11-20 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- **VORA, G.J., MEADOR, C.E., BIRD, M.M., BOPP, C.A., ANDREADIS, J.D., STENGER, D.A., (2005)** Microarray- based detection of genetic heterogeneity antimicrobial resistance and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp., Center ofr Bio/Molecular Science and Engineering, Naval Research Lab., Washington- USA, 6 p.
- **VURAL, A., ERKAN, M.E., (2006)** Diyarbakır kentindeki Dicle nehri balıklarında mikrobiyolojik kalite parametreleri, Dicle Tıp Dergisi, 2006, cilt:33, sayı:3, 153-156 pp.
- **WALNE, P.R., (1958)** The importance f bacteria in laboratory experiments on raring the larvae of *Ostrea edulis*, Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom 37, 415- 425 pp.
- **WONG, H.C., LIU, S.H., KU, L.W., LEE, L.Y., WANG, Y.S., LEE, C.L., KUO, L., SHIH, D.Y.C., (2000)** Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from fodborne illness outbreak during 1992 through 1995 in Taiwan, J. Food Protection , 63, 900- 906 pp.
- **WONG, H.C., CHEN, M.C., LIN, S.H., LIN, D.P., (1999)** Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries, İnt. J. Food Microbiol., 52, 181-188 pp.
- **WRIGHT, R.T., COFFIN, R.B., PERSING, C., PEARSON, D., (1982)** Field and lab. measurements of bivalve filtration of natural marine bacterioplankton, Limnol, Oceanogr. 27, pp: 91-98
- **WRIGHT, A.C., HILL, R.T., JOHNSON, J.A., ROGHMAN, M.C., COLWELL, R.R., MORRIS, Jr., (1996)** Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. Appl. Environ. Microbiol. 62, 717- 724 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- **WUDDHAKUL, V., CHOWDHURY, A., LAOHAPRERTTHISAN, V., PUNGRASAMEE, P., PATARARUNGRONG, N., THIANMONTRI, P., ISHIBASHI, M., MATSUMOTO, C., NISHBUCHI, M., (2000)** Isolation of pandemik O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand, Appl. Environ. Microbiol., 66, 2685- 2689 pp.
- **YEUNG, P.S.M., BOOR, K.J., (2004)** Epidemiology pathogenesis and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections during 1992 through 1995 in Taiwan, J. Food protect., 63, 900-906 pp.
- **YILMAZ, İ., BİLGİN., ÖKTEM, B., (2003)** Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* and *Venus gallina* harvested from the Marmara sea, Turk J. Vet. Anim Sci. 29 (2005), 409-415 pp.
- **ZHANG, X.H., AUSTIN, B., (2005)** Haemolysin in *Vibrio* species, J. App. Microbiol., 98, 1011-1019 pp.

## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Manisa ili Gördes ilçesi Çiçekli kasabasında doğdum. 1995 yılında Konya Veteriner Sağlık Meslek Lisesinden mezun oldum. 1996 yılında Iğdır Tarım il Müdürlüğü'nde veteriner sağlık teknisyeni olarak Tarım bakanlığı'nda göreve başladım.

1997 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazanarak yüksek öğrenime başladım. 2002 yılında Veteriner Fakültesinden mezun oldum. Aynı yıl Bakanlıkta Veteriner Hekim olarak kadro değişikliğimi gerçekleştirdim. 2005 yılında Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne atandım. Halen aynı kurumda Veteriner Hekim olarak görevime devam etmekteyim.