**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ (VETERİNER)**

**DOKTORA PROGRAMI**

**DR-2023-0008**

**KARİDESLERDEN *VİBRİO PARAHAEMOLYTİCUS*’UN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU**

**MELTEM ÇALIŞKAN**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Dr. Öğr. Üyesi Sadık BÜYÜKYÖRÜK**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-19004 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2023**

**TEŞEKKÜR**

Tezimin hazırlanmasında başından sonuna kadar yanımda olan danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sadık BÜYÜKYÖRÜK’e, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim tüm Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve tezimin mikrobiyoloji aşamasında yardımcı olan kürsümüz yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, Real-Time PCR çalışmalarımdaki destekleri için başta Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ, Prof. Dr. Hasan EREN, Prof. Dr. Serkan BAKIRCI, Dr. Öğr. Üyesi Metin PEKAĞIRBAŞ ve diğer Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üye ve yardımcılarına, Aydın İli balıkçılarına ve Kuşadası Balık Hali esnafına ve son olarak balıkçılardan numune toplama, laboratuvara taşıma aşamasındaki maddi manevi destekleri için anneme çok teşekkür ederim.

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim annem ve acı tatlı birçok anı paylaştığımız başta Dr. Öğr. Üyesi Pelin KOÇAK KIZANLIK, Dr. Öğr. Üyesi Cemil ŞAHİNER, Dr. Öğr. Üyesi Sadık BÜYÜKYÖRÜK olmak üzere tüm Besin Hijyeni Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine minnettarım. Yılmadan, yorulmadan, sabrederek tezimi bitirdiğim için kendimi kutluyorum.

**İÇİNDEKİLER**

KABUL VE ONAY i

TEŞEKKÜR ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ vi

ŞEKİLLER DİZİNİ ..ix

RESİMLER DİZİNİ x

TABLOLAR DİZİNİ xi

ÖZET xii

ABSTRACT…………………………………………………………………………………xiii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. *Vibrionaceae* Familyası 3

2.2. *Vibrio* 3

2.3. *Vibrio parahaemolyticus* 4

2.3.1. *V. parahaemolyticus*’un VBNC (Viable But Not-Culturable- Görülebilir Fakat Kültüre edilemeyen) Formu 6

2.4. *Vibrio parahaemolyticus* Epidemiyolojisi 8

2.4.1. Küresel Isınmanın *V. parahaemolyticus* ile İlişkisi 13

2.5. Virulans Faktörleri 16

2.5.1. *toxR* 17

2.5.2. Isıya Dirençli Direkt Hemolizin (Thermostable Direct Hemolysin, TDH) 17

2.5.3. TDH İlişkili Hemolizin (TDH Related Hemolysin, TRH) 18

2.5.4. Termolabilhemolizin (Thermolabilehemolysin, TLH) 19

2.5.5. Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS) 19

2.5.6. Tip VI Sekresyon Sistemi (T6SS) …………………………………………………… 21

2.5.7. Adezyon Faktörleri…………………………………………………………………… 21

2.5.8. Demir Alım Sistemi…………………………………………………………………... 21

2.5.9. Lipopolisakkarit Yapı………………………………………………………………… 22

2.6. Kanagawa Feromonu 22

2.7.Su Ürünlerinde *Vibrio* spp. 23

2.7.1. Karideslerde Vibriosis Hastalığının Yayılımı 24

2.8. Türkiye’deki Su Ürünleri Arasında Karidesin Yeri 25

2.9. Halk Sağlığı Açısından *Vibrio parahaemolyticus*’un Önemi 25

2.9.1. Su Ürünlerinde *V. parahaemolyticus*’a Karşı Alınabilecek Önlemler 29

2.9.2. Karideslerde *Vibrio parahaemolyticus* 32

2.9.3. Su Ürünleri EndüstrisindeAntibiyotiklerin Bilinçsiz Kullanımı Sonucu Antimikrobiyal Direnç ve Halk Sağlığına Etkileri 33

2.9.3.1. *Vibrio* spp. İçin Antimikrobiyal Dirençlilik 34

2.10. *Vibrio* Türlerinde Kullanılan İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri 35

2.10.1. Kültüre Bağlı Yöntemler (Geleneksel-Klasik Metot) 35

2.10.2. Kültürel Olmayan İzolasyon ve İdentifikasyon 38

2.10.2.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time Polymerase Chain Reaction –PCR-PZR) Yöntemi ile İzolasyon ve İdentifikasyon 41

3. GEREÇ VE YÖNTEM 44

3.1. Gereç 44

3.1.1. Numunelerin Temini 44

3.1.2. İzolasyon ve İdentifikasyon Besiyerleri………………………………………………. 44

3.1.3. DNA Ekstraksiyon Kiti……………………………………………………………….. 45

3.1.4. Primerler………………………………………………………………………………. 45

3.1.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri…………………………………………………………45

3.1.6. Kullanılan Cihazlar……………………………………………………………………. 45

3.1.6.1. Stomacher Cihazı…………………………………………………………………… 45

3.1.6.2. Vortex………………………………………………………………………………. 45

3.1.6.3. Block Heater Cihazı………………………………………………………………… 46

3.1.6.4. Santrifüj Cihazı………………………………………………………………………46

3.1.6.5. TaqMan Real-Time PCR Cihazı……………………………………………………. 46

3.2. Yöntem…………………………………………………………………………………...46

3.2.1. *Vibrio parahaemolyticus’*un Fenotipik İdentifikasyonu 46

3.2.1.1. *Vibrio parahaemolyticus* Suşlarının Canlandırılması 47

3.2.2. *Vibrio parahaemolyticus*’un Genotipik İdentifikasyonu…………………………....... 48

3.2.2.1. DNA Ekstrasyonu 48

3.2.2.2. PCR Mastermiks Hazırlanması 48

3.2.2.3. Real-Time PCR Uygulaması 48

3.2.3. Antibiyogram Uygulaması 49

4. BULGULAR 52

4.1. Klasik Kültürel Yöntem Sonuçları 52

4.2. Real-Time PCR Sonuçları 54

4.3.Antibiyogram Sonuçları 55

5. TARTIŞMA 58

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 67

KAYNAKLAR 69

BİLİMSEL ETİK BEYANI 91

ÖZ GEÇMİŞ 92

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

**°C :** Santigrat Derece

**µl :** Mikrolitre**µg :** Mikrogram

**AHPND:** Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (Akut Hepatopankreatik Nekrozis Hastalığı)

**AMD:** Antimikrobiyal Direnç

**APW:** Alkaline Peptone Water (Alkali Peptonlu Su)

**CDC :**The Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Engelleme Merkezi)

**CLSI :** Clinical and Laboratory Standards Institude (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)

**Cl-:** Klor

**CO2 :** Karbondioksit

**COVIS:** Cholera and Other *Vibrio* Illness Surveillance (Kolera ve Diğer *Vibrio* Hastalık Sürveyansı)

**ctx *:*** *Cholerae toksin*

**ÇAD:** Çoklu Antibiyotik Dirençliliği

**EMS:** Early Mortality Syndrome (Erken Ölüm Sendromu)

**DNA :** Deoksiribo Nükleik Asit

**ENSO:** El Nino Southern Oscillation (El Nino Güney Salınımı)

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler'in Gıda ve Tarım Örgütü)

**FDA:** U.S. Food and Drug Administration (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi)

**FoodNet:** Foodborne Diseases Active Surveillance Network (Gıda Kaynaklı Hastalıklar Aktif Sürveyans Ağı)

**g:** Gram

**ICMSF:** The International Comission on Microbiological Specifications for Foods (Uluslararası Gıda Mikrobiyolojik Spesifikasyonları Komisyonu)

**IPCC:** The Intergovernmental Panel on Climate Change (İklim Değişikliği Hükümetlerarası Paneli)

**kGy:** Kilogray

**kob/g:** Koloni Oluşturan Birim/ gram

**KP:** Kanagawa Pheromone (Kanagawa Feromonu)

**MGM:** Meteroloji Genel Müdürlüğü

**MHLW :** Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (Japonya Sağlık, Çalışma ve Refah Bakanlığı)

**MHLW:** Ministry of Health, Labour and Welfare (Sağlık, Çalışma ve Refah Bakanlığı-Japonya)

**ml:** Mililitre

**mM :** Milimol

**MPa:** Megapascal

**MPN:** Most Probable Number (En Muhtemel Sayı)

**mV:** Megavolt

**NaCl :** Sodyum Klorür

**NaClO:** Sodyum hipoklorit

**NAO:** The North Atlantic Oscillation (Kuzey Atlantik Salınımı)

**NARMS:** National Antimicrobial Resistance Monitoring System (Ulusal Antimikrobiyal Dirençliliği İzleme Sistemi)

**NSSP:** National Syndromic Surveillance Program (Ulusal Sendromik Gözetim Programı)

**PCR :** Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

**pH :** Power of Hydrogen (Potansiyel Hidrojen)

**PMA:** Propidium Monoazide

**ppm:** Part Per Million (Milyonda Bir)

**ppt:** Part Per Thousand (Binde Bir)

**qPCR:** Quantitative Polimerase Chain Reaction (Nicel Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

**rRNA:** Ribozomal Ribonükleikasit

**SPB :** Salt Polymyxin Broth (Tuzlu Polimiksin Broth)

**T3SS :** Tip III Sekresyon Sistemi

**TCBS :** Thiosulfate citrate bile-salts sucrose (Tiyosülfat sitrat safra tuzları sükroz)

**TDH :** Thermostable Direct Hemolysin (Isıya Dirençli Direkt Hemolizin)

**TLH :** Thermolabilehemolysin (Termolabilhemolizin)

**TRH :** TDH Related Hemolysin (TDH İlişkili Hemolizin)

**TSB:** Tripton Soya Broth

**TÜİK:** Türkiye İstatistik Kurumu

**UNG:** Uracil *N*-glycosylase (Urasil *N*-glikozilaz)

**VBNC :** Viable But Not-Culturable (Görülebilir Fakat Kültüre Edilemeyen)

**WHO :** World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

**Şekil 1.** Aylık Ortalama Deniz Suyu Sıcaklık Verisinin 1970-2021 Yılları Arasında Dağılımı ve Eğilimi 12

**RESİMLER DİZİNİ**

**Resim 1.** TCBS agarda şüpheli ve şüpheli olmayan koloniler 52

**Resim 2.** Nutrient brothda pozitif ve negatif örnekler 53

**Resim 3.** Nutrient agarda kolonilerin görünümü 53

**Resim 4.** Real-Time PCR siklusu 54

**Resim 5.** Real-Time PCR sonuçlarına göre, pozitif kontrol, negatif kontrol ve pozitif örneklere ait amplifikasyon görüntüsü 55

**Resim 6.** Real-time PCR’dapozitif kontrollere ait amplifikasyon görüntüsü 55

**Resim 7.** Disk difuzyon yöntemi ile izolatlara ait antibiyotik dirençlilikleri 57

**TABLOLAR DİZİNİ**

**Tablo 1.** Su ürünleri tüketimine bağlı enfeksiyonlarda *V. parahaemolyticus* risk faktörleri 11

**Tablo 2.** 1970-2021 yılları arasında aylara göre ortalama Ege Denizi deniz suyu sıcaklık ortalaması 13

**Tablo 3.** Çeşitli bakterilerin CV agar ve TCBS agarda koloni morfolojileri 38

**Tablo 4.**  *V. parahaemolyticus*’un klasik kültürel yöntemle izolasyonunda kullanılan besiyerleri……………………………………………………………………………………. 44

**Tablo 5.** CLSI disk difüzyon standart zon çapı değerleri 51

**Tablo 6.** Real-Time PCR ile*Vibrio* *parahaemolyticus* olarak onaylanmış izolatların antibiyotik dirençlilikleri 56

**ÖZET**

**KARİDESLERDEN *VİBRİO PARAHAEMOLYTİCUS*’UN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU**

**Çalışkan M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Programı Doktora Tezi, Aydın, 2023.**

**Amaç:** Bu çalışma, Aydın İli ve Kuşadası balık halindeki balıkçılardan temin edilen karideslerden *Vibrio* *parahaemolyticus* varlığının belirlenmesi ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının ortaya koyulması amacıyla yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırma materyalini 2019 yılı Kasım-Aralık aylarında Aydın İli ve Kuşadası balık halinden toplanan 90 adet taze karides örneği oluşturmuştur. Karides örneklerinden geleneksel ve moleküler yöntemlerle *V. parahaemolyticus* izolasyonu yapılmış ve izolatların antibiyotiklere karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır.

**Bulgular:** Karides örneklerinden (n=90) geleneksel yöntemle TCBS agarda 40 (%44,4) izolat *V. parahaemolyticus* şüpheli pozitif sonuç vermiştir. *V. parahaemolyticus* şüpheli 40 izolattan 11’i (%27,5) ise Real-Time PCR ile *V. parahaemolyticus* pozitif sonuç vermiştir. Pozitif sonuç veren 11 izolata disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi uygulanmıştır. *V. parahaemolyticus* izolatlarının tamamı penisilin G (10 ünite) ve klindamisine (2 µg) %100 oranında dirençli bulunmuştur, diğer yandan piperasilin (100 µg), siprofloksasin (5 µg) ve gentamisine (10 µg) %90,9 oranında duyarlı bulunmuştur.

**Sonuç:** Bu araştırma ile halk sağlığı açısından risk oluşturan *V. parahaemolyticus’*un karideslerden kış aylarında bile yüksek oranda izole edilebildiği ve *V. parahaemolyticus* izolatlarının bazı antibiyotiklere karşı duyarlılığı ortaya koyulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyotik dirençlilik, Halk sağlığı, İdentifikasyon, Karides, *Vibrio parahaemolyticus*

**ABSTRACT**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* FROM SHRIMPS**

**Caliskan M. Aydin Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Department of Food Hygiene and Technology, Doctorate Thesis, Aydın, 2023.**

**Objective:** This study aimed to determine the presence of *Vibrio parahaemolyticus* from shrimps obtained from fishermen in Aydın province and fish market in Kuşadası and to reveal their sensitivity to antibiotics.

**Material and Methods:** The study materials were 90 fresh shrimp samples which collected from fishermen in Aydın province and fish market in Kuşadası between November 2019 and December 2019. *V. parahaemolyticus* isolation was performed by using conventional and molecular methods from shrimps and the sensitivity of the isolates to antibiotics was investigated by disc diffusion method.

**Results:** From shrimp samples (n=90), 40 (44.4%) isolates on TCBS agar by conventional method gave *V. parahaemolyticus* suspicious positive results. Of the 40 suspected *V. parahaemolyticus* isolates, 11 (27.5%) gave *V. parahaemolyticus* positive results by Real-Time PCR. Antibiotic susceptibility test was applied to 11 isolates with positive results by disc diffusion method. All *V. parahaemolyticus* isolates were 100% resistant to penicillin G (10 unit) and clindamycin (2 µg), on the other hand, all *V. parahaemolyticus* isolates were 90,9% sensitive to piperacillin (100 µg), ciprofloxacin (5 µg) and gentamicin (10 µg).

**Conclusion:** With this research, it was revealed that *V. parahaemolyticus*, which poses a risk to public health, can be isolated from shrimps at a high rate even in winter, and the sensitivity of *V. parahaemolyticus* isolates to some antibiotics.

**Key Words:** Antibiotic resistance, Identification, Public health, Shrimp, *Vibrio parahaemolyticus*

**1. GİRİŞ**

Deniz ürünleri hayvanlar aleminin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Deniz ürünleri bir insanın sağlıklı olması için gereken besin değeri yüksek içeriğe sahiptir. Buna rağmen deniz ürünleri tüketimine bağlı zehirlenmeler oluşabilmektedir; bunların en büyük sebebi deniz yüzeyinden doğal yollarla gıda kaynaklı patojenlerle kontamine olmuş çiğ ya da az pişmiş deniz ürünlerinin tüketilmesidir (Bilung ve diğerleri, 2015). Bakteriler; toprak, hava, su, hayvan ve bitki yüzeylerinde bulunurlar. Bazıları hastalık etkeni olmakla beraber çoğu zararsız ve organik atıkların geri dönüşümü sırasındaki yararlı etkileri ve birçok faydalı ürünü üretmeleri nedeniyle biyoteknolojide oldukça önemli bir yere sahiptirler. Balıkların dışında yaygın olarak tüketilen su ürünleri kabuklu ve yumuşakçalar olmak üzere iki grup altında toplanır. Istakoz, karides, yengeç ve kerevit kabuklular sınıfında midye, istiridye, mürekkep balığı ve tarak ise yumuşakçalar içerisinde incelenir (Baron ve diğerleri, 2016). Karides, bileşiminde bulunan protein, yağ, karbonhidrat ve çeşitli vitaminler nedeniyle değerli bir besindir. Karidesler suyu süzerek beslenmelerinden dolayı sudaki toksik maddeleri (ağır metaller, hidrokarbonlar vs.) ve mikrobiyal kirliliği içine alır (Mizan ve diğerleri, 2017). Özellikle yetiştikleri bölgelerde kanalizasyon veya çöp bağlantısı varsa, bu bölgelerden toplanan karideslerin tüketilmesi sağlık açısından önemli bir risk taşımaktadır.

*Vibrio* cinsi; virgül veya kıvrık şekilli, Gram negatif, kamçılı, endospor oluşturmayan, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur. Vejetatif formlar, tek başına veya koloni şeklinde görülürler (Baron ve diğerleri, 2016). Bu cinsin hücre büyüklüğü yaklaşık 1-4 μ boyunda ve 0,3-0,6 μ enindedir. Genellikle 22°C ile 40°C arası ideal üreme sıcaklıklarıdır. Bu cinsin üyeleri, karbon ve azot kaynağı olarak mineral tuzları ve asparajin içeren besi-yerlerinde gelişme gösterirler (Mizan ve diğerleri, 2017). *Vibrio* türlerinin spor ve kapsülü olmadığından yeryüzünde farklı çevrelerde dağılış gösterememektedirler. *Vibrio* cinsinin asıl habitatı tatlı su, tuzlu su ve bu sularda yaşayan canlılardır (Garrido-Maestu ve diğerleri, 2017). *Vibrio* türleri neredeyse tüm antimikrobiyal ilaçlara karşı yüksek duyarlılığa sahip olarak nitelendirilmişlerdir. Son on yıldır; insan, tarım alanı ve su ürünleri yetiştiriciliği aracılığıyla antimikrobiyallerin aşırı kullanılmasından dolayı çoğu bakteri cinsinde antibiyotik dirençliliği ortaya çıkmış ve zamanla değişim göstermiştir (Xu ve diğerleri, 2017). Bu bakteri türleri, insanlarda ve hayvanlarda zorunlu patojen veya fırsatçı enfeksiyon etkenidirler (Cecchini ve diğerleri, 2016). Bulaş olmuş içme suyu ve gıdalarla bulaşan ve şiddetli diyarenin etkeni olan *Vibrio cholerae*’da bu grubun üyesidir. Ayrıca *V. parahaemolyticus* ve *V. fluvialis*, akut gastroenteritin sebepleridir. Bunların dışında, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, ve *V. damsela*; yara enfeksiyonları, septisemi, menenjit gibi ekstraintestinal enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. Yapılan araştırmalar, *Vibrio* spp. ile meydana gelen yara enfeksiyonlarının sebebinin, hastaların tuzlu ve hafif tuzlu su ile temas ettiğinde oluştuğunu göstermiştir (Singh ve Barnard, 2016). İnsanlarda genellikle barsak hastalığı bulaşı; su, kabuklu deniz hayvanları veya diğer deniz ürünlerinin tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (Kang ve diğerleri, 2017; Li ve diğerleri, 2016).

Bu çalışmada, karides örneklerinden, *Vibrio parahaemolyticus*’un izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler olarak karakterizasyonu, antibiyotik dirençliliklerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

**2. GENEL BİLGİLER**

* 1. ***Vibrionaceae* Familyası**

*Vibrionaceae* ailesi içinde *Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas* ve *Photobacterium* cinsleri bulunmaktadır (Atlas, 1997; Drake ve diğerleri, 2007).

* 1. ***Vibrio***

*Vibrio* cinsi 60’dan fazla türü içermektedir. 60’dan fazla *Vibrio* ve *Vibrio* benzeri türlerin sadece bir bölümü bakteriyal gastroenteritisle ilişkilendirilir; iki ana tür *V. cholerae, V. parahaemolyticus* ve daha az ilişkilendirilenler fakat yine de kaygılandıran türler *V.mimicus, V. fluvialis, V. vulnificus* ve *G. hollisae*’dir (Humphries ve Linscott, 2015).

*Vibrio* cinsinin üyesi bakteriler düz ya da kıvrık, Gram negatif, spor oluşturmayan çubuk formunda, 0,5’ten 0,8 μm eninde ve 1,4’ten 2,6 μm uzunluğundadır, tek polar flagellumu sayesinde hareketli, aerobik ya da fakültatif anaerobik, çoğu türü oksidaz ve katalaz üretir ve gaz üretmeden glikozu fermente edebilmektedir (McLaughlin, 1995).

*Vibrio* cinsi bakteriler içinde akuatik ortamda geniş yayılım gösteren ve deniz sularında, deniz canlıları, deniz bitkilerinde ve nehir ağızlarında kendiliğinden ortamda bulunan (otokton) bir bakteridir (Nishibuchi ve Kaper,1995; Eschbach ve diğerleri, 2017). Çalışmalar *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas aeroginosa*, *Aeromonas hydrophila* ve *Staphylococcus aureus* gibi birçok mikroorganizmanın deniz suyunun ekolojik nişinde bulunduğunu göstermiştir (Baker-Austin ve diğerleri, 2018). *Vibrio* cinsi içinde 60’ın üzerinde bakteri türü bulunmaktadır, bunlardan 12’si insanlar için patojeniktir; *V. cholerae, V. mimicus, V. fluvialis, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. cincinnatiensis, V. hollisae, V. vulnificus, V. furnissii, V. damsela, V. metshnikovii* ve *V. carchariae*’dir. Tüm patojenik vibriolar gıda kaynaklı hastalıklar olarak rapor edilmiştir, fakat bu bakteriler arasında *V. cholerae* O1, *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* en kayda değer ajanlardandır (Atlas, 1997; Solomakos ve diğerleri, 2012). Diğer gıda kaynaklı patojenlerin aksine, *Vibrio* spp. doğal yaşam alanı tuzlu sular ve nehir ağzı ekosistemlerinde optimal tuzluluk ve sıcaklık koşullarında su canlılarında yüksek miktarda görülmüştür (Bilung ve diğerleri, 2015; Espineira ve diğerleri, 2010). *V. anguillarum* ve *V. tapetis* gibi türler su canlıları için patojenikken *V. cholerae* gibi türler sadece insanlar için patojeniktir, *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* ise hem insanlar hem de su canlıları için patojeniktir (Doğruer ve Telli, 2020).

*Vibrio cholerae, V. vulnificus* ve *V. parahaemolyticus* dışında kalan türler; *Grimontia (Vibrio) hollisae, Photobacterium (Vibrio) damselae subsp. damselae, V. alginolyticus, V. fluvialis, V. furnissii, V. harveyi (V. carchariae), V. metschnikovii ve V. mimicus* düşük risk grubunda yer almakta ve nadir olarak insanda gastroenteritis, yara enfeksiyonu oluşturmaktadır (Austin, 2010).

*Vibrio* türü içinde yer alan *V. cholerae* kontamine sular aracılığıyla ve insandan insana temasla bulaşan, tedavi edilmezse hızlıca ölüme götüren şiddetli ishalle seyreden koleraya sebep olur. Kolera olmayan *Vibrio* spp. (Örneğin; *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* ve *Vibrio vulnificus*) deniz suyu vasıtasıyla veya çiğ ya da az pişmiş kontamine deniz ürünlerinin tüketilmesi ishal gibi çeşitli klinik belirtilere sebep olan Vibriosise sebep olur.

* 1. ***Vibrio parahaemolyticus***

Japonya’da 1950’de yerel bir deniz ürünü olan Shirasu tüketimine bağlı olarak ortaya çıkan geniş çaplı salgın sonucu ilk olarak bu bakteri tanımlanmış ve *Pasteurella parahemolytica* olarak isimlendirilmiştir (Fujino ve diğerleri, 1953). İlerleyen yıllarda bu bakteri *Vibrio parahaemolyticus* olarak isimlendirilmiştir (Hugh ve Sakazaki, 1975).

*V. parahaemolyticus* Gram negatif, halofilik, oda sıcaklığında hızla çoğalabilen gıda kaynaklı patojen bir bakteridir. Optimal koşullar altında bakterinin generasyon süresi 10 dakika gibi kısa süreye düşmektedir (Twedt ve Novelli, 1971). Sıcak iklimlerde deniz ve nehir ağızlarında ve sıklıkla çiğ ya da az pişmiş deniz ürünlerinde gelişim göstermektedir. Dünya genelinde gıda kaynaklı gastroenteritisin deniz ürünleri tüketimine bağlı en büyük sebebini oluşturmaktadır. *V. parahaemolyticus* her yerde var olan, fakat yaşaması çevre sıcaklığına bağlı bir bakteridir (Ma ve diğerleri, 2015). Kış aylarında bakteriye az rastlanılır ve genellikle dip tortusu örneklerinden izole edilmektedir (Kaneko ve Colwell, 1973; Whitaker ve diğerleri, 2010). Deneysel çalışmalar sıcaklığın diğer çevre koşulları arasında *V. parahaemolyticus*’un hayatta kalma ve gelişme hızını büyük ölçüde etkilediğini göstermektedir. Patojenin hayatta kalma ve gelişme hızını aynı zamanda pH ve tuzluluk oranı da etkilemektedir. Genellikle *V. parahaemolyticus* üremek için 7,9’dan 8,6’a kadar alkali pH değerlerini ve % 3 oranında tuzluluk oranını tercih etmektedir (Beuchat, 1975). Birçok çalışma bakterinin 15 oC üzerindeki sıcaklıkları tercih ettiğini, optimum üreme ısısının olarak 35-37 oC olduğunu ve bakterinin 10 oC’nin altında öldüğünü ya da inaktif hale geçtiğini raporlamıştır (Fernandez-Piquer ve diğerleri, 2011; Kim ve diğerleri, 2012; Ndraha ve diğerleri, 2020; Tang ve diğerleri, 2015; Yang ve diğerleri, 2009; Yoon ve diğerleri, 2008). Çalışmalar sıcaklık değerlerinin patojenik bakterinin virulens genlerini etkilediğini ortaya çıkarmıştır. Etken, okyanus sıcaklığının artmasına bağlı olarak, Alaska’nın güney kıyı şeridinde olduğu gibi kuzey şeridinde de tespit edilmiştir. Değişen çevre şartları altında *V. parahaemolyticus*’un gen ekspresyonu değişebilmekte ve bakterinin yaşamasına izin vermekte, normal hücresel fonksiyonlarını sağlamakta ve yeni durumuna uyum sağlamaktadır (Ma ve diğerleri, 2015). Bunların yanında sıcaklığın aşırı artması (> 45 oC) patojenin ölüm oranını arttırmaktadır (Fernandez-Piquer ve diğerleri, 2011; Kim ve diğerleri, 2012; Yoon ve diğerleri, 2008).

*V. cholerae, V. parahaemolyticus* ile yakından ilişkili bir patojendir. ToxRS (*toxRS* tarafından kodlanır), transmembran proteinleri *ToxR* ve *ToxS* iletim sistemiyle birleşerek asit stres cevabı oluşturmaktadır. *V. cholerae*’da *ToxR* çevre şartlarına göre değişen ve en az 60 gen ile düzenlemeyi sağlayan birçok virulens faktörü ve dış membran proteini içeren transkripsiyonel aktivatördür. *toxR* ve *toxS* genleri sırasıyla % 51 ve % 65 oranında aminoasit yapılarında *V. parahaemolyticus* ve *V. cholerae* arasında benzerlik göstermektedir (Whitaker ve diğerleri, 2010).

*V. parahaemolyticus* doğada kısmen halofiliktir ve gelişmesi için minimum 0,086 M (%0,5) NaCl gereklidir (Palasuntheram, 1981). *V. parahaemolyticus* %10,5 NaCl oranına kadar gelişebilmektedir, en iyi %3 NaCl içeren nötral besi yerinde gelişmektedir (Naughton ve diğerleri, 2009; Whitaker ve diğerleri, 2010). *V. parahaemolyticus*’un 1,5 M NaCl ve daha üstü tuz oranı içeren besi yerlerinde yaşayabildiği gözlemlenmiştir, bu da *V. parahaemolyticus*’un *V. cholerae, V. vulnificus, V. fischeri* gibi benzer koşullarda yaşayan diğer *Vibrio* türlerine göre daha ozmotolerant olduğunu göstermektedir (Naughton ve diğerleri, 2009). *V. parahaemolyticus* inorganik asit–pH özelliğiyle, midedeki asidik ortama, bağırsaklarda bulunan organik asitlere ve tuzluluk oranının düşmesine (bağırsaklardaki tuzluluk oranı ortalama 300 mM NaCl civarındadır) direnç gösterebilmektedir. Organik asitler hücre zarını geçerek sitoplazmaya girebilirken inorganik asitler hücre zarı dışında kalmaktadırlar. Sitoplazmik pH düşmesi ve asitlerden kaynaklanan anyon sayısının artışıyla turgor basıncının artmasıyla hücrede öncelikle organik asitler bağını koparmaktadır (Foster, 1999). *V. parahaemolyticus*’un asit tolerasında büyük rol oynayan lizin dekarboksilaz *cadA* geni (VP2890) tarafından kodlanmakta, bu enzim de aminoasit lizinden CO2’yi uzaklaştırmaktadır (Tanaka ve diğerleri, 2008). Whitaker ve diğerlerinin (2010) yaptıkları çalışmada farklı tuz oranı içeren besi yerlerinde *V. parahaemolyticus*’un yaşam koşulları değerlendirilmiştir; %3 NaCl içeren besi yerinde organizmanın düşük organik ve inorganik pH’a ve düşük/yüksek sıcaklığa karşı korunduğu, fakat %1 NaCl içeren besi yerinde ek stres koşullarına karşı korunamadığı, bunun bakteri üzerinde stres koşulu oluşturduğu görülmüştür. *V. parahaemolyticus*’un yüksek tuz konsantrasyonunda letal düzeyde asit stresi altında hayatta kalması üzerine yapılan çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonunun kısa periyotta bakterinin önemli ölçüde arttığı ve bu artışın tam anlamıyla lizin dekarboksilaz sistemine bağlı olmadığı görülmüştür (Whitaker ve diğerleri, 2010). Diğer *Vibrio* türleri incelendiğinde daha az ozmotoleransı olan *V. cholerae* ve *V. vulnificus*’un da yüksek tuz ortamı ile adaptasyonu sağlandığında letal asit koşullarında yaşayabildikleri gözlemlenmiştir. Fakat bu adaptasyon *V. parahaemolyticus*’un yüksek tuz ortamına adapte olması kadar belirgin değildir. Sıcaklık stresi gıda kaynaklı patojenlerde en etkili stres kaynaklarından biridir. Yüksek tuz konsantrasyonuna bakterinin adaptasyonu sıcaklık stresine karşı çapraz koruma oluşturmaktadır; dondurulan su ürünlerinde patojenin hayatta kalabilmesini sağladığı gözlemlenmiştir (-20 oC’de 24 saat), bunun aksine 20 dakikadan fazla yüksek sıcaklığa (50 oC) maruz kalan su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* oranının azaldığı görülmüştür (Kalburge ve diğerleri, 2014). Bu patojen sıcak denizleri sevmektedir, 13-15 oC deniz sıcaklığında nadiren izole edilmiştir (Kaneko ve Colwell, 1975).

*Vibrio parahaemolyticus* kapsül üreten halofilik bir bakteridir (Praja ve Safnurbaiti, 2018). Somatik (O) ve Kapsüler (K) antijenleri bulunmaktadır, *V. parahaemolyticus* 13 O-serogrubu ve 71 K-serogrubu olarak sınıflandırılmıştır. Serotiplendirme epidemiyolojik çalışmalarda izolatların tanımlanmasında geniş yer bulmaktadır (Xu ve ark, 2016). *V. parahaemolyticus* piyasada satılan antiserumlar ile serotiplendirilerek birbirinden ayırt edilebilmektedir. Tüm *V. parahaemolyticus* suşları ortak antijen (flagellar) taşımaktadırlar (Bisha ve diğerleri, 2012).

**2.3.1. *V. parahaemolyticus*’un VBNC (Viable But Not-Culturable- Görülebilir Fakat Kültüre edilemeyen) Formu**

Doğal sucul ortamda *Vibrio* spp*., Salmonella* spp*., Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Shigella dysenteriae, Pasteurella piscicida, Pseudomonas fluorescens, Aeromonas salmonicida, Helicobacter pylori* gibi birçok Gram negatif bakteri ve *Enterococcus faecalis, Streptococcus pyogenes* gibi bazı Gram pozitif bakteriler olumsuz koşullar altında kültüre edilemeyen hale gelmektedirler (Gauthier, 2000). Bakterinin canlı, metabolik aktivitesini sürdüren, fakat üreyemeyen bir duruma (VBNC) geçtiğini yansıttığı düşünülmektedir. VBNC formu ilk olarak Xu ve diğerleri (1982) tarafından ortaya atılmıştır. Bu fizyolojik form bakteri hücrelerinin besi yerinde laboratuvar koşullarında normal destekleme ile üreyememesidir. Bu bakterilerin tespiti için birçok metot geliştirilmiştir. Örneğin; direkt bakteri sayımı metodu (Kogure ve diğerleri, 1979); bu bakterilerin besin ve nalidiksik asit varlığında üreme yeteneğini koruyup korumadığını belirler.

*V. parahaemolyticus* sığ sularda bulunan deniz ürünleri kaynaklı bir patojendir, kusma, ishal, karın ağrısı, ateş ile karakterize gastrointestinal hastalıklara sebep olmaktadır. *V. parahaemolyticus*’un çevreden toplanan numunelerde izolasyonu kışın yaz mevsimine göre daha azdır (Chowdhury ve diğerleri, 1990). *V. parahaemolyticus* hücreleri düşük sıcaklıklara maruz kaldığında VBNC forma geçmektedirler (Mizunoe ve diğerleri, 2000). Özellikle kışın alınan örneklerde patojen klasik metotlarla tespit edilemediğinde ve uygun koşullar altında tekrar üreme kabiliyeti kazanma durumunda halk sağlığı açısından önemli bir risk teşkil etmektedir. VBNC hipotezinin kilit taşı, VBNC hücrelerinin çoğalma özelliklerini geri kazanabilmesidir. Bunun yanında hücrelerin yeniden çoğalma özelliğini kazanıp kazanmadığı uzun zamandır tartışılmaktadır. Birçok çalışma, kültüre edilebilen popülasyonun çoğalabilecek birkaç hücrenin kalması sonucu ortaya çıktığını (Jiang ve Chai, 1996), diğer bir görüş ise VBNC form sonrasında karakteristik kültüre edilemeyen bakterinin çoğalabilir hale dönüşmesidir (Oliver ve diğerleri, 1991). Hipotezler VBNC halinden çoğalabilir hale geçme aşamasını; VBNC formunun içinde bakterinin orijinal inokulumu bulunması ve yeniden canlanarak çoğalmasını bu şekilde sağladığı görülmüştür (Nilsson ve diğerleri, 1991; Whitesides ve Oliver, 1997), ya da bir kısım VBNC bakteri yeniden canlanmayı popülasyonun geri kalanını taklit ederek sağlamaktadırlar (Weichhart ve diğerleri, 1992). Yeniden canlanma Nilson ve diğerleri (1991) tarafından *V. vulnificus* vakasında tüm bakterilerin VBNC formuna dönüşmesi ile bulunmuştur. Bakteri hücre popülasyonu homojen olarak reaksiyon verir, hepsi VBNC forma geçmektedir ve hücre bölünmesi olmadan hücrelerin canlandığı görülmüştür.

Sıcaklık yükselmesinden sonra geri kazanılan bu kültürü yapılabilen hücrelerin, VBNC haline gelen ilk inokulumun tüm hücrelerinin canlanmasından mı yoksa sadece çok az sayıda tespit edilmemiş kültürlenebilir hücrenin çoğalmasından mı kaynaklanıp kaynaklanmadığı tartışmalıdır. VBNC durumu, farklılaşan hücrelerden kaynaklanan spor oluşumu gibi hücrelerin uyarlanabilir bir programlamasını değil, hücre ölümünden önce geçici bir fizyolojik durumu temsil etmektedir. Bazı çalışmalar VBNC hücrelerinin canlanmasının çoğalma olmadan metabolik ve fizyolojik değişimi olan bir süreç olduğunu iddia ederken (Nilsson ve diğerleri, 1991), bazı çalışmalar da VBNC hücrelerin kaldığı yerden tekrar çoğalabildiğini öne sürmüşlerdir (Weichart ve diğerleri, 1992). Toplam VBNC popülasyonunun yalnızca bir bölümünü temsil eden VBNC hücrelerinin (sub-popülasyon) yalnızca bir kısmı, ilk kültüre edilebilen hücre sayısıyla yaklaşık olarak aynı popülasyon büyüklüğüne geri dönerse, bu, metabolik ve fizyolojik süreçlerin basit bir şekilde tersine çevrilmesi sonucuna varılmamalıdır. Hücre bölünmesi veya ex-sporülasyon gibi bir mekanizma, VBNC popülasyonundan kültüre edilebilen bakterilerin ortaya çıkmasında rol oynamaktadır ve tüm VBNC popülasyonunun yeniden canlanması olarak yorumlanmıştır (Nilsson ve diğerleri, 1991; Whitesides ve Oliver, 1997). Bunun yanında Coutard ve diğerleri (2007) yaptıkları çalışmada sıcaklığın 4 oC’ye düşürülmesiyle *V. parahaemolyticus*’un kültüre edilmesinin düştüğü, sıcaklığın yükseltilmesinden sonra VBNC hücrelerinin kültür yapılabilecek hale getirilmesiyle, yalnızca VBNC popülasyonunun nispeten büyük bir hacmi için meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu gözlem, hücre popülasyonunun sadece bir kısmının kültür yapılmasını geri kazanabildiğini veya kültür yapılmasını geri kazanılması için yeterince fazla sayıda VBNC hücresine ihtiyaç duyulduğunu (örneğin sinyal fenomeni) ve hücre popülasyonunda fizyolojik heterojenliğin var olduğunu göstermektedir. Coutard ve diğerlerinin (2007) yaptıkları çalışmanın sonucuna göre, yalnızca VBNC *V. parahaemolyticus*'un bir alt popülasyonunun, sıcaklık değişiminden hemen sonra kültür yapılmasını geri kazanabildiğini göstermektedir. *V. parahaemolyticus* popülasyonunun heterojenliği, hücrelerin adaptatif evrimine katılan DNA'da strese bağlı mutasyonun ortaya çıkmasıyla ilişkiliyse, *E. coli* için olduğu gibi, koruma ve onarım bazı hücrelerin hayatta kalmasına, jenerasyonlarda genetik değişiklik oluşumuna katılabilmektedir (Coutard ve diğerleri, 2007; Matic ve diğerleri, 2004). Kokoid hücre oluşumu mekanizması, *V. parahaemolyticus* ve *Vibrionaceae* familyasının diğer türlerinin sürekli değişen çevresel koşullara adaptasyonunu temsil etmektedir (Coutard ve diğerleri, 2007).

* 1. ***Vibrio parahaemolyticus* Epidemiyolojisi**

*Vibrio parahaemolyticus* dünya çapında başlıca gıda kaynaklı sağlık problemlerine yol açan patojenlerden biridir (Hara-kudo ve ark, 2001). *V. parahaemolyticus* Gram negatif bir bakteridir ve Japonya’da 1950’li yıllarda toplu zehirlenme vakasında ilk defa izole edilmiştir (Praja ve Safnurbaiti, 2018). Amerika ve Asya’da 1960’ların sonu ve 1970’lerin başlarında *V. parahaemolyticus*’un en yaygın hastalıklardan biri olmasıyla beraber, diyarel hastalıkların sebeplerinden biri olduğu fark edildi (WHO, FAO, 2011). *V. parahaemolyticus* enfeksiyonu 1960’lara kadar coğrafik olarak Japonya’yla sınırlıydı fakat, 1969’dan başlayarak çeşitli bölgelerde Atlantik, Pasifik, Körfez Bölgeleri ve Havai gibi Amerika’nın birçok bölgesini de içeren bu enfeksiyon görülmeye başlandı. Amerika’da ilk iyi belgelenmiş *V. parahaemolyticus* salgını 1971 yılında Maryland’de yengeç tüketimine bağlı olarak ortaya çıkmıştır ve hastalardan, şüpheli yemeklerden izole edilen suşlar Japonya’da izole edilen suşlardan farklı serotipte olduğu görülmüştür. 1970’lerden sonra Avrupa, Afrika, Yeni Zelanda ve çoğunlukla Asya ülkelerinde sporadik vakalar ve salgınların rapor edilmesi göstermiştir ki *V. parahaemolyticus* dünya çapında halk sağlığını ilgilendiren ve deniz ürünleri kaynaklı ana patojenlerden biri olmuştur (Baker-Austin ve ark, 2018).

Hindistan’ın Calcutta kentinde 1996 yılında birden ortaya çıkan gastroenteritis vakalarıyla *V. parahaemolyticus* epidemiyolojisi radikal bir değişiklik yaşadı; bu salgında incelenen izolatların tümü önceki salgınlardakinin aksine tek homojen grupta O3:K6 serotip çeşidinde ve *trh* olarak kodlanmış *Tdh*-bağlantılı hemolizin (*trh*) olmayan, aynı virulens özellikte *tdh* olarak kodlanmış thermostable direkt hemolizin (*tdh*) bulunmaktaydı. Moleküler teknikler kullanılarak bu izolatların diğer O3:K6’lardan farklı oldukları anlaşılmıştır ve sadece 1 yıl içerisinde Güneydoğu Asya ülkeleri içinde *V. parahamolyticus* salgınları görülmeye başlanmıştır (Baker-Austin ve ark, 2018). Şili’de %80 oranında ülkenin su ürününü sağlayan Puerto Montt’de 2004 yılında 1500 vaka ve 2005 yılının yaz aylarında 3725 vaka *V. parahaemolyticus* sebepli salgınlara yol açmıştır. 2006’ya kadar tüm raporlanan vakalar serotip O3:K6 ile ilişkilidir, 2005’ten sonra raporlanan vakalarda düşüş yaşanması (2007’de 477 vaka) serotipin O3:K6’dan O3:K59’a değişmesinin sonucudur. 2007 yılında klinik vakaların %40’ı serotip O3:K59 ile ilişkiliyken 2008 yılı yaz ayında raporlanan 1143 klinik vakanın %98’i pandemik O3:K6 serotipinde ve geri kalanlar pandemik olmayan *tdh-* ve *trh-* negatif suşlar sebepli çıkmıştır (FAO ve WHO, 2020).

Bu pandemik suş (Calcutta O3:K6 suşu) 2012 yılına kadar kıtalar arası yayılmada bu türün ilk patojen örneği olmuştur, 2012 yılında yüksek patojenitesi olan ST36 (multilokus sekans tip 36) bağlı olan suş normal endemik bölgesinin dışında Amerika’nın Kuzeybatı-Kuzeydoğu Pasifik kıyılarında ve Kuzeybatı İspanya’da tespit edilmiştir. ST36 klonal tip suşu diğer *V. parahaemolyticus* suşlarına göre virulens potansiyeli daha yüksektir, daha düşük bakteriyel yük ile enfeksiyon yapma yetisine sahiptir. *V. parahaemolyticus* Pasifik Kuzeybatı suşu (ST36 klonal tip) ile gastroentitis görülmesi önemli miktarda artış göstermiş, enfeksiyon dozu 103-104 hücre düzeyinde görülmüştür ki bu daha önceki patojenik *V. parahaemolyticus* suşlarına göre daha düşük bakteri yüküyle enfeksiyon oluşumunu göstermektedir (Baker-Austin ve ark, 2018).

Lopez-Joven ve diğerleri (2015) Ebro Delta Körfezi ve İspanyol Deltası Kıyısından topladıkları yumuşakçalarda (istiridye, midye), örneklerin kaynaklarının patojen yoğunluğunu etkilediğini fark ettiler. Lopez-Joven ve diğerleri (2015) çalışmalarında topladıkları örneklerden Fangar Körfezindeki toplanan örneklerin Alfacs Körfezindeki örneklerden daha fazla *V. parahaemolyticus* varlığı tespit etmişlerdir. İki körfez arasındaki farklılık sıcaklık ve tuzluluk oranının farklı olması sebebiyle ilişkili olduğu (Lopez-Joven ve diğerleri, 2015), sıcaklık ve tuzluluk farklılığının su döngüsü, buharlaşma ve tarlalardan gelen tatlı sularla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Ndraha,2020).

Chen ve diğerleri (2017) Zhejiang bölgesinde çapraz kontaminasyon, uygun olmayan pişirme, uygun olmayan depolama *V. parahaemolyticus* salgınlarına sebep olan ana faktörler olduğu bildirilmiştir. Ndraha (2020), Tablo 1’de su ürünlerinin taşıması ve işlenmesi aşamasında çapraz kontaminasyon ve pişirme yöntemlerini risk faktörleri arasında değerlendirmiştir. Çin’de 2010 ve 2014 yılları arasında salgınların %31’inin su ürünlerinde (ıstakoz, karides, sarıağız balığı, kıllı pavurya, mürekkep balığı, somon balığı) çapraz bulaşma yolu ile olduğu tespit edilmiştir. Jung (2018) Kore’deki pazarda vibriosis bulaşının kaynağını araştırmıştır ve salgının ana kaynağının kimbap ([kurutulmuş deniz yosununun içine pirinç koyularak hazırlanan Kore'ye özgü bir tür dolma](https://tureng.com/tr/turkce-ingilizce/kurutulmu%C5%9F%20deniz%20yosununun%20i%C3%A7ine%20pirin%C3%A7%20koyularak%20haz%C4%B1rlama%20kore'ye%20%C3%B6zg%C3%BC%20bir%20t%C3%BCr%20dolma)) ve mürekkep balığı arasındaki çapraz kontaminasyon olduğu ortaya çıkmıştır. Kimbap ve mürekkep balığının aynı kesme tahtası ve bıçağı kullanılarak hazırlandığı, bu şekilde çapraz kontaminasyonun olduğu ortaya çıkmıştır. Bu bulgular ışığında tamamen pişmiş deniz ürünlerinin bile diğer gıdalarla ya da deniz suyu ile yıkanması sonucu çapraz kontaminasyonla *V. parahaemolyticus* bulaşabilmektedir. Buna ek olarak diğer deniz ürünleri *V. parahaemolyticus*’u taşıyarak kontamine edebilir ya da aynı bıçak, kesme tahtası gibi malzemeler ortak kullanıldığında çapraz kontaminasyonla bulaşma olabilmektedir.

Çalışmalar canlı istiridyede *V. parahaemolyticus*’un 26 oC’de 24 saatte 790 kat arttığı gözlemlenmiştir (Gooch ve diğerleri, 2002). Mudoh ve diğerleri (2014) 20 oC’de 0. günden 10. güne *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunun 3 kat arttığı raporlamışlardır. Bu da soğuk zincirin korunmasının yüksek önem taşıdığını göstermektedir. Soğuk zincir birçok koşuldan etkilenebilmektedir; yeterli soğuk zincir altyapısına sahip olma, iklimatik koşullar ve personelin soğuk zincir bilinciyle eğitilmesi bunlardan birkaçıdır (Accorsi ve diğerleri, 2017; Göransson ve diğerleri, 2018; Ndraha ve diğerleri, 2018). Bu koşulları arttırmak için sıcaklıkların düzenli ölçülmesi, devam edecek şekilde verilerin toplanması ve verilerin saydamlığı gıda güvenliğini arttırmak için gereklidir (Ndrada ve diğerleri, 2018). Bu sebeple zaman-sıcaklık ölçümleri sıcaklık kaydediciler ve/veya indikatörler vasıtasıyla düzenli tutulmalıdır (Mercier ve diğerleri, 2017; Ndraha ve diğerleri, 2018).

**Tablo 1.** Su ürünleri tüketimine bağlı enfeksiyonlarda *V. parahaemolyticus* risk faktörleri (Ndraha, 2020)

**Kategori Risk faktörleri**

Kültür alanı - Kanalizasyon

-Tatlı su arıtımı

-Su döngüsü

Kültür metotları -Dip kültürleri

-Su ürünleri yetiştiriciliği

İklim çeşitliliği -Deniz suyu sıcaklığı

-Tuzluluk

-Bulanıklık

-Çözünmüş oksijen

-pH

-Su derinliği

Doğa olayları -Kasırga

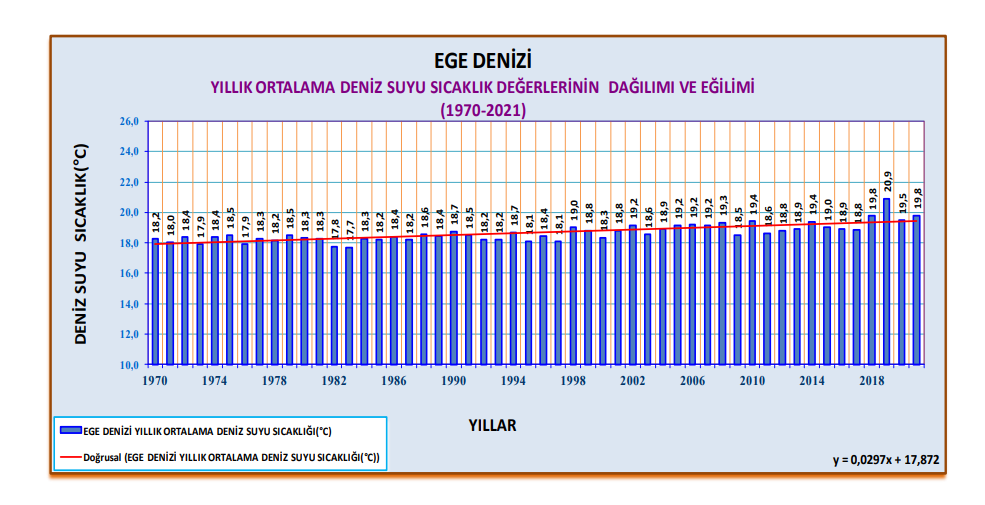
-Sel

Taşıma ve işleme -Çapraz kontaminasyon

-Pişirme yöntemleri

Soğuk zincir kontrolü -Sıcaklığın korunamaması

Birçok çalışma deniz yüzey sıcaklığının (DYS) deniz canlılarında *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu belirlemede ve yaşam bölgelerinin sıcaklıklarının 9,9’dan 33 oC’e değişiklik gösterdiğini gözlemlemiştir (Cruz ve diğerleri, 2015; DePaola ve diğerleri, 2003; Johnson ve diğerleri, 2010; Parveen ve diğerleri, 2008). Diğer çalışmalar da *V. parahaemolyticus* konsantrasyonu ile iklimatik çeşitlilik arasındaki ilişkiyi rapor etmişlerdir. Parveen ve diğerleri (2008) Chesapeake Körfezindeki su ürünlerinde *V. parahaemolyticus*’a çok rastlanılması sadece su sıcaklığına bağlı değil aynı zamanda sudaki çözünmüş oksijenin oranına da bağlıdır. Lopez-Hernandez ve diğerleri (2015) Meksika Körfezi Kıyısında yakalanan su canlılarında *V. parahaemolyticus*’un sıkça rastlanılması deniz suyu sıcaklığı, tuzluluğu ve pH’ın oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Konrad ve arkadaşlarının (2017) çalışmalarında Kanada’nın batı kıyılarından avlanan su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* görülmesi ve iklim farklılıkları, günlük deniz yüzey sıcaklıkları ile ilişkili olduğu ve deniz yüzeyi sıcaklığına göre su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* bulunma konsantrasyonunun tahmin edilebileceği öngörülmüştür. Kuzey Carolina kıyılarında yapılan çalışmalar iklim koşulları ve su ürünlerindeki *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu su yüzey sıcaklığı ve su derinliğinin etkilediği tespit edilmiştir (Froelich ve diğerleri, 2017; Williams ve diğerleri, 2017). Hartwick ve diğerlerinin (2019) New Hampshire Körfezi’nde yapılan çalışmalarında deniz suyu sıcaklığı ve pH’ının su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu belirlemede öngörücüdür.

**Şekil 1.** Aylık Ort. Deniz Suyu Sıcaklık Verisinin 1970-2021 Yılları Arasında Dağılımı ve Eğilimi (MGM, 2021)

**Tablo 2.** 1970-2021 yılları arasında aylara göre ortalama Ege Denizi deniz suyu sıcaklık ortalaması (oC) (MGM, 2021)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Ocak | Şubat | Mart | Nisan | Mayıs | Haziran | Temmuz | Ağustos | Eylül | Ekim | Kasım | Aralık |
| Deniz Suyu Sıcaklık | 13,8 | 13,2 | 13,9 | 15,8 | 18,7 | 22,0 | 24,1 | 24,6 | 23,2 | 20,7 | 17,9 | 15,5 |

Meteroloji Genel Müdürlüğünün (2021) verilerine göre (Şekil 1) 1970 yılından 2021 yılına kadar Ege Denizi yıllık ortalama deniz suyu sıcaklık değerinin 1,6oC arttığı görülmektedir. 1970-2021 yılları arasında en yüksek yıllık ortalama deniz suyu sıcaklığı 2019 yılında 20,9 oC olarak hesaplanmıştır. Ayrıca Tablo 2’de görüldüğü gibi 1970-2021 yılları arasında Ege Denizinde Kasım ayı ortalama deniz suyu sıcaklığı 17,9 oC ve Aralık ayı ortalama deniz suyu sıcaklığı 15,5 oC olarak ölçülmüştür (MGM, 2021).

Kasırga ve sel gibi doğa olaylarında su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* birikiminin arttığı görülmüştür. Shaw ve diğerlerinin (2014) Chesapaeke Körfezi’nde yaptıkları araştırmada kasırganın su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu nasıl etkilediği incelenmiş ve fırtınalı bir günün ertesi gününde alınan örneklerin fırtına öncesine göre daha yüksek patojen içerdiği ve fırtına öncesi patojenite değerlerine fırtınadan 4 gün sonrasında gerilediği görülmüştür.

**2.4.1. Küresel Isınmanın *V. parahaemolyticus* ile İlişkisi**

İklimimiz yıkıcı etkiler yüzünden değişmektedir ve bu değişim son 2.000 yılda olan değişimden daha hızlı olmaktadır. İklim değişikliği yalnızca sosyal ve çevresel temiz hava, temiz içme suyu ve beslenme, gıda güvenliği gibi sağlığın belirleyicilerini etkilemekle kalmamakta aynı zamanda gıda üretim sistemleri ve gıda güvenliği üzerinde sonuçlar da doğurmaktadır (WHO, 2019). Halihazırda günümüzde tahmini 600 milyon -dünyada neredeyse 10 insandan biri- kontamine gıda tüketimi sonucu hastalanmakta ve 420.000 kişi bu sebeple her yıl ölmektedir (WHO, 2015). İklim değişikliği tarım ve üretim alanını etkilediği gibi insan, hayvan ve haşere davranışlarını da etkilemektedir.

İklim değişikliğine bağlı çevresel koşulların değişmesi *V. parahaemolyticus*’un hayatta kalmasını, üremesini ve yayılmasını direkt olarak etkilemektedir. İklim değişikliği aynı zamanda patojenin fiziksel çevresini ve yarışmacı patojenleri de indirekt olarak etkilemektedir (Adler ve diğerleri, 2009; Brucet ve diğerleri,2012; Wu ve diğerleri, 2016). Sonuç olarak iklim değişikliği yalnızca *V. parahaemolyticus*’un konsantrasyonunu etkilemekle kalmayıp coğrafik ve mevsimsel yayılımını da etkilemektedir. Bu da su ürünlerinde *V. parahaemolyticus*’un yaşama, gelişme ve üremesinin etkilenmesine yol açmaktadır, su ürünlerinin tüketilmesine bağlı olarak enfeksiyon riskini de etkilemektedir (Fernandez-Piquer ve diğerleri, 2011; Kim ve diğerleri, 2012; Parveen ve diğerleri, 2013; Yoon ve diğerleri, 2008). Çalışmalar su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunun su canlılarının yetiştiği çevreyle (ör: denizsuyu, dip tortusu) ilişkili olduğunu göstermiştir (Givens ve diğerleri, 2014; Parveen ve diğerleri, 2008; Shaw ve diğerleri, 2014).

İklim değişikliği yağmurları ve buharlaşmayı da etkileyerek deniz suyu tuzluluğunu değiştirmektedir. Mesela, güçlü yağışlar sellere sebep olmakta bu da yüksek miktardaki tatlı suyun okyanuslara karışmasına sonucunda da deniz suyunun tuzluluk oranının azalmasına sebep olmaktadır. Tuz oranının 25 ppt’nin altına düşmesi *V. parahaemolyticus*’un üreyebilmesi için uygun ortam yaratmaktadır (Konrad ve diğerleri, 2017; Yu ve diğerleri, 2013). Konrad ve diğerleri (2017) bir birim tuzluluk oranının düşmesinin su ürünlerinde %8 oranında *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu arttırdığını görmüşlerdir. Buna ek olarak tuzluluk oranının değişmesinin fitoplankton, zooplankton ve planktonik kabukluların toplu kompozisyonlarını etkilediği ortaya çıkmıştır (Esteves ve diğerleri, 2015; Turner ve diğerleri, 2009). Sonuç olarak bu koşullar planktonların *V. parahaemolyticus* için vektörlük yapabilmesini ve su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* oranının artmasını etkileyebilmektedir (Frischkorn ve diğerleri, 2013).

İklim değişikliği okyanuslardaki *V. parahaemolyticus* dağılımını da etkilemektedir. Bu değişiklik Pasifik Okyanusu’nda El Nino Güney Salınımı (ENSO) ve Kuzey Atlantik Salınımı (NAO) gibi normal olmayan hava koşullarına sebep olmaktadır. ENSO ve NAO’nun deniz ekosistemini yapısal ve işlevsel olarak değiştirebilecek kayda değer şekilde sıcak ve soğuk fazları bulunmaktadır (Meehl ve diğerleri, 2016).

İklim değişikliği sebebiyle uzun süreli sıcak havalar özellikle sıcak okyanus dönemi boyunca deniz suyu sıcaklıklarının ortalamanın üzerinde artmasıyla, deniz suyunun katmanlaşmasına ve besin değerinin artmasına sebep olmaktadır. Sıcaklığın ve besin değerlerinin artması fitoplankton, zooplankton ve planktonik kabuklular gibi deniz mikroorganizmaları için üreme döngüsünde ana gerekliliklerdendir (Martinez-Urtaza ve diğerleri, 2012; Vezzulli ve diğerleri, 2016). Birçok çalışma planktonların besin değeri açısından vektör olabilecek rezervuarlar olduğunu ve *V. parahaemolyticus*’un üremesi için besi yeri ortamı sunduğu ve kitin yüzeyde biofilm formunda artmaktadır (Frischkorn ve diğerleri, 2013). Bu olgu Martinez-Urtaza ve diğerleri (2012) tarafından ispatlanmıştır, şöyle ki Galiçya’da bulunan Vigo Ria Haliçi’nin derin kısımlarında *V. parahaemolyticus* görülmesinin özellikle zooplanktonlarla ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Rehnstam-Holm ve diğerleri (2014) çalışmalarında Hindistan’ın güneybatı kıyıları Arap Denizi açıklarında *V. parahaemolyticus* görülmesinin kopepod sayısının fazlalığıyla ilişkili olduğu raporlanmıştır. Zooplankton ve kopepodlar *V. parahaemolyticus*’un okyanustaki dağılımına olanak sağlamaktadırlar, bu da *V. parahaemolyticus* enfeksiyonunun yayılmasını sağlamaktadır (Martinez-Urtaza ve diğerleri, 2012; Rehnstam-Holm ve diğerleri, 2014). Martinez-Urtaza ve diğerleri (2008) 1994-2005 yılları arasında Peru kıyılarında çalışmalarında El Nino bölümleri ve *V. parahaemolyticus* enfeksiyonu görülmesi arasında bir ilişki olduğunu bulmuşlardır. Özellikle 1997’den 1998’e elde edilen izolatların yalnızca kökensel olarak Asya’da bulunan O3:K7 serotipine ait olması dikkat çekmiştir. Buna ek olarak bu çalışma 1997’deki El Nino bölümlerinin *V. parahaemolyticus*’un muhtemelen Asya’dan Güney Amerika’ya göç etmesine sebep olduğunu göstermektedir. Raszl ve diğerleri (2016) yaptıkları çalışmada Güney Amerika’da Pasifik kıyılarında deniz ürünleri tüketimine bağlı çıkan *V. parahaemolyticus* salgının El Nino bölümleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Genel olarak bu veriler ışığında iklim değişikliği deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu etkilemekte ve böylece *V. parahaemolyticus* enfeksiyonlarının görülmesini de etkilemektedir. Buna rağmen iklim değişikliğinin deniz ürünleri tüketerek *V. parahaemolyticus* enfeksiyon riskine etkisi konusunda bilgi birikimi sınırlıdır, ayrıca iklim değişikliğinin etkileriyle deniz ürünlerinde ne şekilde gıda güvenliğine dikkat edileceği konusundaki bilgi yetersiz kalmaktadır (Jaykus ve diğerleri, 2010; Marques ve diğerleri, 2010). Farklı *V. parahaemolyticus* suşları çevresel değişimlere farklı tepkiler vermektedirler ve bazı *V. parahaemolyticus* suşları diğerlerinden daha büyük sağlık risklerine yol açmaktadır (Liu ve diğerleri, 2016).

İklim değişikliğinin gelecek yıllardaki sonuçları ile ilgili risk yönetim uygulamaları hakkında bilgilendirme yapılması gereklidir. Muhling ve diğerleri (2017) bu konuda istatistiksel ölçek küçültme ve uzamsal ayrıştırma modelleme kullanılarak *V. parahaemolyticus*’un gelecekteki görülme, yayılım ve Chesapeake Körfezindeki istiridyelerdeki mevsimsel yayılımı konusunda önemli bir araştırma yapmışlardır. Bu modeller *V. parahaemolyticus* habitatı ile yüksek sera gazı emisyonu altında simüle edilmiştir. Simülasyon sonucunda muhtemelen Chesapeake Körfezinde istiridyelerde *V. parahaemolyticus* oranının 20. yüzyılın sonlarının 1,5 ila 3 katı kadar artacağı öngörülmektedir. Bir diğer çalışmada iklim değişikliğinin Meksika Tepic’te çiğ istiridye tüketiminin enfeksiyon riski 2100’de 2010’a göre 1,12 katı daha yüksek olacağı tespit edilmiştir (Ortiz-Jimenez ve diğerleri, 2018). Bu bulgular, gıda güvenliği otoriteleri tarafından erken uyarı olarak algılanıp uygun stratejiler geliştirilerek deniz ürünlerinde iklim değişikliğinin etkileri kontrol edilerek halk sağlığının korunması sağlanabilir. Ayrıca *V. parahaemolyticus*’un iklim değişikliğine bağlı deniz ürünlerindeki etkisini, gelecekteki riskini değerlendirmek, azaltmak için araç ve ölçüm değerleri önemlidir. Riski azaltma konusunda araçların kullanımı ile ilgili bilgi yetersiz kalmaktadır. Bununla beraber, *V. parahaemolyticus*’un su ürünlerindeki mevcudiyeti, çoğalması ve dağılımı pH, çözünmüş oksijen ve tuzluluk gibi diğer klimatik faktörlerle de etkilenebilmektedir (Hartwick ve diğerleri, 2019; Lopez-Hernandez ve diğerleri, 2015; Parveen ve diğerleri, 2008).

İklim değişikliği sonucu aşırı hava olaylarının sıklığı ve şiddeti artacak daha yaygın aşırı sıcaklıklara, ağır yağışlara, yoğun tropikal kasırgalara, kuraklık ve sellerden etkilenen alanlar genişlemesine – örneğin, 2080’de, her yıl 2 milyon ile 7 milyon arası insanın, aşırı hava olayları dahil olmak üzere kıyı sellerinden etkileneceği düşünülmektedir (Tirado ve diğerleri, 2010).

Gıda üretimi, bazı gıda kaynaklı patojenlerin hayatta kalma ve/veya çoğalma oranlarının değişmesi yoluyla iklim değişikliğinden doğrudan etkilenebilmektedir. Başlıca gıda kaynaklı hastalıkların sebeplerinden biri olan *V. cholerae*’nın her yıl 760.000 kişide hastalığa sebep olduğu ve 24.000 kişinin de ölümüne sebep olduğu düşünülmektedir (Springmann ve diğerleri, 2016). Genellikle midye ve istiridye gibi kontamine su süzücü organizmaların tüketimi ile ilişkilidir. İklim değişikliği, bu su süzücü organizmaları kirleten alglerin küresel genişlemesinin bir destekçisi olarak tanımlanmıştır (Paerl ve Huisman, 2009).

* 1. **Virulans Faktörleri**

*V. parahaemolyticus* insan hastalığında birçok toksin üretmektedir. Bunlar; *toxR*, Isıya Dirençli Direkt Hemolizin (Thermostable Direct Hemolysin,TDH), TDH İlişkili Hemolizin (TDH Related Hemolysin, TRH), Termolabilhemolizin (Thermolabilehemolysin,TLH), Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS), Tip VI Sekresyon Sistemi (T6SS), Adezyon Faktörleri, Demir Alım Sistemi, Lipopolisakkarit Yapı olarak sıralanmaktadır (Gode-Potratz ve diğerleri, 2010; Makino ve diğerleri, 2003; Praja ve Safnurbaiti, 2018; P. Li ve diğerleri, 2017; Zhang ve diğerleri, 2017).

**2.5.1. *toxR***

*toxR* geni ilk olarak *V. cholerae*’da *cholerae toksin* (ctx)’e pozitif transkripsiyon faktör olarak tanımlanmıştır, ayrıca *V. parahaemolyticus*’ta *toxR* geni, *V. parahaemolyticus*’un sahip olduğu majör virülans faktörlerden biri olan *tdh* genini uyarmada rol oynayan faktörlerden biridir. *V.* *cholerae* ve *V. parahaemolyticus*’ta bulunan *toxR* genleri %52 oranında benzerlik gösterir (Praja ve Safnurbaiti, 2018). *toxR* geninin *V. cholerae* gibi *V. parahaemolyticus*’un da düzenleyici fonksiyonlarında bulunduğu ispatlanmıştır. Analizlerde *toxR* geninin dizilişinin *V. fischeri* ve en azından iki *Vibrio* türünde daha bulunduğu görülmüştür. Bu yüzden *Vibrio* türlerinde *toxR* geni daha belirgin görünmektedir. *toxR* geninin *V. parahaemolyticus* ve *V. cholerae* arasındaki benzerlik ilişkisi rRNA geni ilişkisinden (%91-92 benzerlik) daha düşüktür (Kita-Tsukamoto, 1993).

Yakın zamanda yapılan çalışmalardan biri göstermektedir ki *V. parahaemolyticus* patogenezinde sadece verilen virulans fonksiyonlarını göstermez; virulans karmaşık özellik gösterir ve farklı suşlar farklı stratejiler gösterebilmektedirler (Xu ve ark, 2016).

**2.5.2. Isıya Dirençli Direkt Hemolizin (Thermostable Direct Hemolysin, TDH)**

*V. parahaemolyticus* izolatlarında virülent tür izolatlar, *tdh* geni tarafından kodlanan Isıya Dirençli Direkt Hemolizin (TDH) ya da *trh* geni tarafından kodlanan TDH-İlişkili Hemolizin (TRH) aranır (Praja ve Safnurbaiti, 2018). TDH por-formu ve 100oC’de 10 dakika sıcaklıkta bile hasar görmeyen ısıya dirençli proteine sahiptir (Tan ve ark, 2017). *V. parahaemolyticus* Wagatsuma Agarda β-hemolitik özellikler görülmesi *tdh*-pozitif olduğunu gösterir, bu olay aynı zamanda Kanagawa Feromon (KP) olarak bilinir (Praja ve Safnurbaiti, 2018). TDH’nin iki belirgin karakteristik özelliği hemoliz ve sitotoksitedir (Tan ve ark, 2017). TDH toksinin ilk hedefi epitel hücreler ve bağırsak hücreleridir, farelerde sitotoksite, enterotoksite ve letal aktivite göstermektedir. TDH’nin bu aktivitesi enfeksiyon boyunca diyareye sebep olur (Praja ve Safnurbaiti, 2018).

Birçok çalışma patojenik suşların (ör: *tdh* ve/veya *trh*) çevreden elde edilen numunelerden nadiren izole edildiği, bunun yanında çoğunlukla klinik belirti gösteren gastroenteritis hastalardan izole edildiği tespit edilmiştir. Fakat bazı çalışmalarda çevresel izolatlardan virulens genleri (*tdh* ve/veya *trh*) tespit edilmiştir (Gutierrez ve diğerleri, 2013; Kokashvili ve diğerleri, 2015; Paranjpye ve diğerleri, 2012). Gastroenteritisli hastalardaki pandemik suşlar şehir merkezine yakın yerde yaşayan su canlılarının yaşam alanına hastaların dışkısı yoluyla yayılabilmektedir. Şehir merkezindeki su canlılarının yaşam alanlarında pandemik suşların yayılması ile ilgili bilgiler kısıtlıdır (Hara-Kudo ve diğerleri, 2003; Li ve diğerleri, 2016).

**2.5.3. TDH İlişkili Hemolizin (TDH Related Hemolysin, TRH)**

*V. parahaemolyticus*’un virulans faktörlerinin identifiye edilmesi bilimsel çalışmaların ana konularından biridir. Li ve diğerleri (2019) *V. parahaemolyticus*’un virulans faktörleri hakkında kapsamlı çalışmalar yapmışlardır. Birçok çalışma *tdh* geni tarafından kodlanan TDH ve *trh* geni tarafından kodlanan TDH-ilişkili hemoliz (related hemolysis) (TRH) bulunması *V. parahaemolyticus*’un enfeksiyon oluşturan majör virulans faktörleri olarak düşünülmüştür (Nishibuchi ve Kaper, 1995; Matsuda ve diğerleri, 2019). İnsanlardan alınan klinik örneklerden izole edilen *V. parahaemolyticus*’ta bu iki protein çoğunlukla tespit edilmesine rağmen (Iida ve diğerleri, 1998; Tang ve diğerleri, 2015), çevreden alınan (ör: midye, deniz suyu, tortu) son derece az örneğin de *tdh* ve *trh* genlerine sahip oldukları görülmüştür (Theethakaew ve diğerleri, 2013).

Su ürünlerinde *V. parahaemolyticus*’un yayılmasında çevresel faktörlerin etkisi detaylıca çalışılmış konular değildir. Bununla beraber patojenik *V. parahaemolyticus*’un (trh) yumuşakçalarda (midye, istiridye) bulunması önemli ölçüde deniz suyu tuzluluk oranından etkilenmektedir. Yine de çalışmanın sonucu örneklerin alındığı bölge ve yumuşakçaların cinsinden etkilenmiş olabilir (Lopez-Joven ve diğerleri, 2015). Bu önemlidir çünkü aynı yerden aynı zamanda alınan farklı türdeki yumuşakçalardan farklı konsantrasyonlarda *V. parahaemolyticus* oranları gözlemlenmiştir (Froelich ve diğerleri, 2017).

Maldiv Cumhuriyeti’ndeki salgından elde edilen klinik örnekler KP-negatif (TDH üretmeyen) çıkmıştır, bununla birlikte yeni tipte hemolizin üreten tür yani TRH ortaya çıkmıştır. İmmünolojik olarak TDH ve TRH toksinleri arasında benzerlikler bulunmaktadır; iki toksin de eşit kapasitede kırmızı kan hücresini hemolize edebilmektedir, iki gen arasında %70 oranında benzerlik bulunmaktadır (Praja ve Safnurbaiti, 2018). Patojenik pandemik olamayan izolatlar TDH-ilişkili hemolizin (TRH) *trh* ile kodlanır ve TRH-pozitif suşlar baskın olarak üreaz geni içerir ve TDH negatiftir. TDH ve TRH genellikle nonpatojenik *V. parahaemolyticus* izolatlarda bulunmamaktadır (Kalburge ve diğerleri, 2014). TDH ve TRH benzer biyolojik, immünolojik ve fizikokimyasal özellikleri paylaşmaktadır; örneğin TRH TDH ile benzer mekanizmayla kolon epitelyal hücrelerinde Cl- sekresyonunun artışına sebep olur. TDH’nin termostabilitesine benzemeyen şekilde TRH, 60 oC’de 10 dakikada yıkımlanan ısıya duyarlı proteine sahiptir (Tan ve ark, 2017).

**2.5.4. Termolabilhemolizin (Thermolabilehemolysin, TLH)**

Bazı klinik durumlarda *tdh* ya da *trh* bulunmamaktadır, iki genin de bulunmadığı hastalığın olduğu durumlarda başka rol oynayan genler akla gelmelidir; *V. parahaemolyticus* thermolabilhemolizin (TLH) adı verilen ek bir toksin üretme yeteneğine sahiptir, bu toksin *tlh* geni tarafından kodlanır ve fosfolipaz aktivitesi gösterir, alyuvarları parçalama yeteneğine sahiptir (Praja ve Safnurbaiti, 2018). Bu genin ürünleri patojeniteyle ilişkili değildir, ancak tüm *V. parahaemolyticus* suşlarında gözlenmektedir, çalışmalarda genetik hedef olarak seçilmesi toplam *V. parahaemolyticus* sayısının belirlenmesinde kullanışlı bir hedeftir; bu sebeple *V. parahaemolyticus* çalışmalarında kullanılmakta ve önerilmektedir (Ward ve Bej, 2006).

**2.5.5. Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS)**

*V. parahaemolyticus*’un patojenik izolatlarındaki tüm genom dizilimleri iki tip III sekresyon sistemine (T3SS) sahiptir; T3SS1 ve T3SS2. Sekresyon sistemleri bakteriyel efektör proteinlerin ökaryotik hücrelere direkt olarak taşınmasında aracı olan multiprotein yapılarını içerirler. T3SS1 ve T3SS2 aynı zamanda *V. parahaemolyticus*’un doğada yaşamasını sağlamaktadır. Enfeksiyon boyunca *V. parahaemolyticus* konak hücredeki fibronektin ve fosfatidik aside bağlanmak için adezyon faktörlerini kullanır, T3SS1 ve T3SS2’yi kullanarak çeşitli efektörler ve toksinleri sitoplazmaya taşıyarak sitotoksisite ve ağır hastalıklara yol açmaktadır (Baker-Austin ve ark, 2018).

*tdh* ve *trh* genleri dışında Tip 3 Sekresyon Sistemin de (T3SS1 ve T3SS2) patojen *V. parahaemolyticus*’larda sorumlu olduğunu birçok çalışma öne sürmektedir (Makino ve diğerleri, 2003; Matsuda ve diğerleri, 2019; Park ve diğerleri, 2004). Hiyoshi ve diğerlerinin (2010) çalışmaları T3SS2’nin enteropatojenik suşlarla ilişkili olduğunu göstermiştir. *tdh*’nin T3SS yoluyla taşınması hayvan modellerinde enfeksiyona sebep olduğu gözlemlenmiştir (Matsuda ve diğerleri, 2019).

Tip III Sekresyon Sistem iğne benzeri yapısıyla hedef konak hücresindeki bakteriyel proteinlerin içine girmektedir. T3SS shigella, salmonella ve enteropatojenik *Escherichia coli* gibi intestinal epitelyal hücreleri etkileyerek ishale yol açan bakterilerin ana virulans faktörlerinden biridir (Makino ve diğerleri, 2003).

Dokusal hücre enfeksiyonu sırasında T3SS1; otofaji, hücre yüzeyinde çıkıntılanma, hücre dönmesi ve son olarak hücre erimesini içeren bir takım olayları başlatmaktadır (Letchumanan ve diğerleri, 2014). Ayrıca *V. parahaemolyticus* suşları T3SS1 kodları sayesinde doğada hayatta kalabilmektedir (Paranjpye ve diğerleri, 2012).

T3SS genleri *V. parahaemolyticus* genomuna tanımlıdır fakat *V. cholerae*’da bu genler bulunmamaktadır. T3SS içeren çeşitli *V. parahaemolyticus* suşları DNA probları ile analiz edildiğinde bu genlerin sadece TDH-üreten (Kanagawa-fenomonu pozitif) suşlarda bulunduğu bu sonuç da T3SS’nin bulunması *V. parahaemolyticus*’un insanlarda patojenitesiyle ilişkili olduğunu göstermektedir (Makino ve diğerleri, 2003). T3SS1 *V. parahaemolyticus*’un hem klinik hem de çevresel suşlarında görülebilirken T3SS2 geni *tdh+* taşıyan suşlarda daha ilişkiliyken *trh* taşıyan suşlarda görülmemektedir. Büyük oranda klinik belirti oluşturan izolatlar hem hemolizin hem de *tdh* ve *trh* genlerini taşıdıkları, üreaz pozitif oldukları ve T3SS2 bağlantılı genleri taşıdıkları ortaya çıkmıştır (Paranjpye ve diğerleri, 2012). Bununla beraber 2007 U.S. CDC’de yara enfeksiyonlarından ve gıda kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen *V. parahaemolyticus* suşlarında *trh, tdh* ve T3SS’ye rastlanılmamıştır, bu bilinmeyen patojen bir virulans faktörün varlığına işaret etmektedir (Jones ve diğerleri, 2012). Diğer çalışmalar mikroorganizmanın patojenitesinin Tip 6 Sekresyon Sistemi (T6SS1 ve T6SS2) (H. Li ve diğerleri, 2017; Zhang ve diğerleri, 2017), adezyon faktörleri (Jiang ve diğerleri, 2014; Liu ve Chen, 2015), demir alınım mekanizması (Leon-Sicairos ve diğerleri, 2015), lipopolisakkarit içeriği (Guvener ve McCarter, 2003; Zhang ve diğerleri, 2018), dış membran proteinleri (Zha ve diğerleri, 2016) ile ilişkili olabileceğini önermektedir. Bu çalışmalar sonucunda *V. parahaemolyticus*’un patojenite mekanizması ve katkı sağlayan faktörler tam anlamıyla anlaşılabilmiş değildir (Ndraha ve diğerleri, 2020).

**2.5.6. Tip 6 Sekresyon Sistemi (T6SS)**

Tip 6 Sekresyon Sistemi (T6SS) hedef bakteri hücresinde olduğu gibi konak memeli hücresine de etkili bir salgı üretimi sağlamaktadır. *V. parahaemolyticus* 2 çeşit T6SS’e sahiptir; bunlar kromozom 1’de bulunan T6SS1 ve kromozom 2’de bulunan T6SS2’dir. T6SS1 ve T6SS2 hem klinik hem çevresel izolatlarda bulunabilmektedir (P. Li ve diğerleri, 2017). T6SS1 genellikle sıcak deniz koşullarında aktif olup klinik izolatlarda bulunmaktadır, bunun yanında T6SS2 hem düşük hem sıcak derecelerde ve düşük tuz konsantrasyonunda aktivitesini sürdürebilmektedir (Salomon ve diğerleri, 2013).

**2.5.7. Adezyon Faktörleri**

Patojenlerin tutunması patojeniteleri ile yakından ilişkilidir. Konakçı dokuya mikrobiyal adezyon enfeksiyon sürecinin ilk aşamasıdır (Navarre ve Schneewind, 1999). *V. parahaemolyticus*’un konakçı hücreye tutunması ile ilişkili ana faktörler; hemaglutinin ve T6SS2’dir (Jiang ve diğerleri, 2014; Zhang ve diğerleri, 2017).

**2.5.8. Demir Alım Sistemi**

Gode-Potratz ve diğerleri (2010) metal iyonlarının *V. parahaemolyticus* gen ekspresyonu düzenlenmesinde önemli rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Konak hücredeki demir genel olarak kırmızı kan hücreleri, laktoferin ve transferinde bulunmakta ve az sayıda serbest demir iyonları patojenlerin demir ihtiyacını karşılayamamaktadır. Patojenik *Vibrio*’lar demir ihtiyacını iki yolla karşılayabilmektedir; bunlardan, ilk yol kırmızı kan hücrelerini ekzotoksin üreterek parçalayıp hemoglobin açığa çıkarmak, ikinci yol hem'deki demir iyonlarına yüksek afiniteye sahip düşük moleküler ağırlıklı bir demir şelatlama maddesi üretmektir (Kustusch ve diğerleri, 2011; Yamamoto ve diğerleri, 1994).

**2.5.9. Lipopolisakkarit Yapı**

Lipopolisakkaritler, Gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki ana bileşenlerinden biri ve bakteriyel endotoksinin ana maddesidir. Lipopolisakkaritler üç bölümden oluşmaktadır; bunlar, ana polisakkarit, lipid A ve O antijendir. Biyofilm oluşumunda ekstrasellüler polisakkaritler, bakterilerin yaşayan ya da yaşamayan organizmalara tutunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Zhang ve diğerleri, 2018).

**2.6. Kanagawa Feromonu**

*V. parahaemolyticus*’un patojenitesi özel yüksek tuz oranı olan besiyeri Wagatsuma agarda **β**-hemolize sebep olan Kanagawa feromonu ile ilişkilidir (Miles ve diğerleri, 1997). Klinik vaka oluşturan örneklerden izole edilen *V. parahaemolyticus* cinsinin hemen hemen hepsinde Kanagawa feromonu (KP) adıyla anılan hemolitik aktivite gösterdiği görülmüştür, bunun yanında %1-2 oranında klinik olmayan kaynaklardan izole edilen türlerde de KP pozitif olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu hemolizin önemli virulans faktörlerden biridir ve KP reaksiyonu virulent türler için işaretçi olmuştur (Nishibuchi ve Kaper,1995). Önceki çalışmalarda Kanagawa feromonu, Watsugama besi yerinde beta tipte hemolize neden olmakta bu hemoliz thermostable direct haemolysin (TDH) üretimi nedeniyle oluşmaktadır (Bilung ve ark, 2015). TDH ısıtmayla 100 oC’de 10 dk’da inaktive olmamaktadır ve hemolitik aktivite lesitin eklemekle artırılamamaktadır, direkt alyuvarlara etki gösterdiği görülmüştür (Nishibuchi ve Kaper, 1995). Aynı şekilde TDH-related hemolisin (TRH) üretimi de *V. parahaemolyticus*’un virulans faktörlerinden biridir. *tdh* ve *trh* genlerinin dizilimleri yaklaşık olarak %70 oranında benzerlik göstermektedir ve bu genler patojenik *V. parahaemolyticus* tespitinde geniş kapsamda kullanılmaktadır. Toplam non-patojenik ve çevrede bulunan *V. parahaemolyticus* populasyon sayısını belirlemek için *toxR* ve *tl* genleri belirleyicidir (Bilung ve ark, 2015). TDH ve TRH üreten türlerin insanlar için patojen olduğu düşünülmektedir, serotip çeşitliliği insan enfeksiyonlarıyla ilişkili olabilir fakat O3:K6 serotipine bağlı olarak çeşitli ülkelerde birçok salgında sorumlu ajan olarak görülmüştür (WHO,FAO, 2011).

* 1. **Su Ürünlerinde *Vibrio* spp.**

Çeşitli *Vibrio* türleri hem avcılıkla avlanan hem de kültür balıklarında ciddi hastalıklara neden olabilirler. Balıklarda patojenik türler arasında *V. ordalii* (salmonidlerde septisemi), *V. anguillarum* (yılan balıklarında red pest), *V. salmonicida* (soğuk su vibriosisi), *V. vulnificus* (Avrupa yılan balıklarında sıcak su vibriosisi), *V. viscosus* ve *V. wodanis* (Atlantik somonlarında kış ülser hastalığı) yer almaktadır (Gauthier, 2015; Hancı ve Konuk, 2016). *Vibrio* türleri doğada yaygın olarak bulunmasının yanında balık ve kabuklu deniz ürünlerinin solungaç, deri ve intestinal kanallarında görülebilmektedir (Novoslavskij ve diğerleri, 2016; Hancı ve Konuk, 2016). *Vibrio* türleri arasında *V. cholerae, V. vulnificus* ve *V. parahaemolyticus* türleri insandaki vibriosis vakalarında görülmekte balık ve kabuklu deniz ürünlerinin tüketilmesi sonucu insana bulaştığı düşünülmektedir (Gauthier, 2015). *V. vulnificus* ve *V. parahaemolyticus* türleri insan vibriosisi ile daha sık ilişkilendirilmekte ve genellikle balık ve balıkçılık ürünlerinde yetersiz işlem görmüş, az pişirilmiş ya da çiğ tüketim sonucu ortaya çıkmaktadır (Novoslavskij ve diğerleri, 2016). Bu bakteriler insanlarda yara enfeksiyonu, septisemi ve gastroenteritise sebep olmaktadırlar. *V. parahaemolyticus* gıda kaynaklı bir zoonoz olup istiridye gibi yumuşakçaların ağız yoluyla tüketilmesi sonucu hastalığa sebep olmaktadır (Drake ve diğerleri, 2007). Balıklarda *V. parahaemolyticus* İspanyol dişli sazanında (*Aphanius iberus*) mortaliteye sebep olduğu raporlanmıştır (Austin ve Austin, 2007; Hancı ve Konuk, 2016). *V. vulnificus* ise başlıca yılan balıklarında hastalığa neden olmaktadır (Gauthier, 2015).

*Vibrio* ve *Vibrio* ilişkili bakteriler tuz konsantrasyonu 17’den 37 ppt’ye kadar olan tuzlu sularda geniş yayılım gösterirler. Tatlı su habitatları düşük tuz konsantrasyonunda (<0,5 ppt) olduğundan halofilik olmayan *V. cholerae* ve *V. mimicus* gibi *Vibrio* türlerine sığınak olabilmektedir. Deniz ortamı ile yakın ilişkisinden dolayı istridye, midye, karides ve tarak gibi kabuklu deniz ürünleri içinde *Vibrio* spp. bu makroekosistemin içinde sayıca fazladır (Humphries ve Linscott, 2015). Kolera Amerika’da pek sık görülmezken vibriosisin (*V. parahaemolyticus, V. vulnificus* ve *V. alginolyticus*) oranı gün geçtikçe artmaktadır.

Enterik enfeksiyondan kaynaklanabilecek temel komplikasyon, septisemi üreten kan dolaşımına sekonder yayılımdır. Diğer enterik patojenlerin aksine sekonder komplikasyonlar *Vibrio* gastroenteritisinde nadir görülmektedir (Tan ve diğerleri, 1994). Diğer *Vibrio* ve *Vibrio* benzeri enfeksiyonlarda hastalığa yakalanmak için en önemli iki risk faktörü kontamine deniz ürünleri tüketimi ve yurtdışı seyahatleridir. *V. cholerae* olmayan vibrio enfeksiyonlarında çok sayıdaki deniz ürünü vibriosis salgınlarında hastalığı taşıyıcı rol almaktadır (Humphries ve Linscott, 2015).

**2.7.1. Karideslerde Vibriosis Hastalığının Yayılımı**

*Vibrio* konsantrasyonu filtre ederek beslenen canlılarda bağırsakta yoğunlaşmaktadır ve bağırsakta tutunup bağırsakta çoğalmaktadır (WHO ve FAO, 2020). *V. parahaemolyticus* su canlılarının özellikle karideslerin yaşamlarını tehdit eden patojenik bir ajandır. Genellikle *V. parahaemolyticus* enfeksiyonu oral yolla bulaşmakta ve insanlarda gastroenteritise sebep olurken su canlılarında özellikle karideslerde Akut Hepatopankreatik Nekrozis Hastalığına (AHPND) ya da yüksek ölüm oranına sahip Erken Ölüm Sendromuna (EMS) ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Karides türlerinden enfeksiyona duyarlı olanlar; *Litopenaeusvannamei, Penaeusmonodon* ve *P. chinensis*’tir (Praja ve Safnurbaiti, 2018)

Karideslerde AHPND’ye bağlı olarak ölüm oranı %40-100 oranında oldukça yüksek seyretmektedir. AHPND’ye *V. parahaemolyticus*’un tek suşu sebep olmaktadır. Tayland ve Meksika’da izole edilen *V. parahaemolyticus*’taki genom analizi göstermektedir ki bakteri plasmidleri tip IV pili protein virulans faktörü ve konjugal transfer protein taşımaktadır. Ek olarak AHPND’ye sebep olan *V. parahaemolyticus* plasmidi insektisidal toksin olan PhotorabdhusPir toksini ile benzer özelliklere sahiptir (Praja ve Safnurbaiti, 2018). Enfeksiyondan 6 saat sonrasında enfekte karidesin solungaçları, hepatopankreası, bağırsakları, kasları ve hemolenfinde *V. parahaemolyticus* yayılımı görülmüştür, fakat kalbinde rastlanılmamıştır (Khimmaktohong ve Sukkarun, 2017).

AHPND üç aşamadan oluşmaktadır; ilk aşama, akut aşaması ve son aşama. İlk aşamada epitelyal hücreler tubuler lümene doğru uzar, vakuol boyutları kısalır ve aynı zamanda tubuler epitelyal hücrelerin deskuamasyonu artmaktadır. Hastalığın akut aşamasında tubuler epitelyum nekrotikleşmiştir. Hastalığın son aşamasında ise hepatopankreas tubullerinin orta doku katmanı birçok yangı reaksiyonu gösterir ve tubular epitelyum tamamen nekrotikleşmiştir (Praja ve Safnurbaiti, 2018).

**2.8. Türkiye’deki Su Ürünleri Arasında Karidesin Yeri**

Üç tarafı denizlerle çevrili bir ülke olarak Türkiye su ürünlerinde önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. 2020 yılında Türkiye İstatistik Kurumu internet adresi verilerine göre avcılık yoluyla yapılan toplam su ürünleri üretimi 364 bin 400 ton, yetiştiricilik üretimi ise 421 bin 411 ton olarak gerçekleşmiştir. Yine TÜİK (2021) verilerine göre Türkiye’de avlanan karides türlerini; Erkek karides (speckled shrimp), Jumbo karides (green tiger prawn), Karabiga karides (caramote prawn), Kırmızı karides (giant gamba prawn), Pembe karides (Çimçim-deep water rose prawn) oluşturmaktadır ve 2020 yılında toplamda 5204 ton karides avlanmıştır, bunların arasında sayıca en fazla avlanan karides türü 3514,7 tonla pembe karides (çimçim-deep water rose prawn) olmuştur. Ayrıca 2020 yılında 2019 yılı verilerine göre 67,4 ton karides avlanma sayısı artmıştır (TÜİK, 2021).

**2.9. Halk Sağlığı Açısından *Vibrio parahaemolyticus*’un Önemi**

Tüketiciler, gıda tedarikçileri, su ürünleri endüstrisi açısından ciddi dikkat gerektiren balıkların taşıyıcı rol oynadığı insanları etkileyen patojenik bir bakteridir (Noorlis ve ark, 2011). İnsanlar çiğ ya da az pişmiş deniz ürünlerini tüketerek ya da yara kaynaklı enfeksiyonlarla enfekte olabilmektedir, pişmiş yemeklerde çapraz kontaminasyon da bulaşmada ikinci bir araç olarak görülebilmektedir (Baker-Austin ve ark, 2018; Praja ve Safnurbaiti, 2018).

Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) bir kişinin 4 log ya da 50 hücre/g *V. parahaemolyticus*’un bir porsiyon deniz ürününden alınmasının hastalık yaratabileceğini raporlamışlardır (Mok ve diğerleri, 2019). Pişirme (Termal proses) *V. parahaemolyticus*’u gıdalarda azaltmanın en etkili yöntemlerinden biridir. Birçok çalışma *V. parahaemolyticus*’un ısıya karşı yüksek hassasiyet gösterdiğini belirlemiştir (Beuchat ve diğerleri, 1975; Vanderzant ve Nickelson, 1972). Vanderzant ve Nickelson (1972) çalışmalarında 2,7 ila 6,3 log/ml *V. parahaemolyticus* hücresi inokule edilmiş karides homojenatlarda 100 oC 1 dakika ısıtılınca *V. parahaemolyticus* hücrelerinin elimine olduğu raporlanmıştır. Bunu yanında termal proses su ürünlerinde duyusal olarak yan etkiler yaratabilir (Awuah ve diğerleri, 2007). Tüketici talebini karşılamak için su ürünlerinde minimum ısıl işlem, besin değerlerini ve duyusal değerlerini korumak ve yanında gelişen stratejilerle *V. parahaemolyticus*’u elimine etmek ya da su ürünlerini dekontamine etmek garanti edilmelidir. Bu stratejiler arasında buz kaplama, anında soğutma, dondurma, ısı şoku, irradyasyon, yüksek basınç prosesi ve doğal antimikrobiyal ajanların kullanılması vardır. Deniz ürünleri tüketimine bağlı enfeksiyon oluşturan *V. parahaemolyticus* riskiyle başa çıkarken kullanılan yöntemin seçme, uygulama ve etki derecesi çok önemlidir.

Uluslararası Gıda Mikrobiyolojik Spesifikasyonları Komisyonu (The International Comission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF), 2011, canlı ve çiğ deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunun 4 log kob/g ya da MPN/g’ı aşılmaması gerektiğini önermektedir.

Amerika’da su ürünlerinin güvenlik kontrolleri NSSP (National Syndromic Surveillance Program- Ulusal Sendromik Gözetim Programı) tarafından yapılmaktadır (U.S. FDA, 2017). Bu kontroller birincil üretimden, avlanmaya, işlenme, ambalajlama ve taşınmayı da içermektedir. NSSP için deniz ürünlerinin iç sıcaklığının < 10 oC, çevre sıcaklığının < 7.2 oC dağıtım ve depolanma aşamasında sıcaklık değerlerinde olması gerekmektedir.

Avustralya ve Yeni Zelanda’da su ürünleri güvenliği Gıdalar için Mikrobiyolojik Kriterler Özeti (Compendium of Microbiological Criteria for Food- Food Standarts Australia New Zealand, 2018) sayesinde sağlanmaktadır. Su ürünleri vasıtasıyla 4 log kob/g’dan fazla *V. parahaemolyticus* tüketilirse enfeksiyona yol açıp tehlikeli olabilmektedir. Su ürünleri çiğ tüketilecekse *V. parahaemolyticus* konsantrasyonu 2 log kob/g’dan fazla olmamalı ve işleme sırasında tespit edilemeyecek miktarda (< 3 kob/g) olmalıdır. *V. parahaemolyticus* üremesinin kontrol altında tutulabilmesi için avlanma sonrasında su ürünlerinin < 5 oC hızlıca düşürülmesi ve su ürünlerinin buzdolabı sıcaklığında tutulması gerekmektedir bu mikrobiyal kriterler Avustralya ve Yeni Zelanda’da gereklidir.

Japonya’da taze deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus* konsantrasyonu en fazla 2 log MPN/g olmalıdır (Hara-Kudo ve diğerleri, 2012). Bu patojenin üremesini engellemek amaçlı Japonya Sağlık, Çalışma ve Refah Bakanlığı (Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, MHLW) tarafından deniz ürünlerinin dağıtım ve depolama aşamasında < 10 oC sıcaklığında bulunması gerektiği belirtilmiştir (MHLW, 2010). Dondurulan deniz ürünleri çiğ tüketilecekse en az -15 oC ya da daha düşük sıcaklıklarda tutulmalıdır.

İngiltere’de istiridyelerde *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunun 3 log kob/g’dan fazla olması yüksek risk teşkil etmektedir, insan sağlığına potansiyel zarar verebilmektedir ve insan tüketimi için uygun değildir (U.K. Health Protection Agency, 2009). İngiltere’de insan tüketiminde kullanılacak su ürünlerinin *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunun < 20 kob/g düzeyinde olması gerekmektedir.

Kanada halk sağlığını korumak için su ürünlerinin güvenliğini düzenleyen mikrobiyolojik kriterleri gözden geçirme ve oluşturma sürecindedir (Health Canada’s Food Directorate, 2019). Bu sürecin bir parçası olarak Kanada Gıda Güvenliği Otoritesi, deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus*'u artırabilecek faktörler hakkında bilgi toplamaktadır. Buna ek olarak, bu otorite, bu patojenin su ürünlerinde avlanma, taşıma ve tüketim sırasındaki konsantrasyonlarını kontrol etmek için olası azaltma stratejileri hakkında da bilgi toplamaktadır.

Asya’da *V. parahaemolyticus* gıda kaynaklı hastalıkların ortak sebeplerindendir, genelde salgınlar düşük oranda olmaktadır, 10 vakadan daha az, fakat sıklıkla oluşmaktadır. 1994’ten beri Japonya’daki *V. parahaemolyticus* enfeksiyonlarının sıklığı azalmaktadır; bununla beraber bu organizmaya bağlı olarak 1280 enfeksiyon vakası 1994-95 arası raporlanmıştır ve bu periyotta *V. parahaemolyticus* gıda zehirlenmeleri *Salmonella* gıda zehirlenmelerinin sayısını geçmiştir. 1996’dan 1998’e 496 salgın ve 24.373 *V. parahaemolyticus* vakası raporlanırken 1999’dan 2005’e 25.211 vaka raporlanmıştır. Genel olarak salgınlar yaz aylarında yaygınlaşmakta ve Ağustos ayında pik yapmaktadır. Su sıcaklıklarının normalden daha sıcak olması salgınlarda etkili olmaktadır (WHO,FAO, 2011).

*V. parahaemolyticus*’un gıdalarla kontaminasyonunu önlemede, özellikle O3:K6 serotipi ile kontaminasyon halk sağlığı için önem taşımaktadır (Hara-kudo ve ark, 2001). *V. parahaemolyticus* yaz aylarında deniz ürünleri tüketimi ile tüm diyare vakalarının içinde % 50-70’ine sebebiyet verdiği düşünülmektedir (Cai ve ark, 2006). *Vibrio* spp. ‘nin önemi kontamine çiğ ve az pişmiş deniz ürünlerinde bulunan ve diyareyi de içeren akut gastroenteritis, baş ağrısı, kusma, bulantı ve ateşe sebebiyet verir (Noorlis ve ark, 2011). *V. parahaemolyticus*’un çoğu oluşturduğu enfeksiyon hafif ve sınırlıdır. Tüketimi takiben inkubasyon periyodu 12-24 saat aralığındadır, tipik olarak klinik belirtileri; karın ağrısı, ishal, mide bulantısı, baş ağrısı, ateş ve titremedir (Baker-Austin ve diğerleri, 2018).

Birden çok faktörün su ürünleri tüketimiyle enfeksiyon riskini etkilediği (örneğin; yetişme alanı, yetiştirme yöntemi, iklim değişiklikleri, aşırı doğa olayları, işleme ve soğuk zincir kontrolü) su ürünleri tedarik zincirindeki aşamalar başlangıçtan son ürüne su ürünlerindeki *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu etkilemektedir. Buna ek olarak, iklim değişiklinin direk ya da dolaylı olarak su ürünlerinin güvenliğini etkilediği böylelikle de halk sağlığını tehlikeye atmaktadır. Riski en aza indirmek amacıyla *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu kontrol etmek ya da kabul edilebilir seviyelere azaltmak için birçok uygulamalar geliştirilmiştir. Ancak bu stratejilerin çoğunlukla su ürünlerinin son aşama tedarik zincirine (ör: avlanma sonrası, depolama ve dağıtım) odaklandığı görülmüştür. *V. parahaemolyticus*’un su ürünlerinde ilk aşama tedarik zinciri (ör: yetişme çevresi) ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Su ürünlerinin güvenliği ile ilgili özellikle gelişmekte olan ülkelerde politikaları, yasal gereklilikleri ve kuralların geliştirilmesi gerektiği ve iklim değişikliğinin potansiyel etkileri dahil riski etkileyen ve denetim yoluyla uygulanmasının sağlanması faktörleri göz önüne alarak gözlem ve izleme çalışmaları yapılmalıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde kabul edilen deniz ürünleri avlanma politikasının uygulanması ve Japonya'daki deniz ürünleri ürünlerinin güvenliğini düzenleyen kılavuzlar vibriosis riskini azaltma çabalarına örnektir (Alvarez ve diğerleri, 2019; Hara-Kudo ve Kumagai, 2014). Su ürünlerinin uluslararası pazarlarda işlem görmesi nedeniyle su ürünlerinin ihracatçı ve ithalatçı ülkeler arasındaki güvenliğini düzenleyen standartların uyumlulaştırılmasını teşvik etmek için ek çabalar gerekmektedir (Ndraha ve diğerleri, 2020).

İklim değişikliğinin sıcaklığı, yağışı, rüzgarı ve gün ışığını içeren hava durumunu etkilediği düşünülmektedir. Sıcaklıkların değişmesi gıda kaynaklı patojenlerin gelişmesini ve kaynaklarını, konaklarını ve çevrelerini değiştirerek gıda güvenliğini etkilemektedir (Watts ve diğerleri, 2018). İklim değişikliği sebebiyle özellikle kıyı bölgelerinin hızlıca ısınması, bu bakterinin çevrenin ısınmasıyla sayısının artması, ısınan bölgelerde yara enfeksiyonları sayılarının gözlenmesi, kabuklu deniz ürünleriyle bağlantılı salgınların kutuplara yakın yerlerde gözlenmesi 2000’lerden bu yana bu süreci gözler önüne sermektedir (Baker-Austin ve diğerleri, 2018). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO) üye ülkelerin iklim değişikliği ile ilgili gıda kaynaklı hastalıkların arttığı konusunda bilgilendirilmesi ve yetkili mercilerin uyarılması, paydaşların gıda güvenliği konusunda birleşmesi iklim değişikliğinin etkilerinden sağlığın etkilenmesi azaltılmalıdır (WHO, 2019). Aynı şekilde Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu Avrupa’da deniz suyu sıcaklıklarının iklim değişikliği sebebiyle arttığını ve gıda kaynaklı patojenlerin, özellikle *Vibrio* spp., hayatta kalması, gelişmesi ve üremesini etkileyeceği bunun gıda güvenliği açısından bir potansiyel oluşturabileceği öngörülmektedir. Bu bulgular iklim değişikliğinin direkt ya da indirekt olarak özellikle su ürünlerindeki gıda güvenliğini etkilemektedir ve insan sağlığını tehdit etmektedir (Ndraha ve diğerleri, 2020). Gıda güvenliği ile ilgili endişeler tüketicilerin çeşitli ve sağlıklı gıdaları tercihleri yüzünden gün geçtikçe artmaktadır (Froelich ve diğerleri, 2017).

**2.9.1. Su Ürünlerinde *V. parahaemolyticus*’a Karşı Alınabilecek Önlemler**

Buz kaplama yöntemi deniz ürünlerini kırılmış buzla kaplamak anlamına gelmektedir. Asıl amaç su ürünlerinin avlandıktan sonra iç ısılarının en kısa sürede düşürülmesi ve gıda kaynaklı patojenlerin üremesinin önüne geçilmesidir. Çalışmalar buz kaplamanın su ürünlerinde patojenlerin üremesini geciktirdiğini fakat birkaç gün sonunda *V. parahaemolyticus*’u azaltma konusunda yetersiz kaldığını göstermiştir. Örneğin, Melody ve diğerlerinin (2008) yaptığı çalışmada *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunun istiridyelerde 14 gün buzla beraber tutulmasının ardından bakterinin 1 ila 2 log kob/g arttığını gözlemlemişlerdir. Buzla kaplama metodu su ürünlerinin hemen ardından soğuk depoya kaldırılmasıyla *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu azaltabilir. Gooch ve diğerleri (2002) buzla kaplama sonunda 3 oC’de 14 saat soğuk depoda tutulması sonucu *V. parahaemolyticus* sayısının istiridyelerde 0,8 log kob/g azaldığını tespit etmişlerdir. Deniz ürünlerinde buzla kaplama metodu *V. parahaemolyticus* gelişimini engellediği kanıtlanmasına rağmen Lydon ve diğerleri (2015) yaptıkları çalışmada patojenlerin buzlu suda da çoğalabildiklerini göstermişlerdir, bu sebeple su ürünlerinin uzun süre buzlu suda depolanması tavsiye edilmemektedir.

*V. parahaemolyticus*’un üremesi buzdolabı sıcaklığında (donma noktasından biraz yüksek sıcaklık) engellenmektedir. Jones ve diğerleri (2017) su ürünlerinin hemen soğutulduğunda (< 7 oC sıcaklıklar) *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunun hiç soğutulmayanlara göre daha düşük olduğunu raporlamıştır. *V. parahaemolyticus*’un < 10 oC sıcaklılarda gelişemediği inaktive olduğu tespit edilmiştir (Cook ve Ruple, 1989; Gooch ve diğerleri, 2002). Diğer çalışmalar da su ürünlerinin bir an önce soğutulmasının patojenin konsantrasyonunu azalttığını ve büyük önem arz ettiğini doğrulamışlardır (Cook ve Ruple, 1989; Jones ve diğerleri, 2017). Bu veriler ışığında su ürünlerinin avlanmasının akabinde soğutulmasının *V. parahaemolyticus* gelişiminde kritik engelleyici olduğu görülmüştür.

Dondurma metodu su ürünlerini donma noktasının altında bir sıcaklıkta tutmaktır. Muntada-Garriga ve diğerleri (1995) yaptıkları çalışmada 7 log kob/g *V. parahaemolyticus* içeren su ürünlerini 27 gün -18 oC’de, 28 gün -24 oC’de tutulduğunda *V. parahaemolyticus*’un tespit edilemeyecek orana düştüğünü tespit etmişlerdir. Bunun yanında Liu ve diğerleri (2009) dondurmanın su ürünlerinde *V. parahaemolyticus*’un yalnızca üremesini azalttığını gözlemlemişlerdir. Liu ve diğerleri (2009) yaptıkları çalışmada dondurucuda depolama süresinin arttıkça *V. parahaemolyticus*’un konsantrasyon oranını daha da azaldığını görmüşlerdir ve buz kristallenmesi etkisinden dolayı -10 oC’de depolamanın -20 ve -30 oC’lerden daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Dondurarak saklama gıda endüstrisinde sıkça kullanılan ve bakterilerin gelişmesini engelleyerek ürünün özelliklerini korumaktadır. *V. parahemolyticus*’un su ürünlerinde donma noktasının altında nasıl tepki verdiğinin bilinmesi gıda endüstrisi için güvenli su ürünleri sağlanmasına olanak sağlayacaktır. Çalışmalar suni olarak kontamine edilmiş su ürünleri ile yapıldığından canlı popülasyonun çeşitliliğini yansıtmamaktadır. Su canlılarının türlerine göre de bu durumun farklılık gösterebileceği hatta aynı türler içinde farklı cinslerin dondurarak saklamada *V. parahaemolyticus*’a verecekleri tepkiler belirsizliğini korumaktadır.

Depürasyon, su ürünlerini kontrollü koşullar altında temiz deniz suyunda tutma işlemidir (Chae ve diğerleri, 2009; Shen ve diğerleri, 2019). Chae ve diğerleri (2009) yaptıkları çalışmada 22 oC’de 48 saat deniz suyuyla yapılan depürasyon sonucu istiridyelerde 1,2 oranında *V. parahamolyticus* oranın azaldığı görülmüştür. Xi ve diğerleri (2014) laktik asit bakterilerinin (LAB) 5 gün boyunca 10 oC depürasyon sırasında kullanılması *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu 4,7’den 1,9 log kob/g’a düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Park ve Ha (2018) sodyum hipoklorit (NaClO) ve gama irradyasyonu kombinasyonu V. parahaemolyticus’a karşı soyulmuş istiridyelerde 2 kGy gama ışını ile 60 ppm NaClO uygulanarak *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu 3,6 kat azalttığını görmüşlerdir. NaClO’nun miktarını 80 ppm’e çıkarıp 2kGy gama ışını uygulandığında *V. parahaemolyticus* oranının soyulmuş istiridyede 2,2 katı azaldığı ortaya çıkmıştır.

Yüksek hidrostatik basınç, gıdalarda mikroorganizmaları inaktive etmek için basınç kullanılmasını içermektedir. Gıda proseslerinde yüksek basıncın kullanılması bazı enzim aktivitelerini ve protein sentezlerini engelleyebilmektedir (Yamamoto, 2017). Bu metot bir mikroorganizmanın hayatta kalmasından ve çoğalmasından sorumlu transkripsiyon, translasyon ve hücresel fonksiyonların bozulmasına neden olarak bazı bakterilerin hücre morfolojilerinin ve hücre zarının bozulmasına sebep olabilir (Rendueles ve diğerleri, 2011). Berlin ve diğerleri (1999) çalışmalarında 25 oC’de 10 dakika 200 MPa (megapascal) basınca maruz bırakılınca *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunun 6 kat azaldığı görülmüştür.

İrradyasyon gama ışınları, elekron ışını ya da X-ray kullanarak gıdadaki mikroorganizma konsantrasyonunu azaltan ya da elimine eden bir gıda teknolojisi prosesidir. Gama ışınlarının 3,0 kGy oranında su ürünlerine uygulanması sonucu *V. parahaemolyticus* oranının 6 kat azaldığı görülmüştür (Jakabi ve diğerleri, 2003).

*V. parahaemolyticus* konsantrasyonu oksitlenmiş elektrolize su sayesinde de azaltılabilmektedir. Bu tip su, yüksek derecede sulandırılmış tuzlu su (NaCl) solüsyonunun elektrolizi sonucu elde edilmektedir (Huang ve diğerleri, 2006; Quan ve diğerleri, 2010). Oksitlenmiş elektrolize suyun su ürünlerinde kullanımı Ren ve Su (2006) *V. parahaemolyticus* ile kontamine edilmiş oksitlenmiş elektrolize su (klor, 30 ppm; pH 2.82; oksidasyon-indirgeme potansiyeli 1.131 mV) %1 NaCl içeren oda sıcaklığında 4 ila 6 saat kullanılarak *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunun 1,1’den 1,6 kat oranında azaldığı görülmüştür.

Ayrıca deniz ürünleri 52 oC’deki suya en az 22 dakika (suyun kaynama süresi içinde) batırıldığında patojen konsantrasyonunun elimine olduğu görülmüştür. Ye ve diğerleri (2012) çalışmalarında canlı istiridyeleri 15 dakika 50 oC suda tutunca, suyun ısınma sıcaklığı dahil değil, patojen konsantrasyonunda 7 log MPN/g düzeyinde azalma görülmüştür.

Xi ve diğerleri (2012) soyulmuş istiridyeleri oda ısısında 2 saat yeşil çay ekstraktı (%10) içinde bekletince *V. parahaemolyticus*’un 4,7 MPN/g’dan 3,9 MPN/g’a düştüğü tespit edilmiştir. Yeşil çay gibi doğal antibakteriyel ajanların kullanılması su ürünlerindeki *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu azaltmaktadır. Bununla beraber doğal antibakteriyel ajanlar düşük sıcaklıklarda su ürünlerinde *V. parahaemolyticus*’u etkisiz hale getirmek için kullanışlı olabilir. Xi ve diğerleri (2012) soyulmuş istiridyelerin 5 oC’de %10’luk yeşil çay ekstraktı içinde depolanması *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu bir kattan daha çok azalttığı görülmüştür.

*V. parahaemolyticus* enfeksiyonlarının deniz ürünleri ile ilişkili olduğu birçok kaynakta bahsedilmiştir. Gıda güvenliği otoriteleri konuyla ilgili deniz ürünlerinin güvenliği ile ilgili politikalar, yasal gereklilikler ve yönergeler tesis etmişlerdir. Su ürünlerinin güvenliğini düzenleyen kurallar ve kılavuzlar Codex tarafından uluslararası düzeyde "Balık ve Balıkçılık Ürünleri Uygulama Kuralları ve Genel Gıda Hijyeni İlkelerinin Deniz Ürünlerindeki Patojenik *Vibrio* Türlerinin Kontrolüne Uygulanmasına İlişkin Kılavuzlar" kapsamında geliştirilmiştir (Codex, 2010, 2016).

**2.9.2. Karideslerde *Vibrio parahaemolyticus***

Vibriolar filtre ederek beslenen yumuşakçalar ve deniz kabuklularında daha yoğun görülür. Pişirmek bu organizmaları yok etmesine rağmen, deniz kabuklularının sıklıkla çiğ tüketilmesi, özellikle Amerika’da gıda kaynaklı *V. parahaemolyticus* enfeksiyonların sebeplerindendir (WHO,FAO,2011). Su ürünlerinin avlanma, işlenme ve hazırlanma aşamalarında diğer su ürünlerinden ya da deniz suyundan çapraz bulaşma yoluyla kontamine olabilmektedir (Makino ve diğerleri, 2003; Ndraha ve diğerleri, 2020). Diğer deniz ürünleriyle karşılaştırıldığında *V. parahaemolyticus* konsantrasyonları istiridyede %63.4, deniz tarağında %52,9, balıkta %51,0, karideste %48,3, midyede %28,0 oranlarında bulunmuştur (Odeyemi, 2016).

Çalışmalarda karides yemlerine sitrik asit, sorbik asit ya da formik asit eklenmesi minerallerden daha fazla yararlanılmasını sağladığı ve bağırsak yenilenmesini kolaylaştırdığı görülmüştür (Abu Elala ve Ragaa, 2015; He ve diğerleri, 2017). Ancak aynı zamanda asidik besleme patojenlerin virulans ve yaşam kapasitelerini de arttırabilmektedir, bu da *V. parahaemolyticus*’un yol açabileceği hem su canlılarında hem de insanlardaki enfeksiyöz hastalık olasılığını arttırmaktadır (Gu ve diğerleri, 2021).

Gıda asitleştiriciler su canlılarının büyümesini hızlandırmada kullanılmaktadır, fakat asitlerin su canlılarında patojenlerin virulans özelliklerini ve yaşam kabiliyetlerini nasıl etkilediği konusunda bilgiler kısıtlıdır. Gu ve diğerlerinin yaptığı çalışmada su canlılarının beslenmesinde organik ve inorganik asit eklenmesi sonucu *V. parahaemolyticus*’unsubletal (öldürücü olmayan) asit koşullarına (pH 5,5) adaptasyonu sağlandıktan sonra letal (öldürücü) asidik koşullarda (pH 4,0) yaşam kabiliyetinin, hareket kabiliyetinin ve sitotoksisitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Subletal asidik koşullarda *V. parahaemolyticus*’un iki ısı şok protein geninin (VP0651 ve VP0821) önemli ölçüde artarak yüksek sıcaklıktaki yaşam kabiliyetini arttırdığı görülmüştür. Bu veriler *V. parahaemolyticus*’un su canlılarında potansiyel salgın hastalık riskini arttırmakta olduğunu göstermektedir (Gu ve diğerleri, 2021).

Bakteriyal sekresyon sistemi, flagellar bileşenler ve bakteriyal kemotaksisi içeren virulansle ilişkili genler subletal asidik koşullarda artarak ortama uyum sağlamaktadır (Gu ve diğerleri, 2021).

**2.9.3. Su Ürünleri Endüstrisinde Antibiyotiklerin Bilinçsiz Kullanımı Sonucu Antimikrobiyal Direnç ve Halk Sağlığına Etkileri**

Antimikrobiyaller su ürünleri endüstrisinde enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır; bununla beraber antimikrobiyallerin geniş çaplı kullanımı su ürünleri üzerinde patojenlerde antimikrobiyal direnç gelişmesine sebep olmaktadır ve bu da birçok bilinen antimikrobiyalin etkisiz kalmasına neden olmaktadır (Xu ve ark, 2016). Antibiyotikler hayvan beslemede büyümeyi destekleyici ve hastalıkların kontrolü amaçlı da kullanılmaktadırlar. Günümüzde antibiyotiklerin kullanımı; antibiyotik dirençli bakterilerin görülmesi, su canlılarında antibiyotik kalıntılarının birikmesi ve su canlılarının immun sistemlerinin baskılanması gibi çevreye ve gıda zincirine birçok yan etkisinin oluşması sebebiyle antibiyotik kullanımı kısıtlanmıştır (Rosen, 1996; He ve diğerleri, 2017). Antimikrobiyal direnç (AMD) global halk sağlığı ve gıda güvenliği anlamında henüz fark edilememiş bir tehdittir. Kullanılan birçok antibiyotik uzun süre enfeksiyonların kontrolünde etkili olamamaktadır. Ziraat ürünlerinde, su ürünlerinde ve hayvansal diğer ürünlerde antibiyotiklerin aşırı ve yanlış kullanımı AMD’nin ortaya çıkmasını ve yayılmasını tetiklemektedir Antimikrobial kalıntıların çevrede bulunması da bakterilerde AMD oluşumunu arttırabilmektedir. Su ürünlerinde, bakteriyel enfeksiyonların kontrolü ve balık çiftliklerinde büyümenin hızlanması için antibiyotikler kullanılmaktadır. Antibiyotik uygulaması genel olarak yemlerine ve sularına büyümelerinin hızlanması için ve patojenik bakterilere karşı tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Tan ve diğerleri, 2017). Antibiyotik uygulanan hayvanlar antibiyotiğe dirençli bakterilerin üretiminde ve yayılımında rezervuar görevi görmektedirler (Abu Elala ve Ragaa, 2015).

Antimikrobiyal dirençlilik ve zoonotik hastalıklar direkt olarak gıda güvenliğiyle ilişkilidir ve ayrıca iklim değişikliğinden etkilenmesi beklenmektedir (WHO, 2019). İklim değişikliğinden kaynaklanan çeşitli değişiklikler, insan, hayvan ve vektör davranışları ve değişen patojen, organizma ve haşere hayatta kalma, büyüme ve bulaşma davranışları dahil olmak üzere gıda güvenliğini etkileyen davranışları etkilemektedir (Tirado ve diğerleri, 2010).

Ortaya çıkan zoonoz riski, patojenlerin hayatta kalmasındaki değişiklikler ve hayvanlarda vektör kaynaklı hastalık ve parazitlerin değişmesi, çiftçilerin karşılaştığı artan zorluklarla mücadele etmek için veteriner ilaçlarının kullanımının artmasını gerektirebilir. Bu daha sonrasında hayvansal kökenli gıdalarda veteriner ilaç kalıntı seviyelerinde bir artışa neden olabilmekte ve muhtemelen halk sağlığına zararlı etkileri olabilmektedir (Tirado ve diğerleri, 2010). Hayvansal kökenli gıdalardaki veteriner ilaçlarının artan kalıntı seviyeleri, yalnızca insan sağlığı için akut ve kronik riskler oluşturmakla kalmaz, aynı zamanda insan ve hayvan patojenlerinde antimikrobiyal dirençteki artışla doğrudan bağlantılıdır. Antibiyotik dirençli hastalıklar ve bakterilerin artmasıyla, insanlar daha duyarlı hale gelecek ve iklim değişikliğiyle insan davranışları da bu hassasiyete katkı sağlayacaktır (WHO, 2019).

İklim değişikliği yüzünden 2030 ve 2050 yılları arasında yıllık 250.000 kişinin ek olarak ölümüne sebep olacağı düşünülmektedir; ölümlerdeki artışa gıda güvenliğinin de katkı sağlaması beklenmektedir (WHO, 2014). Bu sayı iklim değişikliği ile 2050 için hesaplanan değişen beslenme ve vücut ağırlığı değerleri sonucunda belki de yılda yaklaşık 500.000 kişinin ek ölümüne sebep olabilmektedir (Springmann ve diğerleri, 2016).

**2.9.3.1. *Vibrio* spp. için Antimikrobiyal Dirençlilik**

Su canlılarında hastalığa sebep olan birçok *Vibrio* türü ve geçmişte antibiyotiklerin aşırı kullanımı sonucu AMD (Anti Mikrobiyal Direnç) *Vibrio* türleri sayısında belirgin bir artış yaşanmıştır (Tan ve diğerleri, 2017). *Vibrio* spp. enfeksiyonları tedavisinde önerilen antibiyotikler; tetrasiklinler (doksisiklin, tetrasiklin gibi), florokinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin), üçüncü jenerasyon sefalosporinler (sefotaksim, seftazidim, seftriakson), aminoglikozidler (amikasin, apramisin, gentamisin, streptomisin), folat yolu inhibitörleri (trimetoprim-sülfametoksazol)’dür (Baker-Austin ve diğerleri, 2018). *V. parahaemolyticus*’un ampisilin, streptomisin, kanamisin, tetrasiklin ve siprofloksasin’e dirençli olduğu rapor edilmiştir (Xu ve diğerleri, 2016).

Bakteriyal türlerde çoklu antibiyotik dirençliliği (ÇAD) özellikle bakteriyal hücreler birçok antibiyotiğe karşı dirençli hale geldiğinde diğer bir zorlayıcı faktör oluşmaktadır. Çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indeksi, a / b formülü kullanılarak da belirlenir; burada "a", belirli izolatın dirençli olduğu antibiyotik sayısıdır ve "b", test edilen toplam antibiyotik sayısıdır (Krumperman, 1983). Bakterilerde ÇAD gelişmesine; kromozomal DNA mutasyonu, enzimatik inaktivasyon, konjugasyon gibi değişimler gibi birçok mekanizma sebebiyet vermektedir. Kinolonlar, sefalosporinler, tetrasiklin, sefotaksim, seftazidim ve penisilinler non-kolera *Vibrio* spp. enfeksiyonlarının tedavilerinde sıklıkla tavsiye edilmektedir. Kinolonların kullanımı *Vibrio* türleri üzerinde genellikle etkili olurken; tetrasiklin ve sefalosporinler etkisiz kalmaktadır. Su ürünleri endüstrisinde, tetrasiklin, eritromisin, sulfanamitler, oksitekrasiklinler, klortetrasiklinler ve amoksilin kullanımı Malezya, Miyanmar, Filipinler gibi bazı Asya ülkelerinde serbestken, nitrofuran, kloramfenikol ve dimetridazol/metronidazol gibi diğer antibiyotikler çoğu ülkede kullanımı yasaklanmıştır (Tan ve diğerleri, 2017). Antimikrobial direnç, özellikle çoklu ilaç direnci, hastalıkların yönetimi ve kontrolü ile direkt bağlantılı olarak önemli halk sağlığı problemleri arasındadır. Bu sebeple nesnel bir şekilde antimikrobiyal dirençliliğini değerlendirecek izleme sistemine ihtiyaç vardır (Xu ve diğerleri, 2016).

Amerika’da CDC antimikrobiyal dirençliliğin izlenmesi *Campylobacter, Salmonella, Shigella, E. coli* O157ve *V. cholerae* dışındaki *Vibrio* türleri Ulusal Antimikrobiyal Dirençliliği İzleme Sistemi (National Antimicrobial Resistance Monitoring System-NARMS) tarafından takip edilmektedir (Humphries ve Linscott, 2015). 2009’da CDC yıllık olarak NARMS’ın parçası olarak yıllık *V. cholerae* dışındaki *Vibrio* türlerini izlemeye almıştır. 2011 yılında %95,1 oranındaki *V. alginolyticus* izolatlarının ampisiline dirençli olduğu görülürken %40,3 oranında *V. parahaemolyticus*’a ve %4,8 oranında *V. vulnificus* izolatlarının dirençli olduğu görülmüştür (CDC, 2013). 2011’de test edilen hiçbir izolatın florokinon ya da tetrasiklinlere dirençli olmadığı ve izolatlardan % 0,3’ünün de trimetoprim-sulfametokzol’e dirençli olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal tedavi Vibriosis hastalığıyla başa çıkmaktan ziyade hastalığın süresini kısaltıp hastalığın şiddetini azaltmaya yardımcı olmaktadır. *V. cholerae* olmayan *Vibrio* türleri ile diyare olan bireylerde vücudun kendiliğinden iyileştiği görülmüştür. *Vibrio, Enterobacteriacea* gibi benzer yöntemle duyarlılık açısından test edilebilir. CLSI tarafından halofilik türleri hem disk difüzyon yöntemi hem de broth mikrodilüsyon yöntemi ile test etmek için %0,85 NaCl solüsyonu ile inokulum hazırlanması önerilmektedir (CLSI, 2010).

Bununla beraber karideslerde AHPND ile ilişkili PirAvp ve PirBvp’den oluşan Photorabdus insect-related (Pir) toksinleri bulunmaktadır. *V. parahaemolyticus*’un moleküler düzeyde teşhisinde bu genler toksinde kodlanmış şekilde hedef olarak aranırlar. Şimdiye kadar *V. parahaemolyticus* enfeksiyonu tedavisinde antibiyotikler ve sıvı desteği tedavisi uygulanmaktaydı, fakat bazı su kaynaklı *V. parahaemolyticus* izolatlarının antibiyotiklere dirençli olduğu görüldü böylece deniz canlıları üzerinde antibiyotik uygulamalarının kontrol edilmesi gerektiği ve alternatif terapi yöntemlerinin uygulanmasının *V. parahaemolyticus* enfeksiyonunun kontrol altına alınması için önemli olduğu görülmüştür (Praja ve Safnurbaiti, 2018).

**2.10. *Vibrio* Türlerinde Kullanılan İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri**

**2.10.1. Kültüre Bağlı Yöntemler (Geleneksel-Klasik Metot)**

Genellikle numuneden *V. parahaemolyticus* izolasyonu için kültür bazlı ya da moleküler bazlı metotlar kullanılmaktadır. Kültür bazlı metotta *V. parahaemolyticus* varlığı numuneler MPN(En Muhtemel Sayı) metoduna göre numaralandırılır ya da agardan koloni sayımı yöntemiyle yapılmaktadır, bunu da identifikasyon testleri (ör: oksidaz aktivitesi, Gram boyama, NaCl triple sugar iron testi, halofilizm testi, analitik profil indeks testi ve slayt aglutasyon testi) takip etmektedir (Deepanji ve diğerleri, 2005). MPN ile kültür bazlı metodun sonucu birim hacim ya da örnek ağırlığı cinsinden olmaktadır. Ancak, patojeni tespit etmede geleneksel yöntemin kullanılması 7-10 gün arası uzun süre almaktadır ve yoğun iş yükü gerektirmektedir. Bunun yanında bu metot az sayıda patojeni tespit etmede kullanılamamaktadır (Ndraha ve diğerleri, 2020).

*Vibrio* spp. klinik örneklerden tipik olarak kolaylıkla kültüre edilebilir. Tiyosülfat sitrat safra tuzları sükroz (Thiosulfate citrate bile-salts sucrose (TCBS) agar genel olarak seçici izolasyon ve *Vibrio* spp. alt kültürleri için standart besi yeridir. Suşlar sükrozu metabolize ederek *V. cholerae* ve *V. alginolyticus* için TCBS agarda sarı koloniler, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* ve *V. vulnificus* için yeşil koloniler oluşmaktadır. *V. parahaemolyticus* izolasyonunda kanlı agar ve CHROMagar gibi diğer besi yeri türleri de kullanılabilmektedir (Baker-Austin ve diğerleri, 2018).

Geçmiş yıllardaki teknolojik gelişmeler sayesinde numunelerden *V. parahaemolyticus* tespiti önemli miktarda kolaylaşmıştır. Bununla beraber numuneden *V. parahaemolyticus* tespiti izolasyonda kullanılan substratlar, izolasyon metotları, tespit metotları ve örnek alma metotları gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir (Givens ve diğerleri, 2014). Örneğin kromojenik besi yerinin kullanılması (CHROMagar *Vibrio* ya da Bio-Chrome *Vibrio* medium) TCBS besi yerinin kullanılmasından *V. parahaemolyticus* koloni izolasyonunda daha etkili olduğu görülmüştür (Duan ve Su, 2005; Pinto ve diğerleri, 2011). Duan ve Su (2005) çalışmalarında *V. parahaemolyticus* tespitinde doğruluk ve spesifite olarak kromajenik besi yerinin sırasıyla %84 ve %94 oranında olduğunu ve TCBS besi yerinin doğruluk ve spesifite olarak sırasıyla %54 ve %77 olduğunu raporlamışlardır. Benzer olarak Pinto ve diğerleri (2011) yaptıkları çalışmada kromojenik besi yerinin doğruluk ve spesifite olarak sırasıyla %88 ve %95 TCBS besi yerinde yapılan çalışmada ise doğruluk ve spesifite oranının sırasıyla %51 ve %71 olduğunu raporlamışlardır. Ayrıca kültür bazlı metotların *V. parahaemolyticus*’un “görülebilen fakat kültüre edilemeyen (VBNC)” özel fizyolojik formu yüzünden etkin şekilde tespit edilmesini ve sayılmasını mümkün kılmayabilmektedir (Coutard ve diğerleri, 2007; Wong ve Wang, 2004). Buna ek olarak MPN (En Muhtemel Sayı) metodu, konvansiyonel fenotipleme ve biyokimyasal identifikasyon testleri daha fazla zaman, daha fazla materyal ve daha fazla iş yükü oluşturmaktadır (Letchumanan ve diğerleri, 2014).

*V. parahaemolyticus* enfeksiyonu riskini azaltmak için etkili kontrol önlemleri oluşturmak ve gıdaların güvenliğini sağlamak, gıdalarda ve çevrede *V. parahaemolyticus*'un saptanması için etkili analitik yöntemler mevcut olmalıdır. *V. parahaemolyticus*’un gıdalardan izolasyonu için seçici zenginleştirme sıvıları; alkali peptonlu su (Alkaline peptone water-APW) ya da tuzlu polimiksin broth (Salt polymyxin broth-SPB) ve zenginleştirici kültür TCBS agar yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer bakteriler için, seçici zenginleştirmeden önce seçici olmayan zenginleştirmenin, çeşitli çevresel streslerden yaralanan bakterilerin saptanmasında etkili olduğu gözlenmiştir (Hara-Kudo ve diğerleri, 2001). Deniz ürünlerinde TCBS agarda sükrozu fermente eden bakteriler tarafından sarı renge dönüştüğünde diğer bakterilerden *V. parahaemolyticus* kolonilerini gözle ayırt edilmesi zordur. Daha etkili bir metot olarak; seçici olmayan ve seçici besi yeri kullanılarak iki aşamalı zenginleştirme ve kromojenik agar besi yerine ekim yapılabilmektedir. Bu besi yeri geleneksel yöntemle TCBS agarda şeker fermantasyonunu kullanmak yerine, özellikle *V. parahaemolyticus*’u diğer bakterilerden ayırmayı sağlayan beta galaktosidaz için substrat içeren kromojenik substratı kullanarak ayırt edilmesini sağlamaktadır. Diğer suşlar ya koloni oluşturmazlar ya da farklı renkte koloniler oluşturarak ayırt edilebilirler. Tablo 3’te de gösterildiği üzere TCBS agarda yeşil koloniler oluşturan *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* ve *V. vulnificus*’tan kolayca ayırt edilemez. TCBS agardaki koloniler inkubasyon sonunda oda sıcaklığında 24 saat bırakıldığında yeşil-siyah renge dönüşebilmektedir, fakat CV agarda aynı koşullarda renk değişimi yaşanmadığı gözlemlenmiştir. CV agarda *V. parahaemolyticus* mor, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* soluk mavi ve *V. alginolyticus* süt beyazı koloniler oluşturmaktadırlar (Hara-Kudo ve diğerleri, 2001).

Sükrozu fermente eden bakteriler asit üreterek zamanla agarda yayılarak agarın rengini yeşilden sarıya kadar değiştirebilir. *V. parahaemolyticus* kolonileri sarı ile kaplanmış sükrozu fermente eden bakterilere yakındır, *V. parahaemolyticus* kolonilerinin yeşilden sarıya ya da sarı- yeşil renkte görünmesine sebep olabilir, bu da *V. parahaemolyticus*’un diğer bakterilerden ayrılmasını zorlaştırabilmektedir. *V. alginolyticus* gibi sükrozu fermente edip TCBS agarı sarı renge dönüştüren bakteriler zaman zaman *V. parahaemolyticus*’un sarı rengin altında kalmasına sebep olabilmektedir (Hara-Kudo ve diğerleri, 2001).

**Tablo 3.** Çeşitli bakterilerin CV agar ve TCBS agarda koloni morfolojileri (Hara-Kudo ve diğerleri, 2001).

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Türler | Test edilen suşların sayısı | CV agar | | TCBS agar | |
| Koloni büyüklüğü | Koloni rengi | Koloni büyüklüğü | Koloni rengi |
| *V. alginolyticus* | 4 | 5-6 | Süt beyazı | 3-4 | Sarı |
| *V. cholerae O1* | 2 | 3 | Soluk mavi | 3 | Sarı |
| *V. hollisae* | 1 | 4 | Süt beyazı | 3 | Yeşil |
| *V. mimicus* | 2 | 3-4 | Soluk mavi | 1-2 | Yeşil |
| *V. parahaemolyticus* | 68 | 3-5 | Mor | 2-4 | Yeşil |
| *V. vulnificus* | 1 | 5 | Soluk mavi | 1 | Yeşil |

Koloni büyüklüğü değerleri milimetre cinsindendir.

Kültüre bağlı tanı metotları mikroorganizmaları izole etmek ve kimliğini saptamak amacıyla canlı ve kültüre edilebilen formlarda uygulanmaktadır. DNA bazlı ve immünolojik metotlarda kültüre edilmek gerekmeksizin, DNA bütünlüğü bozulmadığı, hücresel hasar görmediği sürece izolasyon ve kimliği saptamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu sebeple DNA bazlı immünolojik metotlar hedef hücrelerin ölü ya da canlı olup olmadığı konusunda bilgi vermemektedir. (Doğruer ve Telli, 2020). *V. parahaemolyticus*’un geleneksel tanı metodu sıvı besi yerlerinde zenginleştirilen sonrasında kültür ortamında seçilen kolonilerin izolasyonu ile olmaktadır, ne yazık ki deniz ürünlerinde kültür metodunu kullanarak tespit edilmesinde birçok problem ortaya çıkmaktadır; geleneksel yöntem metodu için 3 gün gerekmekte ve pozitif identifikasyon için 7 gün gerekmektedir (Cai ve diğerleri, 2006).

**2.10.2. Kültürel Olmayan İzolasyon ve İdentifikasyon**

Geçmiş yıllardaki teknolojik gelişmeler sayesinde moleküler bazlı tekniklerle su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* tespit etme yeteneği artmıştır (yüksek hassasiyet, özgüllük ve kolaylık) (Letchumanan ve diğerleri, 2014). Birçok araştırmacı polimeraz zincir reaksiyon (PCR)- spesifik primerler kullanılarak moleküler bazlı metotları kullanarak hızlı, doğru ve deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus*’u tespit etmede yüksek spesifiteye sahiptir. Hızlı, yüksek doğrulukta, virulans spesifik gelişen tespit metotları *V. parahaemolyticus*’un su ürünlerinden tespitini kolaylaştırmaktadır. *V. parahaemolyticus*’un taşıdığı virulens faktörlerinin (ör: *tdh* ve/veya *trh* genleri) tespiti ve miktarının belirlenmesi halk sağlığı açısından güvenilir yüksek önem taşımaktadır (Letchumanan ve diğerleri, 2014). Doğru tespit ve patojenin su ürünlerindeki miktarının bilinmesi risk yönetimi uygulamasında doğru risk tahmini yapılmasına olanak sağlayacaktır. Bunun yanında, bu amaca ulaşmak için çeşitli zorluklar ortaya çıkabilir, çünkü su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* tespitinde kullanılan izleme yollarının düzenlenmesinin mevcudiyetine ve yeterliliğine finansal destek ve insan kaynakları gerekmektedir (Ndraha, 2020). Moleküler epidemiyolojik çalışmalar, belirli hemolizin genlerine (*tdh*, *trh* veya her ikisi) sahip olma ile hastalığa neden olma yeteneği arasında güçlü bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur ve bu genlerin önemli virülans geni olduğu gerçeğini desteklemiştir (Kishishita ve diğerleri, 1992). Buna rağmen bazı klinik suşlar bu virulans genlerin hiç birini taşımayabilmektedir. Bu nedenle, organizmanın klinik ortamda ve enfeksiyon kaynağı olduğundan şüphelenilen gıda örneklerinden izolasyonu ve ardından izole edilen suşların tanımlanması, *V. parahaemolyticus*'a bağlı gastroenterit araştırmalarında hala standart prosedürdür. PCR yöntemi *V. parahaemolyticus*'a özgü nükleotid dizisinin saptanmasına izin veriyorsa, organizmanın tanımlanmasını kolaylaştırabilir (Kim ve diğerleri, 1999).

*V. parahaemolyticus* hücreleri fiziksel stres ve açlık durumlarında canlı fakat çoğalamayan (Viable but not-culturable- VBNC) forma geçerler (Cai ve diğerleri, 2006). Son yıllarda gelişen PCR-bazlı çalışmalar bir ya da birden fazla tanımlanmış hedef gen ile çeşitli örneklerden *V. parahaemolyticus* identifiye edilmesini sağlamaktadır (Ward ve Bej, 2006). *V. parahaemolyticus* tespit edilebilmesi tür içinde suş tayini için PCR’da *toxR* geni, thermostable direct hemolysin (*tdh*) geni ve tdh-related hemolysin (*trh*) geni hedeflenmektedir (Cai ve diğerleri, 2006). Mikroorganizmanın gıdada ölü ve canlı formlarının ayırt edilmesi hastalık yapma potansiyelinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Mikroorganizmaların birçoğu üreme için uygun olmayan düşük sıcaklık ya da pH değerleri gibi olumsuz çevre koşullarında canlı fakat çoğalamayan (VBNC) forma dönüşmektedirler. Gıda kaynaklı VBNC patojenler stres koşulları ortadan kalktığında çoğalıp virülans özellik gösterip insan sağlığı için risk oluşturabilmektedirler (Doğruer ve Telli, 2020).

*V. parahaemolyticus* ve birçok benzer bakteri düşük sıcaklık gibi çeşitli çevresel faktörlerden etkilenerek hasar görebilirler (Jiang ve Chai, 1996). Stres altındaki bakterinin seçici zenginleştirme besi yerinde üremesi zordur (Ray ve diğerleri, 1978). Bu bulgular doğrultusunda öncelikle Tripton Soya Broth (TSB) gibi seçici olmayan besi yeri ile zenginleştirme yapıp sonrasında seçici besi yerine geçiş yapılırsa hasar gören hücreler de kendilerini yenilemiş olmaktadır. İki aşamalı zenginleştirme uygulamak *V. parahaemolyticus* suşlarının ürettiği TDH ve TRH’yi izole etmek için daha uygun ortam sağlamaktadır, çünkü bu patojenik suşlar, izolasyon prosedürü sürecinde toplam *V. parahaemolyticus* hücrelerine benzer şekilde davranabilmektedirler (Hara-Kudo ve diğerleri, 2001).

Tanımlama amacıyla, iyi korunmuş ve filogenetik ilişkiyi yansıtan bir nükleotid dizisinin kullanılması idealdir. rRNA dizileri genellikle bu amaç için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, *V. parahaemolyticus* ve ilgili türler arasındaki rRNA dizisi homolojileri o kadar yüksektir ki, rRNA dizisi yukarıda açıklanan amaç için uygun görünmemektedir. Örneğin, *V. parahaemolyticus* ve *Vibrio alginolyticus*'un 16S rRNA dizileri %99 aynıdır (Ruimy ve diğerleri, 1995). *gyrB* geni, DNA replikasyonu için gerekli olan DNA girazının B alt birimini kodlar. *V. parahaemolyticus* ve *V. alginolyticus* arasındaki *gyrB* dizilerinin homolojisi %86,8'dir oranındadır. Bu nedenle, son zamanlarda karideslerde *V. parahaemolyticus*'un spesifik tespiti için gyrB genini hedef alan bir PCR prosedürü geliştirilmiştir (Kim ve diğerleri, 1999).

PCR metodunda, spesifik DNA segmenti saatler içerisinde verilen en az altı emirlik faktörle güçlendirilir, bu sebeple düşük konsantrasyondaki bakterileri tespit etme yeteneğine sahiptir. Numunelerden *V. parahaemolyticus* tespiti *toxR* geni varlığı ile tespit edilmektedir (Deepanji ve diğerleri, 2005; Suffredini ve diğerleri, 2014). Bu patojen için bir diğer işaretçi termolabil hemolizin (*tlh*) genidir (Suffredini ve diğerleri, 2014; Taiwo ve diğerleri, 2017). *toxR* ya da *tlh* genlerinin varlığı virulens faktör olduğunun göstergesi değildir; aslına bakıldığında bu genler numunede toplam *V. parahaemolyticus* konsantrasyonu belirlemede kullanılmaktadır (Bej ve diğerleri, 1999; Letchumanan ve diğerleri, 2014). Birçok çalışma patojenik suşların varlığını termostabil direkt hemolizin (TDH) (*tdh*) ve/ya da TDH-ilişkili hemolizin (*trh*) genlerini hedefleyerek tespit edildiğini söylemektedir (Barrera-Escorcia ve diğerleri, 2016; Bej ve diğerleri, 1999; Mok ve diğerleri, 2019). Numunelerden *V. parahaemolyticus* spesifik gen varlığı doğrulaması agaroz jelde PCR ile yapılmaktadır. Geleneksel yöntemle (ör: En Muhtemel Sayı-MPN metodu) kombine olarak PCR kullanmak yüksek doğrulukta toplam ve patojenik *V. parahaemolyticus* tespitini sağlamaktadır, ayrıca tüm izolasyon süreci 2 günde tamamlanmaktadır (Jones ve diğerleri, 2014).

Diğer moleküler metotlar; DNA hibridizasyonu (Givens ve diğerleri, 2014; Jones ve diğerleri, 2009) ve Loop-mediated isothermal amplification assay (Cao ve diğerleri, 2019; Kampeera ve diğerleri, 2019) patojeni tespit ve identifiye etmede kullanılmaktadır.

**2.10.2.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time Polymerase Chain Reaction –PCR-PZR) Yöntemi ile İzolasyon ve İdentifikasyon**

Real-Time PCR gıda kaynaklı patojenleri tespit etmek için geniş kapsamlı, hızlı ve sayısal analizleri sağlar (Bilung ve diğerleri, 2015; Cai ve diğerleri,2006). Sistem reaksiyon ilerlerken kopyalanmış DNA topluluğunu gösterir ve ürün özelliklerini reaksiyon odasını açmadan yürütmenin değerlendirmesini sağlar, zamandan tasarruf sağlar ve taşınma kaynaklı kontaminasyon riskini azaltır. PCR karışımının içinde floresan işaretçilerini kullanarak her döngüden sonra DNA sayısını ölçer. Floresan taşıyıcılar hedef DNA sırası varlığında sinyal üretir; nonspesifik dsDNA boyalı olanlara bağlanır ya da boyalı moleküller PCR primerlerine ya da problarına bağlanır (Bilung ve diğerleri, 2015).

Konvansiyonel PCR’ın daha ileri aşaması Real-Time PCR’dır, numunede *V. parahaemolyticus* tespitinin eş zamanlı yapılmasını sağlar (Davis ve diğerleri, 2017; Paranjpye ve diğerleri, 2015). Bu metot aynı zamanda nicel (quantitative) PCR (qPCR) olarak bilinmektedir; eş zamanlı olarak fazla sayıda numuneden hızlı, doğru ve tutarlı spesifik gen tespitine olanak vermektedir. Real-Time PCR, PCR sonrası adımları gerektirmez, sonuçlar genom eşdeğeri sayılarla ifade edilir ya da her birimdeki hacim ya da numune ağırlığı kopyaları ile ifade edilmektedir (Davis ve diğerleri, 2017; Paranjpye ve diğerleri, 2015). Birçok çalışmada primerleri çoklu hedef türlerini-spesifik genleri tespit etmede, toplam ve patojenik *V. parahaemolyticus* suşlarını numaralandırmada multiplex Real-Time PCR’ı başarılı şekilde kullanmıştır (Kim ve diğerleri, 2008; Nordstrom ve diğerleri, 2007; Panicker ve diğerleri, 2004).

Genel PCR uygulamasında olduğu gibi; örnek DNA, DNA polimeraz, nükleotidler ve nükleotit sekansı bir tüpte birleştirilir. Karışım daha sonra bir dizi zamanlı ısıtma ve soğutma döngüsüne tabi tutulur. Isıtma DNA'yı denatüre eder ve tek iplikçiklere ayırır. Karışım soğudukça, primerler hedeflenen DNA sekansını tanır ve bağlanır. DNA polimeraz daha sonra primerleri uzatmak için nükleotitleri kullanır, böylece hedeflenen fragmanın iki kopyası (amplifikasyon) oluşturulmaktadır (Kafa, 2019).

Denatüre etme, bağlanma ve uzatma döngülerinin tekrarlanması, hedef DNA fragmentlerinin sayısında üstel bir artış sağlar ve çok kısa sürede milyonlarca kopya oluşturmaktadır. Hedef dizi mevcut değilse amplifikasyon gerçekleşmez (Kafa,2019). Genomik DNA karışımdan direkt olarak ayrılır ve Real-Time PCR için kullanılır (Wang ve diğerleri, 2013).

Floresanla işaretlenmiş TaqMan proplarla Real-Time PCR çalışmaları konvansiyonel PCR çalışmalarına göre daha fazla spesifiklik sağlamaktadır. *V. parahaemolyticus* için Real-Time PCR, TaqMan probu kullanarak tek locus (*tdh*) ya da multiplex formatta dual loci (*tdh ve toxR*) hedefleyerek başarılı sonuç alınabilir. Toplam ve patojenik *V. parahaemolyticus*’u kapsamlı (comprehensive) metodu saptamak ve belirlemek için multipleks formatta tek reaksiyonda ikiden fazla loci (hedef) içermesi gerekmektedir, tek çalışmada patojen suşlarını belirlemek için birden çok virulens faktörün hedef seçilmesi daha kullanışlı, zaman kazandırıcı ve ekonomiktir (Ward ve Bej, 2006).

Real-Time PCR’ın kullanılması konvansiyonel PCR’ın kullanılmasından hem daha hızlı ve daha doğru sonuç vermektedir (Niu ve diğerleri, 2018). Hız ve doğruluk su ürünleri tüketimi sonucu *V. parahaemolyticus* enfeksiyonlarını önlemede, patojenin varyasyonlarını belirlemede sonuçlar gıda güvenliği risk tahmininde önem teşkil etmektedir (FAO/WHO, 2011).

Patojenik *Vibrio parahaemolyticus* izolatları, *tdh* ve *trh* gen dizilerini kopyalayarak PCR bazlı yöntemler kullanılarak tanımlanır (Yoh ve diğerleri, 1995). Bununla beraber Jones ve diğerleri (2012) yaptıkları çalışmada tüm klinik *V. parahaemolyticus* izolatlarının % 27'sinin *tdh* ve *trh*'ye sahip olmadığını tespit etmişlerdir. *V. parahaemolyticus* suşlarının patojenitesi serotiplerine bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Salgınlardaki serotipler çoğunlukla O3:K6, O1:KUT ve O4:K68 serotiplerine bağlı oldukları görülmüştür (Jones ve diğerleri, 2012; Nair ve diğerleri, 2007). Xu ve diğerlerinin (2014) yaptıkları çalışmada karides örneklerinden O2 serovar predominant serotip olarak tespit edilmiştir. *V. parahaemolyticus*'un *tdh* toksin genini hedef alan primer ve prob dizileri ayrıca *V. mimicus* ve *V. hollisae* suşlarının *tdh* genlerine de hibridize olmaktadır. Benzer şekilde *V. parahaemolyticus’*u tespit eden trh geni primer ve prob dizileri, *Aeromonas veronii*, *V. anguillarum* (önceki ismi *Listonella anguillarum*) ve *V. alginolyticus* suşlarının *trh* genlerinin dizilerinde tespit edilmiştir (Eschbach ve diğerleri, 2017). *tdh* / *trh* genlerini barındıran *V. parahaemolyticus*'un test edilen tüm hedef suşlarından sadece *V. parahaemolyticus* VN-0070 suşu negatif olduğu görülmüştür, büyük olasılıkla *trh* psödogen içindeki iç nükleotid silinmelerinden kaynaklanmaktadır (Bechlars ve diğerleri, 2015).

**3. GEREÇ VE YÖNTEM**

**3.1.Gereç**

**3.1.1. Numunelerin Temini**

Aydın İli şehir merkezindeki balıkçılardan ve Kuşadası Balık Hali’ndeki balıkçılardan 11.11.2019-11.12.2019 tarihleri arasında 200-300 g arası toplanan taze Çimçim (*Palaemon serratus*), Jumbo (*Penaeus japonicus*) ve Tiger (*Penaeus semisulcatus*) tipi karidesler kullanıldı. Numuneler kilitli plastik poşetlerle buz aküleri ile soğuk zincir altında 2 saat içerisinde Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilip analiz edildi.

**3.1.2. İzolasyon ve İdentifikasyon Besiyerleri**

Toplanan karides örneklerini ön zenginleştirme için Alkali Tuzlu Peptonlu Su (Alkaline Saline Pepton Water), kültür için Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS), izolatların ileri saflaştırma işlemi için Nutrient Broth ve Nutrient Agar, antibiyogram testi için Müller-Hinton Agar besi yerleri kullanıldı. Tablo 4’de kullanılan besi yerleri detaylı olarak gösterilmektedir.

**Tablo 4.** *V. parahaemolyticus*’un klasik kültürel yöntemle izolasyonunda kullanılan besiyerleri

Alkali Tuzlu Peptonlu Su (Alkaline Saline Pepton Water) (Oxoid, CM1117, İngiltere)

Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) (Oxoid, CM0333B, İngiltere ve Liofilchem, 611010, İtalya)

Nutrient Broth (Oxoid, CM0501, İngiltere ve Neogen, LAB068, Amerika)

Nutrient Agar (Oxoid, CM0309, İngiltere ve Neogen, LAB008, Amerika)

Müller-Hinton Agar (Oxoid, CM0337, İngiltere)

**3.1.3. DNA Ekstraksiyon Kiti**

DNA Ekstraksiyonunda Roche Light Cycler 480 ile ABI Prism 7700 Sequence Detector ve LightCycler 480 Software (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Almanya) kiti kullanıldı.

**3.1.4. Primerler**

*V. parahaemolyticus* türüne özgü TLH (Termolabilhemolizin) genlerinin bulunması *tlh* primerleri (F:5’-ACTCAACACAAgAAgAgATCgACAA ve R:5’-gATgAgCggTTgATgTCCAA) ve *tlh* prob (5’-6FAM-CgCTCgCgTTCACgAAACCgT- -TMR) kullanılarak tespit edildi.

**3.1.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri**

Real-Time PCR ile pozitif sonuç veren örnekler için antibiyotik duyarlılığı testi için disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık testi için 6 adet antimikrobiyal diskten yararlanılmıştır. Bunlar; penicillin G (10 unit), klindamisin (2 µg), piperasilin (100 µg), amoksisilin-klavulanik asit (30 µg), siprofloksasin (5 µg) ve gentamisin (10 µg)’dir.

**3.1.6. Kullanılan Cihazlar**

**3.1.6.1. Stomacher Cihazı**

Alkali tuzlu peptonlu su ile karides örnekleri stomacher poşetinde Bagmixer, Interscience, Fransa cihazı ile homojenize edildi.

**3.1.6.2. Vortex**

Nutrient broth ve izolatların bulunduğu ependorflar Vortex V-1 Plus, Biosan, Letonya ve MS1 Shakers, IKA®, Almanya cihazları ile homojenize edildi.

**3.1.6.3. Block Heater Cihazı**

DNA ekstrasyonu aşamasında SBH 130D, Stuart®, İngiltere cihazı kullanılmıştır.

**3.1.6.4. Santrifüj Cihazı**

Santrifüj işlemleri için 24 örnek kapasiteli Mikro 200R, Hettich®, Almanya santrifüj cihazı kullanıldı.

**3.1.6.5. TaqMan Real-Time PCR Cihazı**

StepOne Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Amerika kullanılarak Real-Time PCR çalışmaları yapıldı.

**3.2.Yöntem**

**3.2.1. *Vibrio parahaemolyticus*’un Fenotipik İdentifikasyonu**

Normal koşullarda *Vibrio*’lar sıcak yaz aylarında kendilerini belli ederler, ancak küresel ısınmanın etkileri yüzünden aylarda yaşanan ısı değişimleri *Vibrio*’ların rastlanma aylarını değiştirmektedir. Çeşitli zenginleştirme ve ekim yöntemleri incelenerek *V. parahaemolyticus*’u izole etmek için doğal yolla kontamine olmuş karidesler kullanılmıştır. Bu yüzden taze karides örnekleri 2019 yılı Kasım ve Aralık aylarında Aydın İli şehir merkezi ve Kuşadası’ndaki balıkçılardan temin edildi. Her örnek (200-300 g) alındığında steril plastik paketlere konuldu. Örnekler balıkçılardan alındıktan sonra soğuk zincir korunarak + 4 oC’de buz aküleriyle 2 saat içerisinde laboratuvara getirilip incelenmeye başlandı. Tüm karidesler incelenirken kabuklarından ayrıldı. *Vibrio* türlerinin belirlenmesi amacıyla 25 g kabuklarından ayrılmış taze karides örnekleri 225 ml Alkali Tuzlu Peptonlu Su (Oxoid, CM1117) ile stomacher poşetine konularak 60 saniye boyunca stomacher cihazında (Bagmixer, Interscience, Fransa) homojenize edildi.

25 g örnek, 225 ml Alkali Tuzlu Peptonlu Su’da 24 saat 37 oC’de inkübe edildikten sonra bu zenginleştirme sıvısından 1 ml Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) (Oxoid, CM0333B) agara öze ile transfer edildi ve tekrardan 37 oC’de 24 saat inkübe edildi. Bu besi yerinde üreyen 2-3 mm çapında ve sükroz negatif olduğu için yeşil ile mavi-yeşil renkteki kolonilerden 2 adet her bir örnekten seçildi. Seçilen koloniler %3 NaCl içeren Nutrient Brotha (Oxoid, CM0501) geçilerek 37 oC’de 24 saat inkübe edildi ve pozitif olan (bulanıklaşan) brothlardan Nutrient Agar’a (Oxoid, CM0309) öze ile geçiş yapıldı. 37 oC’de 24 saat inkübe edilerek oluşan kolonilerden tekrar Nutrient Brotha geçiş yapılarak ileri saflaştırma işlemleri uygulandı. %80 oranında Nutrient Brothlardaki şüpheli kolonilerden ve %20 oranında gliserin ependorf tüplerine konularak Real-Time PCR ile işleme alınıncaya kadar -20 oC’de saklandı (Tan ve diğerleri, 2020).

**3.2.1.1. *Vibrio parahaemolyticus* Suşlarının Canlandırılması**

-20 oC’de muhafaza edilen numuneler tekrar çalışmak için oda sıcaklığında çözündürülüp %3 NaCl içeren Nutrient Brotha geçiş yapılarak 24 saat 37 oC’de izolatlar canlandırıldı ve üreme gözlenen Nutrient Brothdan Nutrient Agara öze ile geçiş yapıldı, 24 saat 37 oC’de inkübasyona bırakıldı, gelişen koloniler seçilerek tekrar Nutrient Broth’a geçiş yapılarak 24 saat 37 oC’de inkübe edildi.

**3.2.2. *Vibrio parahaemolyticus*’un Genotipik İdentifikasyonu**

**3.2.2.1. DNA Ekstrasyonu**

Real-time PCR ile onaylama işlemi için DNA izolasyonu Roche (Letgen) firmasının talimatları doğrultusunda yapıldı. Bu amaçla *High Pure PCR Template Preparation* kiti ile çalışıldı ve sırasıyla;

1. Liyofilize haldeki Proteinase K (pembe kapak) 4,5 ml distile su eklenerek alikotlandı.
2. İnhibitör Removal Buffer (siyah kapak) 20 ml etanol eklenerek hazırlandı.
3. Wash Buffer (mavi kapak) 80 ml etanol eklenerek hazırlandı.
4. 1,5 ml lik ependorf tüplere sıvı besiyerinde çoğaltılmış bakteri süspansiyonundan 200 µl alındı. Örneklere 5 µl Lizozim ilave edilip 37 oC’de 30 dk inkübasyona bırakıldı ve 5 dk’lık arada alt üst edilerek karıştırıldı.
5. İnkübasyondan sonra üzerlerine 200 µl Binding Buffer eklenerek iyice mix edildi.
6. 10 dk 70 oC’de inkübasyona bırakıldı ve daha sonra her tüpe 100 µl isopropanol eklendi ve pipetle mix edildi (DNA’ların çökmesi sağlandı).
7. Örnek sayısı kadar collection tüp çıkarıldı ve her birine filter tüp yerleştirildi.
8. Hazırlanan bu karışım collection tüplere aktarıldı ve 8000x g’de 1 dk santrifüj edildi.
9. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collectionlara alındı.
10. Her tüpe 500 µl inhibitör removal buffer eklendi (siyah kapak) ve 8000x g’de 1 dk santrifüj edildi.
11. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collectionlara alındı.
12. Her tüpe 500 µl wash buffer (mavi kapak) eklendi ve 8000x g de 1 dk santrifüj edildi.
13. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collectionlara alındı.
14. Her tüpe 500 µl wash buffer (mavi kapak) eklendi ve 8000x g’de 1 dk santrifüj edildi.
15. Collectionlardaki sıvı döküldü ve tekrar 13000x g’de 10 saniye spin yapıldı.
16. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler 1,5 ml’lik ependorflara alındı.
17. Her tüpe önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 72 oC’de bekleyen elution buffer’dan 200 µl eklendi (elutionları çalışmaya başlamadan önce 72 oC’ye kaldırıldı) ve 8000x g de 1 dk santrifüj yapıldı.
18. Filtreli tüpler atıldı ve DNA’lar ependorfdadır.

**3.2.2.2. PCR Mastermiks Hazırlanması**

Stok solüsyon her bir numune için; *tlh* forward’dan 0,5 µl, *tlh* reverse’den 0,5 µl, *tlh* probe’dan 0,2 µl, Mastermiks’ten 10 µl, distile su 4,8 µl olmak üzere toplamda 16 µl olarak hazırlandı ve 4 µl numunelerin DNA’larından eklenip Real-Time PCR cihazına yerleştirildi.

**3.2.2.3. Real-Time PCR Uygulaması**

DNA’ların tüplere alınması ile birlikte uygulanacak olan PCR kondüsyonlarıEschbach ve diğerleri (2017)’e göre yapıldı. Tüm PCR çalışmaları, deniz ürünlerinin matrislerine duyarlılıkları, özgüllükleri ve performansları açısından uyum sağlamaktadır.

Bu amaçla; tüm Real-Time PCR analizleri, TaqMan prob prensibine göre (Holland ve diğerleri, 1991), Roche Light Cycler 480 ile ABI Prism 7700 Sequence Detector ve LightCycler 480 software (Roche Diagnostics, Deutschland GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak yapıldı ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kontrol olarak kullanıldı. Urasil *N*-glikozilaz (Uracil *N*-glycosylase-UNG) önceki çalışmalarla çapraz kontaminasyonu önlemede rol aldı. Tüm PCR analizleri için bir PCR programı 50 oC’de 2 dakika UNG aktivasyonu, 95 oC’de 10 dakika ilk denaturasyon, 95 oC’de 20 saniye 45 döngülük denaturasyon, 60 oC’de 30 saniye annealing ve 72 oC’de 20 saniye extension aşamalarını içermektedir. Temel ayarlar arasında 60oC'lik bir annealing sıcaklığı ve 80 ile 240 baz çifti arasında bir amplifikasyon uzunluğu vardır. Nükleotid BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) kullanılarak primer ve prob dizilerinin çapraz hibridizasyonu hariç tutuldu (Eschbach ve diğerleri, 2017).

Tek bir PCR siklus;

95°C’de 10 dk başlangıç denatürasyonu,

95°C’de 20 sn ve 40 siklus denatürasyon,

58°C’de 30 sn yapışma (annealing),

72°C’de 10 sn uzama (extension) uygulandı ve *Vibrio* *parahaemolyticus* sentetik plazmid, pozitif kontrol olarak kullanıldı.

**3.2.3. Antibiyogram Uygulaması**

Real-Time PCR ile *Vibrio* *parahaemolyticus* olarak pozitif reaksiyon vermiş izolatların antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi disk difüzyon ile penisilin G (10 unit), klindamisin (2 µg), piperasilin (100 µg), amoksisilin-klavulanik asit (30 µg), siprofloksasin (5 µg) ve gentamisin (10 µg) kullanılarak tespit edildi (Tan ve diğerleri, 2017). Bu dirençlilik, klindamisin, piperasilin, amoksisilin-klavulanik asit, siprofloksasin ve gentamisin için Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü (M45-A2-CLSI, 2010) kılavuzuna göre tespit edildi ve penisilin G ve klindamisin CLSI kılavuzunda olmadığı için dirençli kabul edildi.

Antibiyotik seçimi, klinik uygulamalarda sık kullanımlarına ve *Vibrio* spp. (*V. cholerae* içermeyen) için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) M45 kılavuzuna göre yapıldı (CLSI, 2010). Disk duyarlılık testi, CLSI M45 yönergelerine göre yapıldı (CLSI, 2010). Kısaca, direkt koloni süspansiyonu 0,5 McFarland standardına eşdeğer şekilde ayarlanmıştır. İnokulum Mueller-Hinton Agara (MHA, Merck, Almanya) eşit şekilde steril svap ile petriye ekilmiştir ve 5-10 dakika antibiyotik diskleri petriye koymadan kuruması beklendi. Ardından 35 oC’de 16-20 saat inkubasyona bırakıldı. *Escherichia coli* ATCC 25922 disk difüzyon testlerinin doğruluğunu izlemek için bu çalışmada kalite kontrol organizması olarak kullanıldı.

Zon oluşan her antibiyotik disk etrafındaki inhibisyon bölgesinin çapı en yakın milimetrede ölçüldü. Tablo 5’te verildiği gibi bölge çapı değeri, her bir izolatı CLSI tavsiye değerlerine göre duyarlı (susceptiple-S), orta (intermediate-I) ve dirençli (resistant-R) olarak sınıflandırmak için kullanıldı (CLSI, 2010).

**Tablo 5.** CLSI disk difüzyon standart zon çapı değerleri (mm) (CLSI, 2010)

Antibiyotikler Disk Difüzyon S I R

Amoksisilin-Klavulanik Asit 20/10 µl ≥18 14-17 ≤13

Gentamisin 10 µg ≥15 13-14 ≤12

Piperasilin 100 µg ≥21 18-20 ≤17

Siprofloksasin 5 µg ≥21 16-20 ≤15

Penisilin G 10 ünite - - -

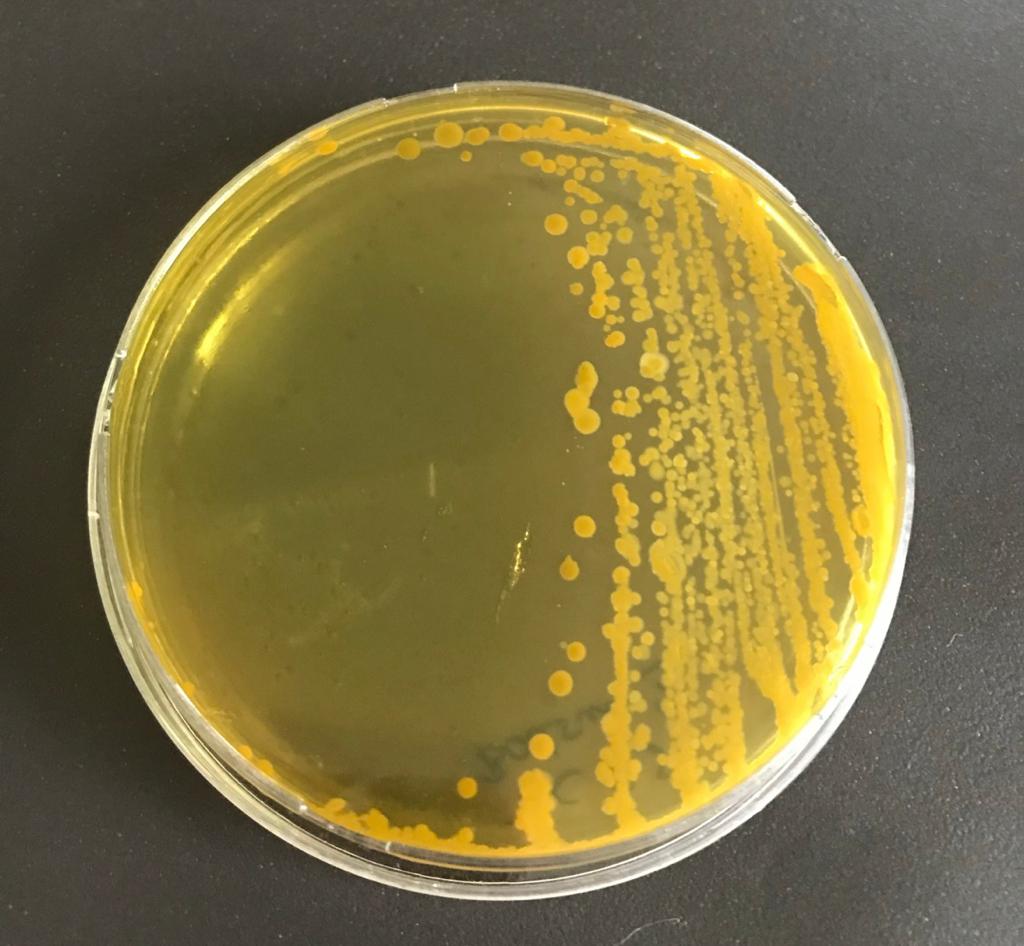
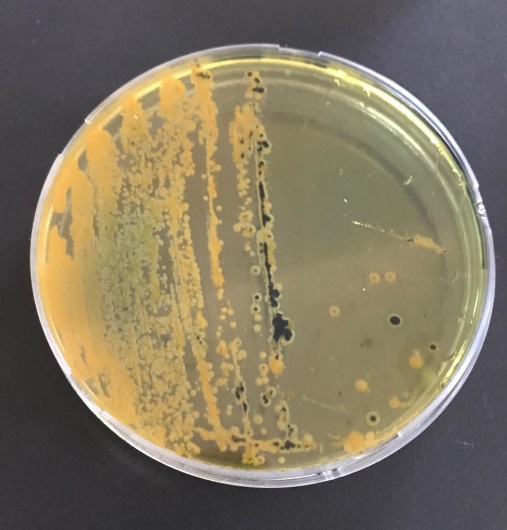
Klindamisin 2 µg - - -

**4. BULGULAR**

Bu çalışmada, Aydın İli şehir merkezindeki balıkçılardan ve Kuşadası Balık Hali’ndeki balıkçılardan toplanan 90 adet karides örneğinden *Vibrio parahaemolyticus’*un izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirildi.

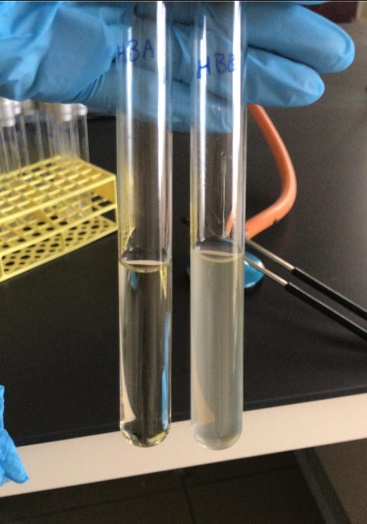
**4.1. Klasik Kültürel Yöntem Sonuçları**

Çalışmada toplanan 90 adet karides numunesinden 40 tanesi (%44,4) TCBS agarda *V. parahaemolyticus* şüpheli olarak değerlendirildi (Resim 1). *V. parahaemolyticus* şüpheli 40 karides numunesinden 23’ü (%57,5) Jumbo (*Penaeus japonicus*), 16’sı (%40) Çimçim (*Palaemon serratus*), ve 1’i Tiger (%2,5) (*Penaeus semisulcatus*) karides olduğu görüldü. Her bir şüpheli petriden 2 adet koloni alınarak toplam 80 izolat ile ileri saflaştırma işlemleri uygulandı.

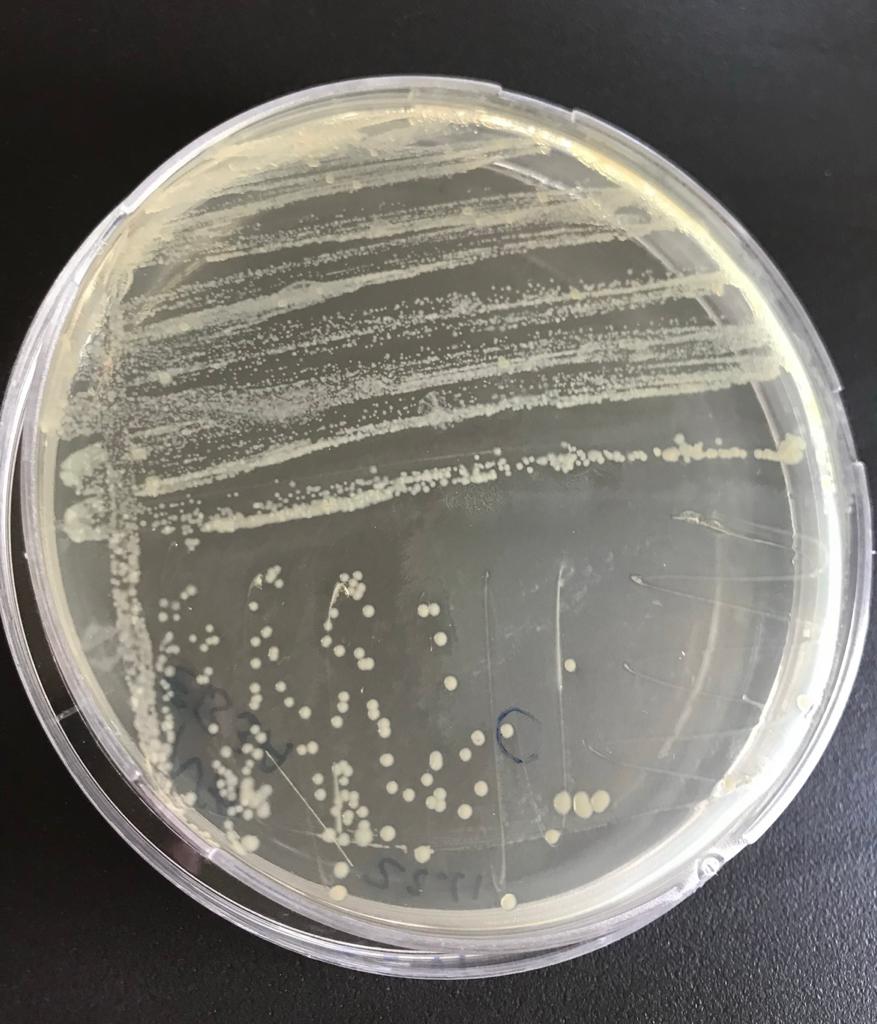
**** ****

**Resim 1.** TCBS Agarda şüpheli (sağdaki yeşil-mavi koloniler) ve şüpheli olmayan koloniler (soldaki)

TCBS agardaki şüpheli kolonilerden Nutrient Brotha dublike geçiş yapılarak, 37 oC’de 24 saat inkübasyon sonucunda kolonilerin saflaştırılması yapıldı (Resim 2).

****

**Resim 2.** Nutrient brothda bulanıklaşmanın olduğu bir örnek.

****Nutrient Broth’da bulanıklaşmanın (üremelerin) görülmesi ile birlikte Nutrient Agara öze ile geçiş yapılarak 37 oC’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Koloni oluşan petrilerden Resim 3’de görüldüğü gibi tek düşen koloniler seçilerek Nutrient Brotha geçiş yapıldı ve 37 oC’de 24 saat inkübasyon uygulanarak bakteride ileri saflaştırmaya gerçekleştirildi.

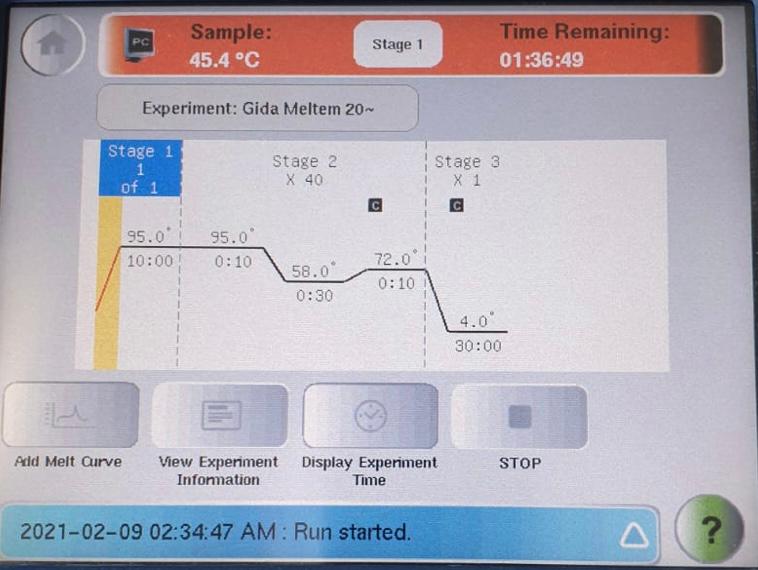
**Resim 3.** Nutrient agarda kolonilerin görünümü

Konvansiyonel yöntemlerle elde edilen izolatlar, Real-Time PCR ile analize alınıncaya kadar %20 gliserollü cryotüplerde -20 ˚C’de muhafaza edildi.

**4.2. Real-Time PCR Sonuçları**

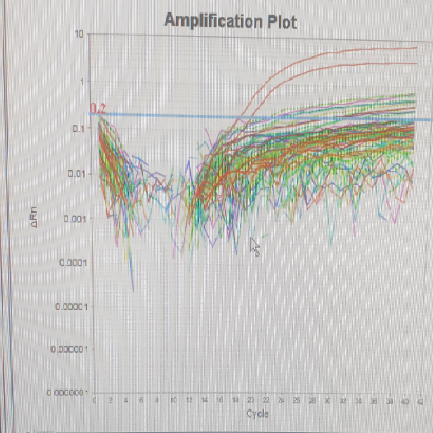
Analizler sonucunda 90 adet örnekten konvansiyonel yöntemle tespit edilen 40 adet izolatın (%44,4) Real-Time PCR ile doğrulaması yapıldı (Tan ve diğerleri, 2020).

İzolatların Real-Time PCR siklus aşamaları Resim 4’teki gibidir.

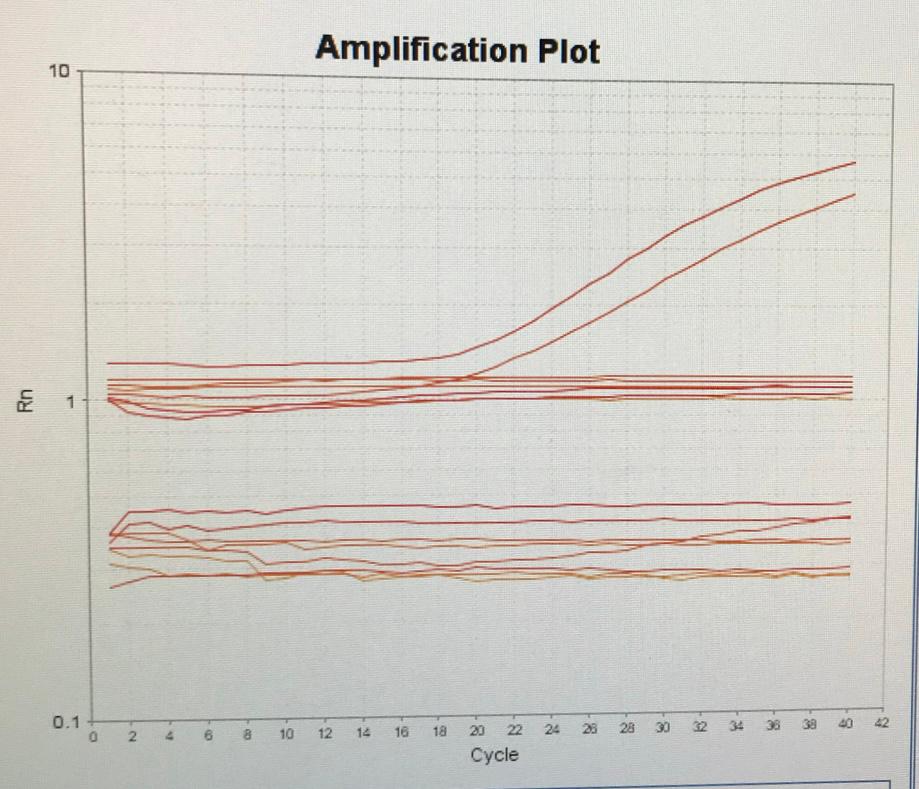
****

**Resim 4.** Real-time PCR Siklusu

Şüpheli 40 adet izolattan, 11 adedi (%27,5) real-time PCR ile *Vibrio* *parahaemolyticus* olarak pozitif sonuç alındı. Pozitif çıkan 11 karides örneğinden 5’inin (%45,4) Jumbo karides (*Penaeus japonicus*) ve 6’sının (%54,5) Çimçim karides (*Palaemon serratus*) olduğu görüldü. Real-Time PCR görüntüleri Resim 5 ve 6’da gösterilmektedir. Her bir örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol dublike çalışıldı.

****

**Resim 5.** Real-Time PCR sonuçlarına göre, pozitif kontrol, negatif kontrol ve pozitif örneklere ait amplifikasyon görüntüsü

****

**Resim 6.** Real-Time PCR’dapozitif kontrollere ait amplifikasyon görüntüsü

**4.3.Antibiyogram Sonuçları**

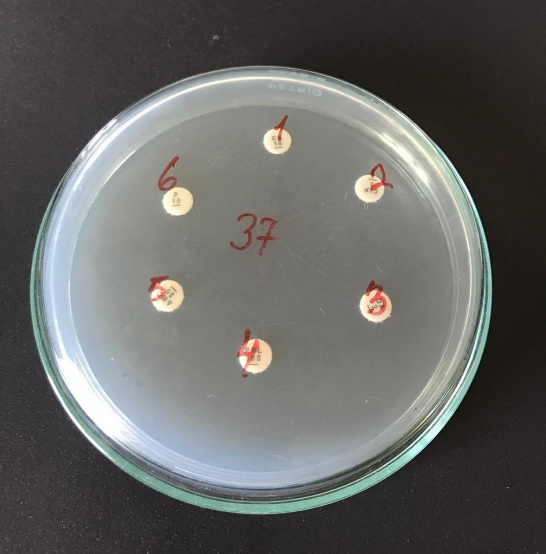
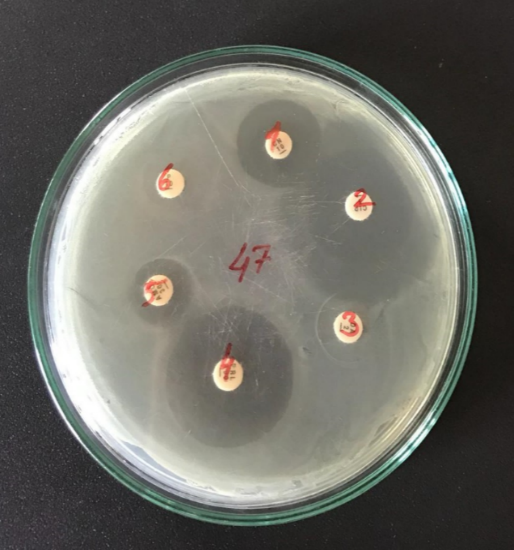
Real-Time PCR ile*Vibrio* *parahaemolyticus* pozitif sonuç veren izolatların antibiyotik dirençlilikleri Tablo 1’de özetlendi. Bu sonuçlara göre *V. parahaemolyticus* izolatlarının penisilin G (10 ünite) ve klindamisine (2 µg) %100 oranında dirençli bulundu. *V. parahaemolyticus* izolatları piperasilin (100 µg), siprofloksasin (5 µg) ve gentamisine (10 µg) %90,9 oranında duyarlı bulundu. *V. parahaemolyticus* izolatları amoksisilin-klavulanik asite (30 µg) %45,4 oranında dirençli, %36,3 oranında orta derecede duyarlı bulundu. Bir izolat ise, kontrol edilen tüm antibiyotiklere çoklu direnç gösterdi. Bu izolatın Çimçim karides (*Palaemon serratus*) örneklerinden biri olduğu görüldü. Çalışmadaki her *V. parahaemolyticus* izolatının antibiyotik direnç profilinin 0.33 ile 1 arasında değişen Çoklu Antibiyotik Direnç İndeksleri olduğu görüldü.

CLSI (2010) standardında Penisilin G ve Klindamisin antibiyotikleri için değer belirtilmemiştir. Penisilin G ve klindamisin antibiyotikleri tüm izolatlarda zon oluşturmadı ve antibiyotiklere dirençli kabul edildi. Tablo 6’da Real-Time PCR’da *V. parahaemolyticus* pozitif sonuç veren izolatların antibiyogram test sonuçları S:Duyarlı, I:Orta Derecede Duyarlı, R:Dirençli olarak değerlendirildi.

**Tablo 6.** Real-Time PCR ile*Vibrio* *parahaemolyticus* olarak onaylanmış izolatların antibiyotik dirençlilikleri, (CLSI, 2010).

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Antibiyotik** | **İz\*4** | **İz6** | **İz10** | **İz33** | **İz37** | **İz41** | **İz42** | **İz45** | **İz47** | **İz49** | **İz76** |
| Penisilin G | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Klindamisin | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| Piperasilin | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S |
| Amoksisilin-Klavulanik asit | I | R | R | I | R | I | R | S | S | I | R |
| Siprofloksasin | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S |
| Gentamisin | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S |

**\***: İzolat, R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta Derecede Duyarlı

**  
Resim 7.** Disk difuzyon yöntemi ile izolatlara ait antibiyotik dirençlilikleri (soldaki çalışmada kullanılan tüm antibiyotiklere dirençli izolat, sağdaki birden fazla antibiyotiğe duyarlı izolatlardan biri)

**5. TARTIŞMA**

Yeni yakalanmış karideslerin bakteriyel florası balıklarınkine benzerlik gösterir. Dominant florayı *Micrococcus*, Coryneformlar, *Moraxella*, *Acinetobacter* ve *Pseudomonas*’lar oluştururken düşük oranda *Flavobacterium*, *Cytophaga* ve *Bacillus* türlerini de içermektedir (Diler ve Ataş, 2003). Putro ve diğerleri (1990) kabuklu su ürünlerinin raf ömürlerinin düşük olmasının en önemli sebebini biyokimyasal bozulma olarak belirlemişler ve kabukluların balıktan daha çok serbest aminoasit içerdiğinden dolayı bakteriyel gelişmeye ve bozulmaya daha yakın olduklarını ileri sürmüşlerdir. Bu özelliklerinden dolayı karideslerin ister hasat edilsin, isterse yakalansın, en kısa sürede dondurulmalı ya da kaynatılmalıdır. *Vibrio* türleri Gram negatif, fakültatif anaerobik, spor oluşturmayan, tek polar flagellaya sahip hareketli, kavisli çubuklardır (Yaashikaa ve diğerleri, 2016). *Vibrio* türleri halofilik bakteriler olup çoğunlukla deniz ortamında, nehir ağızlarında ve su ürünlerinde yaşamaktadırlar (Jiang ve diğerleri, 2019). *Vibrio*’lar 10 °C-30 °C’ler ve %5 ile %30 tuzluluk değerleri arasında optimal üreyebilmektedir (Weissfeld, 2014). *Vibrionaceae* ailesinden çok azı *Vibrio* içeren sularla direk temas veya bu ürünlerin sindirim sitemi ile alınması sonucunda mide-bağırsak rahatsızlıkları, ya da naso-komiyal sistem rahatsızlıkları ile yara enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (Huehn ve diğerleri, 2014). Makino ve diğerlerine (2003) göre *V. parahaemolyticus* suşları içinde Tip III Sekresyon Sistemin (T3SS) varlığı *V. parahaemolyticus* patojenitesi ile yakından ilişkili virulans faktörlerden biridir. Birçok gıda kaynaklı patojende olduğu gibi *V. parahaemolyticus*’da da üreaz bulunması, üreyi hidrolize eden ve konakçı içindeki yakın çevrede pH'ı arttıran bir enterovirülan faktör olarak tanımlanmaktadır (Berutti ve diğerleri, 2014).

*Vibrio* cinsi 100’den fazla tür içerirken, bunlardan sadece 12’sinin insan hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir (Jones, 2017). Bunlar (*Vibrio cholerae*, *V.* *carchariae*, *V.* *mimicus*, *V.* *vulnificus*, *V.* *metschnikovii*, *V.* *parahaemolyticus*, *V.* *cincinnatiensis*, *V.* *alginolyticus*, *V.* *hollisae*, *V.* *furnissii*, *V.* *damsel*, *V.* *fluvialis*) halk sağlığını genellikle kontamine taze ve az pişirilmiş su ürünlerinin tüketimi ile tehdit etmektedir (Putro ve diğerleri, 1990). Gıda kaynaklı hastalıkların çoğunluğuna *Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus* ve *Vibrio vulnificus* neden olmaktadır (WHO ve FAO, 2020). Buna ek olarak küresel ısınmaya bağlı olarak patojenik *Vibrio* spp. kaynaklı enfeksiyonların sayısının gün geçtikçe artması beklenmektedir (Martinez-Urtaza ve diğerleri, 2010). Vibriosisin insidensi iklim değişikliği ve deniz suyu sıcaklığının artmasıyla artış göstermektedir (Baker-Austin ve diğerleri, 2018). En sık görülen semptomlar sulu ishal, karın ağrısı, mide bulantısı, kusma, baş ağrısı, ateş ve soğuk terlemedir (Humphries ve Linscott, 2015). Kolera, gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde sanitasyonun yetersiz ve temiz içme suyuna ulaşımın güç olduğu yerlerde görülürken kolera olmayan *Vibrio* spp. gelişmiş ülkelerde okyanus sıcaklıklarının artmasıyla vibriosis sık görülmektedir (Baker-Austin ve diğerleri, 2018). Sıcaklıkların artması *V. parahaemolyticus*’un çoğalmasını hızlandırmaktadır ve inkubasyon periyodunu kısaltmaktadır; 26 oC’de mikroorganizmanın 10 saatte 50 katına ve 24 saatte 790 katına çıktığı görülmüştür (Gooch ve diğerleri, 2002). 1996-2008 yılları arasında diğer gastrointestinal enfeksiyon oluşturan patojenlerin sayısı azalmakta ya da aynı kalmaktayken *Vibrio* enfeksiyon sayılarının %47 oranında arttığı bunların da %55’lik kısmını *V. parahaemolyticus*’un oluşturduğu laboratuvar sonuçlarıyla ortaya çıkmıştır (CDC, 2009). Bu konuda su sıcaklıklarının normalden daha yüksek seyretmesi salgınlarda sorumlu bulunmuştur. Şili’de 2004 yaz ayından önce hiç *V. parahaemolyticus* enfeksiyonu rapor edilmemiştir, edilememesinin nedeni nadiren 16 °C’ye çıkan düşük okyanus sıcaklıklarıdır (FAO ve WHO,2020). CDC’nin 2011 raporuna göre *Vibrio* spp. sebepli gıda kaynaklı hastalıkların %116 arttığı ve yaklaşık 45.000 vaka ile vakaların çoğunun *V. parahaemolyticus* kaynaklı olduğu belirlenmiştir (Scallan ve diğerleri, 2011). Küresel sıcaklığın artmasıyla gıdadaki patojenlerin üremesi de hızlanmaktadır, bu da akabinde gıda zehirlenme vakalarının sayısının artmasına sebep olmaktadır (Muhling ve diğerleri, 2017; Ortiz-Jimenez ve diğerleri, 2018). İklim değişikliğinin etkileri gıda güvenliği ve halk sağlığı üzerinedir, gıda emniyeti ve beslenme üzerindeki etkilerle yakından bağlantılıdır ve birlikte düşünülmelidir. İklim değişikliğinin tükettiğimiz gıdaların mevcudiyeti ve güvenliği üzerinde derin bir etkisi vardır ve gıda kaynaklı hastalıklara bağlı bakteriler, virüsler, parazitler ve kimyasallar ve toksinler üzerindeki etkileri ile halk sağlığı riskinde önemli bir artışa neden olması beklenmektedir (WHO, 2019).

İklim koşullarının ve doğa olaylarının su ürünlerindeki *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu etkilemesi gıda güvenliği otoriteleri ve su ürünleri endüstrisi için yüksek önem arz etmektedir. Örneğin sıcak sezonda avlanan deniz ürünleri soğuk sezonda avlananlara göre daha yüksek *V. parahaemolyticus* konsantrasyonu göstermektedir (Cruz ve diğerleri, 2015; DePaola ve diğerleri, 2003; Mok ve diğerleri, 2019, Parveen ve diğerleri, 2008). Sonuç olarak sıcak sezonda avlanan deniz ürünleri özellikle çiğ tüketilmesi planlanıyorsa insan tüketimi için güvenli değildir. Bu bilgi gıda sektöründe kontrol için uygun müdahale yöntemini seçmeye ve/veya patojenin su ürünlerindeki oranını kabul edilebilir oranlara düşürmeye imkan tanıyabilir. Ayrıca bu bilgi ile gıda güvenliği otoriteleri, sıcak sezon boyunca *V. parahaemolyticus*’un kamu sağlığı için potansiyel risk oluşturduğunu ve bu konuda su ürünleri üreticilerini ve tüketicilerini bilgilendirip halk sağlığını garantiye almasını sağlayacaktır (Ndraha, 2020).

MGM’nin (2021) verilerinde görüldüğü üzere numunelerin toplandığı yıl olan 2019 yılı Ege Denizi’nde yıllık ortalama deniz suyu sıcaklığı 1970-2021 yılları arasında Ege Denizi’nde yıllık ortalama en yüksek deniz suyu sıcaklığının (20,9 oC) ölçüldüğü yıldır. Ayrıca Tablo 2’ye göre 1970-2021 yılları arasında Ege Denizi’nde aylara göre deniz suyu sıcaklık ortalamasında numuneleri topladığımız Kasım-Aralık ayları sırasıyla deniz suyu sıcaklık ortalaması 17,9 oC ve 15,5 oC gösterilmektedir, fakat çalışmamızı yıllara göre en yüksek deniz suyu sıcaklık ortalaması olan 2019 yılında yapmamız ve 2019 yılı Kasım-Aralık aylarında deniz suyu sıcaklıklarının 18-20 oC’yi göstermesi ve hava sıcaklıklarının da 15-21 oC arasında olması normal kış mevsimine göre havanın daha sıcak seyretmesi yaz aylarında daha sık görülen *V. parahaemolyticus*’u kış mevsiminde de izole etmemize olanak tanımıştır.

*V. parahaemolyticus* Amerika’da *Vibrio* ilişkili diyarenin ana sebeplerinden biridir. *V. parahaemolyticus* enteritisinin sık görülen semptomları karın ağrılı diyaredir, hastaların neredeyse yarısında ateş görülmektedir. İki ana semptom mide bulantısı (%76) ve kusma (%55) diyareyle seyreden diğer bakteriyal hastalıklarla ve diğer vibriosislerden hastalığı ayırmaya yardımcı olmaktadır (Humphries ve Linscott, 2015). 1996'dan 2014'e kadar Kolera ve Diğer *Vibrio* Hastalık Sürveyansı (COVIS) sistemine ve Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerine (CDC) bildirilen vibriosis enfeksiyonlarının sayısına göre, *V. parahaemolyticus*’un *V. vulnificus, V. cholerae* (non-O1 ve non-O139), *V. alginolyticus, V. fluvialis, V. hollisae* gibi diğer *vibrio* enfeksiyonları arasında %39-51 oranıyla en sık rastlanan gıda kaynaklı patojen olduğu görülmüştür (Newton ve diğerleri, 2012). Dünya genelinde *V. parahaemolyticus*'un neden olduğu yüksek enfeksiyon oranı, yüksek tıbbi maliyetlere neden olmaktadır. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde *V. parahaemolyticus* ile kontamine olmuş deniz ürünlerinin tüketilmesi sonucu yıllık sağlık maliyetinin 21 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (Ralston ve diğerleri, 2011). COVIS (Cholera and Other Vibrio Illness Surveillance) ve Food-Net verilerine göre tahmini olarak her yıl 80.000 kişi hastalanmakta, 500 kişi hastanede tedavi görmekte ve 100 kişi de *Vibrio* hastalıklarından dolayı Amerika’da ölmektedir (Newton ve diğerleri, 2012).

Çalışmamızda, geleneksel kültür yöntemi ile şüpheli *Vibrio* *parahaemolyticus* olarak olarak izole edilen 40 adet izolatın, Real-Time PCR ile yapılan uygulamalarından, 11 tanesi (%27,5) pozitif sonuç vermiştir. Doğruer ve Telli (2020), 100 adet balık ve 100 adet karides örneğinden *V*. *parahaemolyticus* varlığını, direkt kültür yöntemi (DPC), kantitatif ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (qLAMP) ve canlı-ölü hücre ayrımı için propidium monoazide (PMA)- qLAMP tekniği ile incelemişler ve bu bakteriyi sırası ile 8 (%4), 12 (%6) ve 12 (%6) oranlarında bulmuşlardır. Xu ve diğerleri (2017), analiz ettikleri 50 adet karidesten 2 adet (%10) *V*. *parahaemolyticus* ve 1 adet (%5) *V*. *vulnificus* tespit etmişlerdir. Çin’de toplanan 260 su ürünü analiz edilerek 94 örnekte (%36,2) *V. parahaemolyticus* tespit edilmiştir (Xu ve diğerleri, 2016), Çin’de yapılan başka bir çalışmada toplanan 111 taze karidesin 78’i (%70,3), 73 dondurulmuş karidesin 16’sı (%21,9), 89 kurutulmuş karidesin 9’u (%10,1) pozitif çıkmıştır ve toplamda toplanan 273 karides örneğinden 103 örnek (%37,7) *V. parahaemolyticus* pozitif çıkmıştır (Xu ve diğerleri, 2014), Fransa’da yapılan çalışmada ise 167 dondurulmuş ya da taze deniz ürününden alınan numunelerden 58 örnekte (%34,7) *V. parahaemolyticus* pozitif çıkmıştır (Robert-Pillot ve diğerleri, 2014).

Kang ve diğerleri (2017), analiz ettikleri117 adet istiridye örneğinden *V*. *parahaemolyticus*’u 44 tanesinde (%37,6) yaz aylarında izole etmişlerdir. Yine aynı çalışmada bu 44 adet suşun antibiyotik dirençliliğinde 6 izolatın gentamisine ve 40 izolatın vankomisine bile direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Yaashikaa ve diğerleri (2016), *V*. *parahaemolyticus*’un antibiyotik dirençliliğini disk difüzyon ile kontrol etmiş ve çalışmamızdakine benzer şekilde bu mikroorganizmanın penisilin G ve klindamisine dirençli olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda, 11 adet izolattan birisinde piperasiline karşı dirençlilik tespit edilirken aynı çalışmada (Yaashikaa ve diğerleri, 2016) bu antibiyotiğe karşı dirençlilik belirtilmiştir.

Maestu ve diğerleri (2016) analiz ettikleri 101 adet midye örneğinde V. cholerae ve V. vulnificus’u tespit edemezken, %68 oranında *V*. *parahaemolyticus*’u tespit etmişlerdir. İzole edilen bu *V*. *parahaemolyticus* suşlarından 19 adedi non-patojenik karakterde (tdh/trh negatif) iken, 50 (%72) tanesinin ise en az bir virulens geni taşıdığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada *V*. *parahaemolyticus* suşlarından %52’sinde eritromisin dirençlilik geni tespit edilirken, hiçbir suşta tetrasiklin geni tespit edilmemiştir. Malcolm ve diğerleri (2015) yaptıkları çalışmada incelenen 72 karidesten 70’inde (%97,2) *V. parahaemolyticus* pozitif çıkmıştır. Deniz ürünleri örneklerinde *V. parahaemolyticus* prevalansı yüksek olmasına rağmen, patojenik *tdh* ve *trh* genlerinin bulunmaması nedeniyle izolatların çoğunluğunun insanlar için patojenik olmadığı bulunmuştur. Tan ve diğerleri (2020) inceledikleri 140 deniz ürününde *tdh* ya da *trh* genlerini tespit etmemişlerdir.

Tran ve diğerleri (2018) çalışmalarında 385 yumuşakça ve karides örneğinden 25’inde (%6,5) patojenik tdh ve trh geni tespit edilmiştir. Malcolm ve diğerlerinin (2015) çalışmalarında da 232 numunenin 77’si (%33,1) *tdh* pozitif ve 232 numunenin 16’sı (%6,9) *trh* pozitif çıkmıştır. Letchumanan ve diğerlerinin (2015) çalışmalarında 200 kabuklu örneğinden 13’ü (%6,5) *V. parahaemolyticus* *trh* geni pozitif çıkarken örneklerin hiçbirinde *tdh* genine rastlanılmamıştır. Sonuç olarak, deniz ürünleri örneklerinden izole edilen *V. parahaemolyticus* suşlarının çoğunluğunda *tdh* ve *trh* genlerinin olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte, *V. parahaemolyticus*'un patojenitesi karmaşık ve etkileşimlidir (Sun ve diğerleri, 2019). *V. parahaemolyticus* ve konakçı-patojen etkileşimlerinin insan enfeksiyonu için önemi hala tartışmaya açıktır (Ghenem ve diğerleri, 2017). *trh* ve *tdh* geni bulunmayan klinik vaka oluşturan *V. parahaemolyticus* suşları da bulunmaktadır (Jones ve diğerleri, 2012).

Tan ve diğerleri (2017), inceledikleri 130 uskumru örneğinden 116 (%89,2)’sında *V*. *parahaemolyticus*’u tespit ederken, bunlardan 21’inin (%16,2) patojenik karakterde olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada bu izolatların antibiyotik dirençlilik durumları disk difüzyon yöntemi ile araştırılmış, yüksek oranda duyarlılık gösterilen antibiyotikler ampisilin, sulbaktam, meropenem, seftazidim ve imipenem olarak sıralanırken penisilin G ile ampisiline ise dirençli olduklarını bildirmişlerdir. İki (%2,99) izolatın ise çoklu antibiyotik (7 adet antibiyotiğe) direncine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da bir (%1,1) izolat, incelemiş olduğumuz tüm antibiyotiklere direnç göstermiştir. Tan ve diğerlerinin (2020) yapmış oldukları çalışmada deniz ürünlerinden izole edilen tüm *V. parahaemolyticus* izolatların %100 oranında penisilin G’ye dirençli olduğu, %84,1 oranında ampisilin ve sefozoline yüksek dirençli olduğu görülmüştür. Bunun yanında antibiyotik duyarlılığı açısından kloramfenikolün tüm izolatlarda gelişmeyi engellediği görülmüştür. Ampisilin-sulbaktam, imipenem, meropenem, tetrasiklin, trimetoprim-sülfametokzol ve doksisiklinin de %90 oranında *V. parahaemolyticus* izolatlarının duyarlı olduğu görülmüştür. Çalışmadaki her *V. parahaemolyticus* izolatının antibiyotik direnç profilinin 0,04 ile 0,71 arasında değişen ÇAD indeksleri olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda ÇAD indeksinin 0,33 ile 1 arasında olduğu ve Tan ve diğerlerinin (2020) yapmış oldukları çalışmadan izolatların antibiyotik direnç oranının daha yüksek olduğu görülmüştür.

*V. parahaemolyticus*’un penisilin G (10 u) ve ampisilini (10 µg) de içeren penisilin grubu antibiyotiklere yüksek direnci olduğu görülmüştür (Tan ve diğerleri, 2020). Karideslerde yapılan başka çalışmalarda da penisilin (%92,5-100) ve ampisiline (%82-88) *V. parahaemolyticus*’un yüksek direnç gösterdiği tespit edilmiştir (Letchumanan ve diğerleri, 2015; Tan ve diğerleri, 2017).

Tan ve diğerlerinin (2020) yaptıkları çalışmada elde edilen *V. parahaemolyticus* izolatlarının toplam %84,1'inin de sefalosporin antibiyotiği olan sefazoline (30 µg) dirençli olduğu bulunmuştur. Farklı deniz ürünlerinden izole edilen *V. parahaemolyticus* suşlarının, penisilin ve sefalosporinler de dahil olmak üzere beta-laktam sınıfı antibiyotiklere karşı oldukça dirençli olduğu bulunmuştur. Bu nedenle *V. parahaemolyticus* enfeksiyonlarını tedavi etmek için ampisilin, penisilin ve sefazolin kullanılmamalıdır. Benzer şekilde, sefotaksim ve siprofloksasin, sırasıyla *V. parahaemolyticus* izolatlarının % 60 ve % 66,6'sı ile ilişkili orta derecede duyarlı olması nedeniyle *Vibrio* enfeksiyonları için tedavi rejimlerinde iyi bir seçim değildir.

Tan ve diğerlerinin (2020) yaptıkları çalışmada *V. parahaemolyticus*’un, ampisilin, sefazolin ve penisiline yüksek direnç gösterdiği, sefotaksim ve siprofloksasine de orta düzeyde direnç göstermesi, *V. parahaemolyticus* izolatlarının çoğu ampisilin-sülbaktam (%93,3), kloramfenikol (%100), doksisiklin (%98,3), imipenem (%98,3), meropenem (%98,3), tetrasiklin (%94,1) ve trimetoprim-sülfametoksazole (%95) duyarlı olduğunu antibiyogram göstermiştir. Letchumanan ve diğerleri (2015) çalışmalarında karides örneklerinden izole ettikleri *V. parahaemolyticus* izolatlarının ampisilin-sülbaktam (%96), kloramfenikol (%95), imipenem (%98), tetrasiklin (%82) ve trimetoprim- sülfametoksazole (%93) yüksek duyarlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Lopatek ve diğerleri (2015) de çalışmalarında yumuşakçalardan elde edilen *V. parahaemolyticus* izolatlarının kloramfenikol ve tetrasikline duyarlı oldukları görülmüştür. Xu ve diğerlerinin (2016) çalışmalarında Kuzey Çin’de marketlerden toplanan su ürünlerinden izole edilen *V. parahaemolyticus* izolatlarının kloramfenikol (%95), siprofloksasin (%92), gentamisin (%63), tetrasiklin (%83) ve trimetoprim- sülfametoksazole (%75) duyarlı oldukları görülmüştür. Buna bağlı olarak bu antibiyotiklerin *V. parahaemolyticus* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olarak kullanılabileceği öngörülmüştür.

Tan ve diğerlerinin (2020) çalışmalarındaki *V. parahaemolyticus* izolatlarının %90,8 oranında birden fazla antibiyotiğe direnç gösterdiğini, çoklu antibiyotik direnci (multidrug resistance-MDR), tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise bu oranın %100 olduğu yani tüm izolatların birden fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Xu ve arkadaşlarının 2016 yılında yayımladıkları çalışmada; mevsimsel dağılımda, *V. parahaemolyticus*’un su ürünlerinde maksimum izole edilme oranı %50,0 ile yaz aylarıyken kış aylarındaki oran %22,7’dir. Aynı çalışmada toplanan 260 su ürününün 94’ünde (%36,2) *V. parahaemolyticus* tespit edilmiştir, bunlardan 22’si balık örneklerinden (%23,4), 72’si karides örneklerinden (%43,4) izole edilmiştir. Aynı çalışmada edinilen izolatlardan antimikrobiyal dirençlilik testinde yüksek dirençlilik sırasıyla; %49,6 ampicilin, %43.5 sefazolin, %35.9 sefalotin, %22,1 kanamisin oranlarıyla gösterirken duyarlılık oranları en yüksekten düşüğe doğru; %97,2 nalidiksik asit, %91,7 siprofloksasin, %83,4 tetrasiklin, %75,2 trimetoprim- sülfametoksazol’dür.

Klinik ve çevresel örneklerden izole edilen *V. parahaemolyticus* suşlarının çoğunluğu amoksisilin, ampisilin, karbenisilin, sefazolin, seftazidim, sefalotin, gentamisin ve tobramisin gibi çoklu antibiyotiklere karşı yüksek direnç gösterdiği bildirilmiştir (Yano ve diğerleri, 2014). Bakteriyel enfeksiyonun önlenmesi ve hastalığın hızla yayılmaması için su ürünleri yetiştiriciliğinde profilaktik antibiyotiklerin yaygın kullanımı ve yanlış kullanılması, büyük olasılıkla *V. parahaemolyticus* izolatlarında çoklu antibiyotik direncinin (ÇAD) ortaya çıkmasının ve yaygınlaşmasının ana nedenidir. Ek olarak, su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotiklerin aşırı kullanımı sadece antibiyotiğe dirençli bakterilerin seçimini ve antibiyotiğe dirençli genlerin yayılmasını arttırmakla kalmaz, aynı zamanda balık gibi suda yaşayan organizmalarda antibiyotik kalıntılarının varlığına neden olmaktadır (Miranda ve diğerleri, 2018). Organik asitler güçlü antimikrobiyal etkileri ve patojen bakterilere karşı profilaktik özellikleri sayesinde antibiyotikler karşısında ilgi çekmektedirler (He ve diğerleri, 2017).

Sıcaklık ölçümlerinin düzenli tutulması su ürünlerini işleyen personelleri zamanında uyarıp sıcaklığın kabul edilebilir koşullarda kalmasını sağlayacaktır. Verilerin şeffaf şekilde tutulması, gıda güvenliği otoriteleri için sıcaklık yönetimi sorumluluğunu netleştirmelerinde yardımcı olacaktır ve güvenli gıdaya erişmek için politikaları geliştirmeyi sağlayacaktır. Eksiksiz, doğru ve şeffaf veri toplanması kolay değildir, çünkü su ürünleri fabrikalarının katılması, geniş kapsamlı uygulamaların olması ve teknolojik imkanların verilerin toplanılması, paylaşılması ve veriler arası bağ kurulmasında kullanılması önemlidir (Ndraha ve diğerleri, 2020).

Buz kaplama yöntemi, buzdolabı sıcaklığında tutma, dondurma, depürasyon, yüksek hidrostatik basınç uygulanması, irradyasyon uygulanması gibi stratejiler su ürünlerinde tedarik zinciri aşamasında (avlanma sonrası, depolama ve dağıtım) *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu kontrol amaçlanmasına odaklansa da su ürünlerinin tedarik zincirine girmeden önceki ortamdaki (ör: yetişme çevresi) patojen konsantrasyonunun kontrolünün sağlanması hakkında elimizdeki bilgiler kısıtlıdır. Bu müdahale stratejilerinin etkinliği değişmektedir ve stratejiler kombine edildiğinde sinerjik etkiler gösterebilmektedir. Bazı müdahaleler su ürünlerinde *V. parahaemolyticus* konsantrasyonunu tespit edilemeyecek miktarlara kadar azaltmaktadır. Bazı ülkelerde patojenlerin tespit edilemeyecek konsantrasyonu < 30 MPN/g’dır (Food Standarts Australia New Zealand, 2018; U.K. Health Protection Agency, 2009; U.S. FDA, 2017). Bu müdahale stratejileri ile ilgili temel zorluklar, bunların uygulanmasını düzenleyen yönetmeliklerdir, uygulanan müdahale stratejilerinin doğrulanması ve onaylanması, tüketici veya piyasa tercihlerinin yanı sıra tesislere erişimin zorluğuyla karşı karşıya kalınabilmektedir. Buna ek olarak, bu müdahale stratejilerinin geniş çaplı ticari uygulamasına tüketici veya piyasa tercihlerinin yanı sıra, müşteriye kolayca aktarılamayan bu yöntemleri kullanmanın maliyeti de uygulanmasında zorluk çıkarabilmektedir (Baker, 2016; Kecinski ve diğerleri, 2017).

*V. parahaemolyticus* gibi su bakterileri gelişmek için düşük tuzluluk oranını ve sıcak bölgeleri (> 15 oC, < 25 ppt) tercih etmektedirler. Bu yüzden *V. parahaemolyticus* enfeksiyonlarının genellikle Endonezya, Tayvan, Mozambik gibi tropik ya da subtropik iklimlerde görülmesi beklenmektedir (Cheng ve diğerleri, 2013; Lin ve diğerleri, 2015). Bununla beraber *V. parahaemolyticus* enfeksiyonları Şili, Peru, Kuzeybatı Pasifik (Amerika), Kuzeybatı İspanya gibi ılıman bölgelerde de rapor edilmiştir (Baker-Austin ve diğerleri, 2010). Bu olgunun iklim değişikliğinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. İklim Değişikliği Hükümetlerarası Panelinde (IPCC) iklim değişikliği yüzünden küresel sıcaklığın 2046’dan 2065’e kadar 2,6 oC, 2081’den 2100’e kadar 4,8 oC yükselmesi beklenmektedir (IPCC, 2014). Sıcaklıkların yükselmesi, tuzluluğun azalması ve yüksek enlemlerde bulunan kıyı bölgelerindeki diğer iklimsel değişiklikler patojenin çoğalması için yeni alanlar sağlayabilmektedir, bu da enfeksiyon riskini arttırmaktadır (Baker-Austin ve diğerleri, 2013). Lancet Komisyonunun hazırladığı rapora göre Baltık Bölgesi ve Kuzeydoğu Amerika diğer bölgeler arasında *Vibrio* enfeksiyonları için daha uygun ortama sahip olacaklardır. Bu rapor *Vibrio* enfeksiyonlarının 1980’lerde %24, 2010’larda %27 oranında artış gösterdiğini ortaya koymuştur, ayrıca deniz yüzey sıcaklığı ile *Vibrio* vakaları arasında tutarlı bir ilişki olduğunu raporlamışlardır (Watts ve diğerleri, 2018).

Her ne kadar deniz ürünleri güvenliği ile ilgili kamuoyundaki endişelerin artması, deniz ürünlerinin güvenliğini düzenleyen politikaların, yasal gerekliliklerin ve kılavuzların geliştirilmesini teşvik etmiş olsa da, politikaların pek azı iklim değişikliği faktörünü dikkate almaktadır. Bu gelişme eğilimi gelişmiş ülkelerde görülmektedir (Food Standarts Australia New Zealand, 2018; Health Canada’s Food Directorate, 2019; MHLW,2010; U.K. Health Protection Agency, 2009; U.S. FDA, 2017), ancak gelişmekte olan ülkelerden yetersiz ilgili bilgi edinilebilmektedir. Bu çok önemli bir tutarsızlıktır çünkü su ürünleri uluslararası pazarlarda işlem görmektedir, dolayısıyla piyasa talebine bağlı olarak ülkeleri ve hatta kıtaları geçmektedirler (FAO, 2019). Su ürünlerinin güvenliğini ilk üretimden (gelişmekte olan ülkelerde üretiliyor olabilirler) tüketim aşamasına kadar enfeksiyon riskini minimize etmek gereklidir. Bu sona ulaşabilmek için su ürünlerinin ihracatçı ve ithalatçı ülkeler arasındaki güvenliğini düzenleyen standartların uyumlulaştırılması, fakat bunun sadece gıda güvenliği yönetimi ile kalmayıp yetiştirme, avlama, dağıtım ve depolama sırasında da uygulanması gerekmektedir (Ndraha ve diğerleri, 2020). Avrupa’da vibriosis bildirilmesi gereken bir hastalık olmadığı için bu patojen hakkında epidemiyolojik ve denetim verilerinde eksiklikler bulunmaktadır, COVIS ve FoodNet gibi iyi kalitede ulusal denetleme sistemleri Amerika’da bulunmaktadır ve bu sayede patojenin bölgesel etkilerini, görülme zamanlarını ve insidens değişikliklerini izleme imkanı bulunmaktadır (Baker-Austin ve diğerleri, 2018).

Uluslararası iklim değişikliği ile ilgili artan gıda kaynaklı riskler konusunda bilinçlendirilmesi ve tarım ve çevre konularıyla ilgili tüm sektörlerden sağlık yetkilileri bir araya getirmek, üye devletler etkinleştirmek için, yurt içinde ve uluslararası bir sektörler arası işbirliği yaklaşımı da WHO tarafından desteklenmektedir (WHO, 2019).

**6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Bu çalışmada toplanan 90 adet karidesten 40 adedi (%44,4) TCBS agarda *V. parahaemolyticus* şüpheli ve 40 adet *V. parahaemolyticus* şüpheli karides örneğinin 11 adedi (%27,5) *V. parahaemolyticus* pozitif olduğu tespit edilmiştir, çalışmada elde edilen *V. parahaemolyticus* izolatlarının hepsinin penisilin G ve klindamisin’e dirençli olduğu ve izolatların çoğunun farklı antibiyotik gruplarına dirençli olduğu saptanmıştır. Elde edilen veriler ışığında *V. parahaemolyticus* bakterisinin karidesler yoluyla insanlara bulaşabileceği ve küresel ısınmanın deniz suyu sıcaklıklarını arttırması sonucu çalışmamızı Kasım-Aralık aylarında yapmamıza rağmen Mayıs-Eylül aylarında yapılan çalışmalardaki gibi *V. parahaemolyticus* oranının yakalandığı görülmüştür. Karideslerden izole edilen *V. parahaemolyticus* bakterilerinin oranları ve antibiyotik direnç profili değerlendirildiğinde, halk sağlığı açısından büyük risk oluşturabilecek potansiyele sahip olduğu görülmüştür ve önümüzdeki yıllarda küresel ısınmanın hem hava hem deniz suyu sıcaklıklarını arttırmasıyla bu risk daha görülür hale gelecektir.

Karideslerden kaynaklı intoksikasyonları önlemek ve antibiyotik dirençliliğini önlemek amacıyla çiftlikten sofraya prensibi göz önüne alınarak ilk avlanma aşamasından, depolama koşulları ve tüketicinin masasına gelene kadar gıdanın izlenebilirliğinin olması çok önem taşımaktadır. Bununla beraber deniz suyu sıcaklıklarının yüksek olduğu aylarda su ürünlerinin avlanmasının da salgınları arttıracağı, küresel ısınmanın etkilerini göstermesiyle deniz suyu sıcaklıklarını yüksek olduğu ay sayısının artacağı göz önünde bulundurulması önem taşımaktadır.

Türkiye’de de Amerika’da olduğu gibi vibriosisin bildirilmesi gereken hastalıklar kategorisine alınması, epidemiyolojik ve denetim verilerinde eksikliklerin kapatılmasının sağlanması ve COVIS, FoodNet gibi iyi kalitede ulusal denetleme sistemlerinin kurulması, bu sayede patojenin bölgesel etkilerini, görülme zamanlarını ve insidens değişikliklerini izleme imkanı sağlayacağı, salgınların önüne geçmede yardımcı olacağı göz önüne alınmalıdır.

Sonuç olarak, su ürünlerinin avlandığı veya hasat edildiği bölgelerde patojen *Vibrio* türlerine yönelik sürekli izlenme çalışmalarının yapılması ve bu konuda gerekli önlemlerin alınması sağlanmalıdır. Güvenli su ürünleri tüketimi için patojen *Vibrio* türlerinin tespitine yönelik su ürünlerinin avlamadan tüketime kadar tüm aşamalarda takip sistemi ile rutin kontrollerin geliştirilmesi önerilmektedir.

**KAYNAKLAR**

Abu Elala, NM.,Ragaa, NM. (2015). Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *Journal of Advanced Research*, 6, 621-629. doi: 10.1016/j.jare.2014.02.008

# Accorsi, R., Gallo, A., Manzini, R. (2017). A climate driven decision-support model for the distrubution of perishable products. *Journal of Cleaner Production*, 165, 917-929.

# Adler, P.B., Leiker, J., Levine, J.M. (2009). Direct and indirect effects of climate change on a prairie plant community. *Plos One*, 4, e6887.

# Alverez, S., Solis, D., Hwang, J. (2019). Modeling shellfish harvest policies for food safety: wild oyster harvest restrictions to prevent foodborne *Vibrio vulnificus*. *Food Policy*, 83, 219-230.

Atlas, R.M. (1997). *Bacterial diversity*. In Fishback, J.E. (Ed), Principles of Microbiology (2nd Edition, Chapter 17). Boston, Mass: Wm. C. Brown Publishers.

# Austin, B. (2010). *Vibrios* as a causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140, 310-317.

# Austin, B., Austin, D.A. (2007). *Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish*. Spinger-Praxis Publishing, Chichester, UK.

# Awuah, G.B., Ramaswamy, H.S., Economides, A. (2007). Thermal processing and quality: principles and overview. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46, 584-602.

# Baker, G. (2016). Food safety impacts from post-harvest processing procedures of molluscan shellfish. *Foods*, 5, 29.

Baker-Austin, C., Oliver, J.D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M.K., Quadri, F., Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(8), 1-19. doi: 10.1038/s41572-018-0005-8

# Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R., Martinez-Urtaza, J. (2010). Environmental occurence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a european perspective. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 7-18.

# Baker-Austin, C., Trinanes, J.A., Taylor, N.G.H., Hartnell, R., Siitonen, A., Mertinez-Urtaza, J. (2013). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change*, 3, 73-77.

Baron, S., Lesne, J., Jouy, E., Larvor, E., Kempf, I., Boncy, J., Rebaudet, S., Piarroux, R. (2016). Antimicrobial Susceptibility of Autochthonous Aquatic *Vibrio cholerae* in Haiti. *Frontiers in Microbiology,* 7, 1671. doi: 10.3389/fmicb.2016.01671

Barrera-Escorcia, G., Wong-Chang, I., Fernandez-Rendon, C.L., Botello, A.V., Gomez-Gil, B., Lizarraga-Partida, M.L. (2016). Quantification of *Vibrio* species in oysters from the Gulf of Mexico with two procedures based on MPN and PCR. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188, 602. doi:10.1007/s10661-016-5620-9

# Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinic Pathology*, 45, 493.

# Bechlars, S., Jackel, C., Diescher, S., Wüstenhagen, D.A., Kubick, S., Dieckmann, R., Strauch, E. (2015). Characterization of trh2 harbouring *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Germany. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0118559

Bej, A.K., Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C.L., Jones, D.D., Kaysner, C.A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl, tdh, trh*. Journal of Microbiological Methods, 36, 215-225. doi:10.1016/S0167-7012(99)00037-8

# 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*, 65, 2776-2780.

# Berutti, T., Williams, R., Shen, S., Taylor, M., Grimes, D. (2014). Prevalence of urease in *Vibrio parahaemolyticus* from the Missisippi Sound. *Letters in Applied Microbiology*, 58, 624-628. doi:10.1111/lam.12237

Beuchat, L.R. (1975). Environmental factors affecting survival and grownth of *Vibrio parahaemolyticus.* A review. *Journal of Milk and Food Technology*, 38,8, 476-480. doi:10.4315/0022-2747-38.8.476

Bilung, L.M., Linang, V., Apun, K., Lihan, S., Kqueen, C.H., Vincent, M. (2015). Application of real-time PCR for the detection and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in Sarawak (Malaysia). *Borneo Journal of Resource Science and Tecnology*, 5(2), 70-78. doi: 10.33736/bjrst.224.2015

Bisha, B., Simonson, J., Janes, M., Bauman, K., Lawrence, DG. (2012). A review of the current status of cultural and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Science & Technology,* 47, 885-899. doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.02950.x

# Brucet, S., Boix, D., Nathansen, L.W., Quintana, X.D., Jensen, E., Balayla, D., Meerhoff, M., Jeppesen, E. (2012). Effects of temperature, salinity and fish in structuring the macroinvertebrate community in Shallow lakes: implications for effects of climate change. *Plos One*, 7, e30877. doi: 10.1371/journal.pone.0030877

Cai, T., Jiang, L., Yang, C., Huang, K. (2006). Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood in eastern China. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 46, 180-186.

Cao, X., Zhao, L., Zhang, J., Chen, X., Shi, L., Fang, X., Xie, H., Chang, Y., Wang, L. (2019). Detection of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples using improved real-time PCR and real-time LAMP methods. *Food Control*, 103, 145-152. doi:10.1016/j.foodcont.2019.04.003

# CDC. (2013). *National Antimicrobial Resistance Monitoring System for enteric bacteria (NARMS): human isolates, final report, 2011*. CDC, Atlanta, GA.

# Cecchini, F., Fajs, L., Cosnier, S., Marks, R.S. (2016). *Vibrio cholerae* detection: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 79, 199–209. doi:10.1016/j.trac.2016.01.017

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009). *Preliminary Foodnet data on the incidence of infections with pathogens transmitted commonly through food- 10 states,2008.* Morbidity and Mortality Weekly Report, 58, 333-337.

# Chae, M.J, Cheney, D., Su, Y.C. (2009). Temperature effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Science*, 74, M62-M66.

# Chen, J., Zhang, R., Qi, X., Zhou, B., Wang, J., Chen, Y., Zhang, H. (2017). Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* during 2010-2014 in Zhejiang Province, China. *Food Control*, 77, 110-115.

# Cheng, W.C., Kuo, C.W., Chi, T.Y., Lin, L.C., Lee, C.H., Feng, R.L., Tsai, S.J. (2013). Investigation on the trend of food-borne disease outbreaks in Taiwan (1991-2010). *Journal of Food and Drug Analysis*, 21, 261-267.

# Chowdhury, M.A.R., Yamanaka, H., Miyoshi, S.I., Shinoda, S. (1990). Ecology and seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic environments of temperature region. *FEMS Microbiology Ecology*, 74, 1-10.

# CLSI. (2010). *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline, 2nd ed. CLSI document M45-A2*. Clinical and Laboratory Standarts Institute, Wayne, PA.

# Codex. (2010). *Guidelines on the application of general principles of food hygiene to control of pathogenetic Vibrio species in seafood* (GAC/GL 73-2010). Rome, Italy: World Health Organization/Food Agricalture Organization.

# Codex. (2016). *Code of practice for fish and fishery products* (CAC/RCP 52-2003). Rome, Italy: World Health Organization/Food Agricalture Organization.

# Cook, D.W., Ruple, A.D. (1989). Indicator bacteria and *Vibrionaceae* multiplication in post-harvest shellstock oysters. *Journal of Food Protection*, 52, 343-349.

Coutard, F., Crassous, P., Droguet, M., Gobin, E., Colwell, R.R., Pommepuy, M., Hervio-Heath, D. (2007). Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation? *ISME Journal*, 1, 111-120. doi:10.1038/ismej.2007.1

# Cruz, C.D., Hedderley, D., Fletcher, G.C. (2015). Long-term study of *Vibrio parahaemolyticus* prevalence and distrubution in New Zealand shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 2320-2327.

Davis, B.J.K., Jacobs, J.M., Davis, M.F., Schwab, K.J., DePaola, A., Curriero, F.C. (2017). Environmental determinants of *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, 1-15. doi:10.1128/AEM.01147-17

Deepanjali, A., Kumar H.S., Karunasagar, I., Karunagasar I. (2005). Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3575-3580. doi:10.1128/AEM.71.7.3575-3580.2005

# DePaola, A., Nordstrom, J.L., Bowers, J.C., Wells, J.G., Cook, D.W. (2003). Seasonal abundence of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1521-1526.

# Diler, A. ve Ataş, Ş. (2003). Antalya Bölgesinden Avlanan *Penaeus semisulcatus De Haan* 1884’un Mikrobiyolojik ve Kimyasal Kalitesi ile Et Verimi. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sci*e*nces*, 27, 497-503.

Doğruer, Y., Telli, A.E. (2020). Determination of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods using direct plate counting, quantitative loop-mediated isothermal amplification and propidium monoazide-qLAMP. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 67, 349-355.

Drake, S.L., DePaola, A., Jaykus, L. (2007). An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus.* *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 6, 120-144. doi: 10.1111/j.1541-4337.2007.00022.x

Duan, J., Su, Y-C. (2005). Comparison of a chromogenic medium with thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Science*, 70, M125-M128. doi:10.1111/j.1365-2621-2005.tb07102.x

# Eschbach, E., Martin, A., Huhn, J., Seidel, C., Heuer, R., Schumacher, J.H., Ulrich, S., Axe, J.O., Konietzny, A., Strauch, E., Oberheitmann, B. (2017). Detection of enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio vulnificus*: performance of real-time PCR kits in an interlaboratory study. *European Food Research and Technology*, 243, 1335-1342. doi:10.1007/s00217-017-2844-z

Espineira, M., Atanassova, M., Vieites, J.M., Santaclara, F.J. (2010). Validation of a method for detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiology*, 27, 122-131.

# Esteves, K., Hervio-Heath, D., Mosser, T., Rodier, C., Tournoud, M.G., Jumas-Bilak, E., …, Monfort, P. (2015). Rapid proliferation of *Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* during freshwater flash floods in French Mediterranean coastal lagoons. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 7600-7609.

FAO ve WHO. (2020). *Risk assessment tools for Vibrio parahaemolyticus and Vibrio vulnificus associated wiht seafood. Microbiological Risk Assessment Series (No.20).*Rome.

Fernandez-Piquer, J., Bowman, J.P., Ross, T., Tamplin, M.L. (2011). Predictive models for the effect of storage temperature on Vibrio parahaemolyticus viabilty and counts of total viable bacteria in Pacific oysters(Crassostrea gigas). *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 8687-8695. doi:10.1128/AEM.05568-11

# Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nation. (2019). Fisheries and agriculture information and statistics branch. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en> adresinden erişildi

# Food Standards Australia New Zealand. (2018). Compendium of microbiological criteria for food. <http://www.foodstandards.gov.au/publications/pages/compendium-of-microbiological-criteria-for-food.aspx> adresinden erişildi

Foster, J.W. (1999). When proton attack: microbial strategies of acid adaptation. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 170-174. doi:10.1016/S1369-5274(99)80030-7

# Frischkorn, K.R., Stojanovski, A., Paranjpye, R. (2013). *Vibrio parahaemolyticus* type IV pili mediate interactions with diatom-derived chitin and point to an unexplored mechanism of environmental persistence. *Environmental Microbiology*, 15, 1416-1427.

# Froelich, B.A., Phippen, B., Fowler, P., Noble, R.T., Oliver, J.D. (2017). Differences in abundances of total *Vibrio* spp., *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* in clams and oysters in North Carolina. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, 1-11.

Fujino, T.,Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Mukai, T., Ueho, T. (1953). On the bacteriological exemination of shirasu food poisoning. *Medical Journal of Osaka University*, 4, 299-304.

# Garrido-Maestu, A., Lozano-Leon, A., Rodríguez-Souto, R.R., Vieites-Maneiro, R., Chapela, M.J., Cabado, A.G. (2016). Presence of pathogenic *Vibrio* species in fresh mussels harvested in the southern Rias of Galicia (NW Spain). *Food Control*, 59, 759-765. doi:10.1016/j.foodcont.2015.06.054

# Gauthier, D.T. (2015). Bacterial zoonoses of fishes: a review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. *The* *Veterinary Journal*, 203,1, 27-35.

# Gauthier, M.J. (2000). Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state. Colwell R.R. (Ed). *Nonculturable Microorganisms in the Environment* (pp. 87-112). ASM Press: Washington.

# Ghenem, L., Elhadi, N., Alzahrani, F., Nishibuchi, M. (2017). Vibrio parahaemolyticus: a review on distribution, pathogenesis, virulence determinants and epidemiology. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 5, 2, 93-103. doi:10.4103/sjmms.sjmms\_30\_17

Givens, C.E., Bowers, J.C., Depaola, A., Hollibaugh, J.T., Jones, J.L. (2014). Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*- potential roles for fish, oyster, sediment and water. *Letters in Applied Microbiology*, 58, 503-510. doi:10.1111/lam.12226

Gooch, J.A., DePaola, A., Bowers, J., Marshall, D.L. (2002). Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *Journal of Food Protection*, 65,6, 970-974. doi:10.4315/0362-028X-65.6.970

# Göransson, M., Nilsson, F., Jevinger, A., Jevinger. (2018). Temperature performance and food shelf-life accuracy in cold food supply chain- insights from multiple fields studies. *Food Control*, 86, 332-341.

Gu, D., Wang, K., Lu, T., Li, L., Jiao, X. (2021). *Vibrio parahaemolyticus* CadC regulates acid tolerance response to enhance bacterial motility and cytotoxicity. *Journal of Fish Diseases*, 44,1155-1168. doi: 10.1111/jfd.13376

# Gutierrez West, C.K., Klein, S.L., Lovell, C.R. (2013). High frequency of virulence factor genes tdh, trh and tlh in Vibrio parahaemolyticus strains isolated from a pristine estuary. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 2247-2252.

# Guvener, Z.T., McCarter, L.L. (2003). Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 185, 5431-5441.

# Hancı, İ., Onuk, E.E. (2016). Balıkların başlıca bakteriyel zoonozları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27, 2, 123-130.

Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagava, H., Konuma, H., Hasegawa, J, Kumagai, S. (2001). Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5819-5823.

# Hara-Kudo, Y., Kumagai, S. (2014). Impact of seafood regulations for *Vibrio parahaemolyticus* infections and verification by analyses of seafood contamination and infection. *Epidemiology and Infection*, 142, 2237-2247.

# Hara-Kudo, Y., Saito, S., Ohtsuka, K., Yamasaki, S., Yahiro, S., Nishio, T., …, Kumagai, S. (2012). Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 95-101.

# Hara-Kudo, Y., Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y., …, Kumagai, S. (2003). Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and coastal environment in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3883-3891.

# Hartwick, M.A., Urquhart, E.A., Whistler, C.A., Cooper, V.S., Naumova, E.N., Jones, S.H. (2019). Forecasting seasonal *Vibrio parahaemolyticus* concentrations in New England shellfish. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16, 4341.

He, W., Rahimnejad, S, Wang, L., Song, K., Lu, K., Zhang, C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on grownth, gut microbiata, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus. Fish Shellfish Immunology,* 70, 164-173. doi: 10.1016/j.fsi.2017.09.007

# Health Canada’s Food directorate. (2019). Information document with request for input and scientific data: *Vibrio parahaemolyticus* in oyster shellstock intended for raw consumption. [http://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/public-involvement-partnership/request-input-scientific-data-*vibrio-parahaemolyticus*-oyster-shellstock-intended-comsumption/consultation.html](http://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/public-involvement-partnership/request-input-scientific-data-vibrio-parahaemolyticus-oyster-shellstock-intended-comsumption/consultation.html) adresinden erişildi

# Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′ → 3′ exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7276-7280. doi:10.1073/pnas.88.16.7276

# Huang, Y.R., Hsieh, H.S., Lin, S.Y., Lin, S.J., Hung, Y.C., Hwang, D.F. (2006). Application of electrolyzed oxidizing water on the reduction of bacterial contamination for seafood. *Food Control*, 17, 987-993.

# Huehn, S., Eichhorn, C., Urmersbach, S., Breidenbach, J., Bechlars, S., Bier, N., Alter, T., Bartelt, E., Frank, C., Oberheitmann, B., Gunzer, F., Brenholt, N., Boer, S., Appel, B., Dieckmann, E., Strauch, E. (2014). Pathogenic *Vibrios* in environmental, seafood and clinical sources in Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 843-850. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.07.010

Hugh, R., Sakazaki, R. (1975). International comittee on systematic bacteriology subcommittee on the taxonomy of vibrios. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25(4), 389-391. doi: 10.1099/00207713-25-4-389

Humphries, R.M., Linscott, A.J. (2015). Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. Clinical Microbiology Reviews, 28, 3-31. doi:10.1128/CMR.00073-14

# ICMSF. (2011). Microorganisms in foods 8- use of data for assessing process control and product acceptance. Boston, US: Springer.

# Iida, T., Park, K.S., Suthienkul, O., Kozawa, J., Yamaichi, Y., Yamamoto, K., Honda, T. (1998). Close proximity of tdh, trh and ure genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology*, 144, 2517-2523.doi:10.1099/00221287-144-9-2517

# Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2014). Climate change 2014: sythesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Geneva, Switzerland: Author.

# Jakabi, M., Gelli, D.S., Torre, J.C.M.D., Rodas, M.A.B., Franco, B.D.G.M., Destro, M.T., Landgraf, M. (2003). Inactivation by ionizing radiation of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis* and *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea brasiliana*). *Journal of Food Protection*, 66, 1025-1029.

# Jaykus, L.A. (2010). Climate change: implications for food safety. *Health San Francisco*, 1196, 1-354.

# Jiang, W., Han, X., Wang, Q., Li, X., Yi, L., Liu, Y., Ding, C. (2014). *Vibrio parahaemolyticus* enolase is an adhesion-related factor that binds plasminogen and functions as a protective antigen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 4937-4848.

# Jiang, X., Chai, T.J. (1996). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Applied Environmental Microbiology,* 62, 1300-1305. doi:10.1128/aem.62.4.1300-1305.1996.

# Jiang, Y., Chu, Y., Xie, G., Li, F., Wang L., Huang, J., Zhai, Y. (2019). Antimicrobial resistance, virulance and genetic relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from coasts of Bohai Sea and Yellow Sea, China. *International Journal of Food Microbiology*, 290: 116-124. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.005

# Johnson, C.N., Flowers, A.R., Noriea, N.F., Zimmerman, A.M., Bowers, J.C., DePaola, A., Grimes, D.J. (2010). Relationships between environmental factors and pathogenic *Vibrios* in the Northern Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7076-7084.

# Jones, J.L. (2017). *Vibrio*, In: “Chapter 11. Foodborne Diseases”, Third Edition, pp. 243-252.

Jones, J.L., Lüdeke, C.H.M., Bowers, J.C., DeRosia-Banick, K., Carey, D.H., Hastback, W. (2014). Abundance of *Vibrio cholerae, V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and clams (*Mercenaria mercenaria*) from Long Island Sound. *Applied Environmental Microbiology*, 80, 7667-7672. doi:10.1128/AEM.02820-14

# Jones, J.L., Lüdeke, C.H.M., Bowers, J.C., Garrett, N., Fischer, M., Parsons, M.B., Bopp, C.A., DePaola, A. (2012). Biochemical, serological and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 50,7, 2343-2352. doi:10.1128/JCM.00196-12

# Jones, J.L., Lydon, K.A., Kinsey, T.P., Friedman, B., Curtis, M., Schuster, R., Bowers, J.C. (2017). Effects of ambient exposure, refrigeration and icing on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* abundances in oysters. *International Journal of Food Microbiology*, 253, 54-58.

Jones, L.J., Noe, K.E., Byars, R., Depaola, A. (2009). Evaluation of DNA colony hybridization and Real-Time PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in postharvest-processed oysters. *Journal of Food Protection*, 72, 2106-2109. doi:10.4315/0362-028X-72.10.2106

# Jung, S.W. (2018). A foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Vibrio parahaemolyticus* associated with cross-contamination from squid in Korea. *Epidemiology and Health* , 40, e2018056.

Kafa, B. (2019). *Taze, dondurulmuş ve işlenmiş kara midyelerdeki (Mytilus galloprovincialis) mikrobiyal yükün tespiti ve Vibrio türlerinin real-time PZR metodu kullanılarak belirlenmesi*. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Kalburge, S.S., Whitaker, W.B., Boyd, E.F. (2014). High-salt preadaptation of *Vibrio parahaemolyticus* enhances survival in response to lethal environmental stresses. *Journal of Food Protection*, 77, 246-253. doi: 10.4315/0362-028XJFP-13-241

Kampeera, J., Pasakon, P., Karuwan, C., Arunrut, N., Sappat, A., Sirithammajak, S., Dechokiattawan, N., Sumranwanich, T., Chaivisuthangkura, P., Ounjai, P., Chankhamhaengdecha, S., Wisitsoraat, A., Tuantranont, A., Kiatpathomchai, W. (2019). Point-of-care rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood using loop-mediated isothermal amplification and graphene-based screen-printed electrochemical sensor. *Biosensors and Electronics*, 132, 271-278. doi:10.1016/j.bios.2019.02.060

Kaneko, T., Colwell, R.R. (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology*, 113, 24-32. doi: 10.1128/jb.113.1.24-32.1973

Kaneko, T., Colwell, R.R. (1975). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Applied Microbiology*, 30, 251-257. doi:10.1128/am.30.2.251-257.1975

# Kang, C.H., Shin, Y.J., Jang, S.C., Yu, H.S., Kim, S.K., An, S., Park, K., So, J.S. (2017). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea: Resistance to various antibiotics and prevalence of virulence genes. *Marine Pollution Bulletin*,118, 261–266. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.02.070

# Kecinski, M., Messer, K.D., Knapp, L., Shirazi, Y. (2017). Consumer preferances for oyster attributes: field experiments on brand, locality and growing method. *Agricultural and Resource Economics Review*, 46, 315-337.

Khimmakthong, U., Sukkarun, P. (2017) The spread of *Vibrio parahaemolyticus* in tissues of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* analyzed by PCR and histopatology. *Microbial Pathogenesis*, 113, 107-112.

# 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 the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 4, 1173-1177. doi:0095-1137/99/$04.0010

Kim, Y.W., Lee, S.H., Hwang, I.G., Yoon, K.S. (2012). Effect of temperature on growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in flounder, salmon sashimi and oyster meat. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9, 4662-4675. doi:10.3390/ijerph9124662

# Kishishita, M., Matsuoka, N., Kumagai, K., Yamasaki, S., Takeda, Y., Nishibuchi, M. (1992). Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2449-2457.

# Kita-Tsukamoto, K., Oyaizu, H., Nanba, K., Shimidu, U. (1993). Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. *Inernational Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 8-19.

# Kogure, K., Simidu, U., Taga, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 25, 415-420.

# Kokashvili, T., Whitehouse, C.A., Tskvediani, A., Grim, C.J., Elbakidze, T., Mitaishvili, N., Janelidze, N., Jaiani, E., Haley, B.J., Lashkhi, N., Huq, A., Colwell, R.R., Tediashvili, M. (2015). Occurence and diversity of clinically important *Vibrio* species in the aquatic environment of Georgia. *Frontiers in Public Health*, 3, 232. doi: 10.3389/fpubh.2015.00232

# Konrad, S., Paduraru, P., Romero-Barrios, P., Henderson, S.B., Galanis, E. (2017). Remote sensing measurements of sea surface temperature as an indicator of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster meat and human illnesses. *Environmental Health*, 16, 92.

# Krumperman, P.H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 1, 165-170.

# Kustusch, R.J., Kuehl, C.J., Crosa, J.H. (2011). Power plays: iron transport and energy transduction in pathogenic vibrios. *Biometals*, 24, 559-566. doi: 10.1007/s10534-011-9437-2

# Leon-Sicairos, N., Angulo-Zamudio, U.A., de la Garza, M., Velazquez-Roman, J., Flores-Villasenor, H.M., Canizalez-Roman, A. (2015). Strategies of *Vibrio parahaemolyticus* to acquire nutritional iron during host colonization. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-14.

Letchumanan, V., Kok-Gan, C., Learn-Han, L. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: review on the pathogenesis, prevalance, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in Microbiology*, 5(705), 1-13. doi: 10.3389/fmicb.2014.00705

# Letchumanan, V., Yin, W.F., Lee, L.H., Chan, K.G. (2015). Occurrence and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish in Selangor, Malaysia. Frontiers in Microbiology, 6, 1417.doi:10.3389/fmicb.2015.01417

# Li, B., Chen, R., Wang, D., Tan, H., Ke, B., He, D., Ke, C., Zhang, Y. (2016) Distribution and molecular characteristics of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates recovered in Guangdong Province, China, 1961–2013. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 70–76. doi:10.1016/j.meegid.2015.11.004

# Li, H.,Tang, R., Lou, Y., Cui, Z., Chen, W., Hong, Q., Zhang, Z., Malakar, P.K., Pan, Y., Zhao, Y. (2017). A comprehensive epidemiological research for clinical *Vibrio parahaemolyticus* in Shanghai. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-10. doi:10.3389/fmicb.2017.01043

# Li, P., Kinch, L.N., Ray, A., Dalia, A.B., Cong, Q., Nunan, L.M., Camilli, A., Crishin, N.V., Salomon, D., Orth, K. (2017). Acute hepatopancreatic necrosis disease-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains maintain an antibacterial type VI secretion system with versatile effector repertoires. *Applied and Environmental Microbiology*, 83 (13). doi:10.1128/AEM.00737-17

# Li, J., Xue, F., Yang, Z., Zhang, X., Zeng, D., Chao, G., Jiang, Y., Li, B. (2016). *Vibrio parahaemolyticus* strains of pandemic serotypes identified from clinical and environmental samples from Jiangsu, China. *Frontiers in Microbiology*, 7, 787. doi: 10.3389/fmicb.2016.00787

# Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y., Jia, M. (2019). Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiological Research*, 222, 43-51. doi:10.1016/j.micres.2019.03.003

# Lin, C.C., Lin, P.S., Kou, L.L., Hong, Y.P., Wu, H.S. (2015). Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* in Southern Taiwan, 2004-2013. *Taiwan Epidemiology Bulletin*, 31, 194-195.

# Liu, B., Liu, H., Pan, Y., Xie, J., Zhao, Y. (2016). Comparison of the effects of environmental parameters on the growth variability of *Vibrio parahaemolyticus* coupled with strain sources and genotypes analyses. *Frontiers in Microbiology*, 7, 994.

# Liu, C., Lu, J., Su, Y.C. (2009). Effects of flash freezing, followed by frozen storage, on reducing Vibrio parahaemolyticus in Pacific raw oysters (*Crassostrea gigas*). *Journal of Food Protection*, 72, 174-177.

# Liu, M., Chen, S. (2015). A novel adhesive factor contributing to the virulence of *Vibrio parahaemolyticus*. *Scientific Reports*, 5, 1-10.

# Lopez-Hernandez, K.M., Pardio-Sedas, V.T., Lizarraga-Partida, L., Williams, J. de J., Martinez-Herrera, D., Flores-Primo, A., Uscanga-Serrano, R., Rendon-Castro, K. (2015). Environmental parameters influence on the dynamics of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* densities in *Crassostrea virginica* harvested from Mexico’s Gulf coast. *Marine Pollution Bulletin*, 91, 317-329. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.11.015

# Lopez-Joven, C., de Blas, I., Furones, M.D., Roque, A. (2015). Prevalences of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in mollusks from the Spanish Mediterranean Coast. *Frontiers in Microbiology*, 6, 736.

# Lydon, K.A., Farrell-Evans, M., Jones, J.L. (2015). Evaluation of ice slurries as a control for postharvest growth of *Vibrio* spp. in oysters and potential for filth contamination. *Journal of Food Protection*, 78, 1375-1379.

Ma Y, Sun X, Xu X, Zhao Y, Pan Y, Hwang C, Wu VCH. Investigation of referance genes in *Vibrio parahaemolyticus* for gene expression analysis using quantitative RT-PCR. Plos One 2015, 10(12), 1-11.

# Maestu A.G., Leon A.L., Souto R.R.R., Maneiro R.V., Chapela M.J., Cabado A.G. (2016). Presence of pathogenic *Vibrio* species in fresh mussels harvested in the southern Rias of Galicia (NW Spain). *Food Control*, 59, 759-765.

Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Lijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., Lida, T. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae.* *The Lancet*, 361, 743-749. doi:10.1016/S0140-6736(03)12659-1

# Malcolm, T.T.H., Cheah, Y.K., Radzi, C.W.J.W.M., Kasim, F.A., Kantilal, H.K., John, T.Y.H., Martinez-Urtaza, J., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Son, R. (2015). Detection and quantification of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by using multiplex PCR and loop-mediated isothermal amplification assay. *Food Control*, 47, 664-671. doi:10.1016/j.foodcont.2014.08.010

# Marques, A., Nunes, M.L., Moore, S.K., Strom, M.S. (2008). Climate change and seafood safety: human health implications. *Food Research International*, 43, 1766-1779.

# Martinez-Urtaza, J., Blanco-Abad, V., Rodriguez-Castro, A., Ansede-Bermejo, J., Miranda, A., Rodriguez-Alvarez, M.X. (2012). Ecological determinants of the occurrence and dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* in offshore areas. *ISME Journal*, 9, 994-1006.

# Martinez-Urtaza, J., Bowers, J.C., Trinanes, J., DePaola, A. (2010). Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Research International*, 43, 1780-1790. doi:10.1016/j.foodres.2010.04.001

# Martinez-Urtaza, J., Huapaya, B., Gavilan, R.G., Blanco-Abad, V., Ansede-Bermejo, J., Cadarso-Suarez, C., Fiqueiras, A., Trinanes, J. (2008). Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Nino. *Epidemiology*, 19, 829-837. doi: 10.1097/EDE.0b013e3181883d43

# Matic, I., Taddei, F., Radman, M. (2004). Survival versus maintenance of genetic stability: a conflict of priorities during stress. *Research in Microbiology*, 155, 337-341.

# Matsuda, S., Okada, R., Tandhavanant, S., Hiyoshi, H., Gotoh, K., Iida, T., Kodama, T. (2019). Export of a *Vibrio parahaemolyticus* toxin by the Sec and type III secretion machineries in tandem. *Nature Microbiology*, 4, 781-788. doi:10.1038/s41564-019-0368-y

McLaughlin, J.C. (1995). *Vibrio*. In E. JoBaron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Yolken, P.R. Murray (Eds.), Manual of Clinical Microbiology (Chapter 35, pp. 465-476). Washington, DC: American Society for Microbiology (ASM) Press.

# Meehl, G.A., Hu, A., Santer, B.D., Xie, S.P. (2016). Contribution of the Interdecadal Pacific Oscillation to twentieth-century global surface temperature trends. *Nature Climate Change*, 6, 1005-1008.

# Melody, K., Senevirathne, R., Janes, M., Jaykus, L.A., Supan, J. (2008). Effectiveness of icing as a postharvest treatment for control of *Vibrio parahaemolyticus* in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Protection*, 71, 1475-1480.

# Mercier, S., Villeneuve, S., Mondor, M., Uysal, I. (2017). Time-temperature management along the food cold chain: a review of recent developments. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 647-667.

# Meteroloji Genel Müdürlüğü [MGM]. 2021. *Ege deniz suyu sıcaklığı analizi*. *Meteroloji Genel Müdürlüğü*. <https://www.mgm.gov.tr/FILES/resmi-istatistikler/denizSuyu/Ege-Deniz-Suyu-Sicakligi-Analizi-2021.pdf> adresinden erişildi

# MHLV. (2010). Specifications and standards for foods, food addictives, etc. under the food sanitation act. <http://jetro.go.jp/en/reports/regulations/pdf/testing2009dec-e.pdf> sitesinden alınmıştır

Miles, D.W., Ross, T., Olley, J., McMeekin, T.A. (1997). Development and evaluation of a predictive model fort he effect of temperature and water activity on the grownt rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 133-142. doi: 10.1016/S0168-1605(97)00100-1

# Miranda, C.D., Godoy, F.A., Lee, M.R. (2018). Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1284. doi:10.3389/fmicb.2018.01284

# Mizan, M.F.R., Bang, H.J., Sadekuzzaman, M., Lee, N., Kim, T.J., Ha, S.D. (2017). Molecular characteristics, biofilm-forming abilities, and quorum sensing molecules in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from marine and clinical environments in Korea. *Biofouling*, 33,5, 369–378. doi:10.1080/08927014.2017.1316840

# 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 under starvation. *FEMS Microbiol Lett*, 186, 115-120.

Mok, J.S., Ryu, A., Kwon, J.Y., Kim, B., Park, K. (2019). Distribution of Vibrio species isolated from bivalves and bivalve culture environments along the Gyeongnam coast in Korea: virulance and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Food Control*, 106, 106697. doi:10.1016/j.foodcont.2019.06.023

# Mudoh, M.F., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., Chaudhuri, A. (2014). The effects of storage temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* and organoleptic properties in oysters. *Frontiers in Public Health*, 2, 45.

# Muhling, B.A., Jacobs, J., Stock, C.A., Gaitan, C.F., Saba, V.S. (2017). Projections of the future occurence, distrubution and seasonality of three *Vibrio* species in the Chesapeake Bay under a high-emission climate change scenario. *GeoHealth*, 1, 278-296.

# Muntada-Garriga, J.M., Rodriguez-Jerez, J.J., Lopez-Sabater, E.I., Mora-Ventura, M.T. (1995). Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Letters in Applied Microbiology*, 20, 225-227.

# Nair, G.B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Dutta, B., Takeda, Y., Sack, D.A. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 1, 39-48.

# Navarre, W.W., Schneewind, O. (1999). Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 174-229. doi: 10.1128/mmbr.63.1.174-229.1999

Naughton, L.M., Blumerman, S.L., Carlberg, M., Boyd, E.F. (2009). Osmoadaptation among *Vibrio* species and unique genomic features and physiological responses of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2802-2810. doi: 10.1128/AEM.01698-08

# Ndraha, N., Hsiao, H.I., Vlajic, J., Yang, M.F., Lin, H.T.V. (2018). Time-temperature abuse in the food cold chain: review of issues, challenges and recommendations. *Food Control*, 89, 12-21.

Ndraha, N., Wong, H., Hsiao, H. (2020). Managing the risk of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with oyster consumption: a review. *Comprehensive Review In Food Science And Food Safety*, 19, 1187-1217. doi:10.1111/1541-4337.12557

# Newton, A., Kendall, M., Vugia, D.J., Henao, O.L., Mahon, B.E. (2012). Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996-2010: review of surveillance data from 2 systems. *Clinical Infectious Diseases*, 54, Suppl 5, S391-S395. doi:10.1093/cid/cis243.

# Nilsson, L., Oliver, J.D., Kjelleberg, S. (1991). Resuscitaton of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Journal Bacteriology*, 173, 5053-5059.

Nishibuchi, M., Kaper, J.M. (1995). Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulance gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity*, 63(6), 2093-2099.

# Niu, B., Hong, B., Zhang, Z., Mu, L., Malakar, P.K., Liu, H., Pan, Y., Zhao, Y. (2018). A novel qPCR method for simultaneous detection and quantification of viable pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh +*, *tdh +*, and *ure* R*+*). *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-10. doi:10.3389/fmicb.2018.01747

Noorlis, A., Ghazali, F.M., Cheah, Y.K., Tuan Zainazor, T.C., Ponniah, J., Tunung, R., Tang, J.Y.H., Nishibushi, M., Nakaguchi, Y., Son, R. (2011). Prevalence and quantification of *Vibrio* species and *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater fish at hypermarket level. *International Food Research Journal*, 18(2), 689-695.

# Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I., Vancina, O., Bartkevics, V., Berzins, A. (2016). Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Annals of Microbiology*, 66, 1-15.

Odeyemi, O.A. (2016). Incidence and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: a systematic review and meta-analysis. *SpringerPlus*, 5, 464. 10.1186/s40064-016-2115-7

# Oliver, J.D., Nilsson, L., Kjelleberg, S. (1991). Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to starvation state. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2640-2644.

# Ortiz-Jimenez, M.A. (2018). Quantitative evaluation of the risk of *Vibrio parahaemolyticus* through consumption of raw oysters (*Crassostrea corteziensis*) in Tepic, Mexico, under the RCP2.6 and RCP8.5 climate scenarios at different time horizons. *Food Research International*, 111, 111-119.

# Paerl, H.W., Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1,1,27-37.doi:10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x

Palasuntheram, C. (1981). The halophilic properties of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of General Microbiology*, 127,427-428. doi: 10.1099/00221287-127-2-427

Paranjpye, R., Hamel, O. S., Stojanovski, A., Liermann, M. (2012). Genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains from the Pasific Norwest. *Applied and Environmental Microbiology.* 78, 8631-8638. doi: 10.1128/AEM.01531-12

# Park, K.S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.H., Okada, K., Iida, T., Honda, T. (2004). Funtional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 72, 6659-6665. doi:10.1128/IAI.72.11.6659-6665.2004

# Park, S.Y., Ha, S.D. (2018). Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in shucked raw oyster (*Crassostrea gigas*) and clam (*Venerupis phillippinarum*) by using a combination of NaClO and gamma irradiation. *Food Science and Technology International*, 24, 43-52.

# Parveen, S., DaSilva, L., DePaola, A., Bowers, J., White, C., Munasinghe, K.A., …, Tamplin, M. (2013). Development and validation of a predictive model for the growth of *Vibrio parahaemolyticus* in post-harvest shellstock oysters. *International Journal of Food Microbiology,* 161, 1-6.

# Parveen, S., Hettiarachchi, K.A., Bowers, J.C., Jones, J.L., Tamplin, M.L., McKay, R., Beatty, W., Brohawn, K., DaSilva, L.V., DePaola, A. (2008). Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 354-361. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.019

Pinto, A.D., Terio, V., Novello, L., Tantillo, G. (2011). Comparison between thiosulfate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar Vibrio for isolating Vibrio parahaemolyticus. Food Control, 22, 124-127. doi:10.1016/j.foodcont.2010.06.013

Praja RK, Safnurbaiti DP. The infection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shrimp and Human. Oceana Biomedicina Journal 2018, 1(1), 44-58.

# Putro, S., Anggawatti, A.M., Fawzya, Y.N., Ariyani, F, (1990). *Studies on microbiology of farmed shrimp*. FAO Indo-Pacific Fisheries Commission Papers Presented at the Seventh Session Working Party on Fish Technology and Marketing, Bangkok, Thailand, No. 401: 6-17.

# Quan, Y., Choi, K.D., Chung, D., Shin, I.S. (2010). Evulation of bactericidal activity of weakly acidic electrolyzed water (WAEW) againist *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 255-260.

# Ralston, E.P., Kite-Powell, H., Beet, A. (2011). An estimate of the cost of acute health effects from food- and water- borne marine pathogens and toxins in the USA. *Journal of Water Health*, 9, 4, 680-694. doi:10.2166/wh.2011.157

# Raszl, S.M., Froelich, B.A., Vieira, C.R.W., Blackwood, A.D., Noble, R.T. (2016). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 1201-1222.

# Ray, B., Hawkins, S.M., Hackney, C.R. (1978). Method for detection of injured *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods. *Appl Environ Microbiol*, 35, 1121-1127. doi:10.1128/aem.35.1121-1127.1978.

# Rehnstam-Holm, A.S., Atnur, V., Godhe, A. (2014). Defining the niche of *Vibrio parahaemolyticus* during pre- and post-monsoon seasons in the Coastal Arabian Sea. *Microbial Ecology*, 67, 57-65.

# Ren, T., Su, Y.C. (2006). Effects of electrolyzed oxidizing water treatment on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in raw oysters. Journal of Food Protection, 69, 1829-1834.

# Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: a review. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1251-1260.

Robert-Pillot, A., Copin, S., Himber, C., Gay, M., Quilici, M.L. (2014). Occurrence of the major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using Real-Time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 75-81.

Rosen, G. (September, 2-5). *The nutritional effects of tetracyclines in broiler feeds* (141-146). XX World’s Poultry Congress, WPSA, New Delhi, India.

# Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M., Christine, R. (1994). Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio, Photobacterium, Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 416-426.

# Salomon, D., Gonzales, H., Updegraff, B.L., Orth, K. (2013). *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2. *Plos One*, 8(4), 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0061086

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7-15. doi:10.3201/eid1701.P11101

# Shaw, K.S., Jacobs, J.M., Crump, B.C. (2014). Impact of hurricane irene on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* concentrations in surface water, sediment and cultured oysters in the Chesapeake Bay, MD, USA. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-10.

# Shen, X., Su, Y.C., Liu, C., Oscar, T., DePaola, A. (2019). Efficacy of *Vibrio parahaemolyticus* depuration in oysters (*Crassostrea gigas*). *Food Microbiology*, 79, 35-40.

# Singh, A., Barnard, T.G. (2016). Surviving the acid barrier: responses of pathogenic *Vibrio cholerae* to simulated gastric fluid. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 100, 815–824. doi:10.1007/s00253-015-7067-2

Solomakos, N., Pexara, A., Govaris, A. (2012). *Vibrio parahaemolyticus* in seafood-associated outbreaks. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society,* 63(1), 54-63.

# Springmann, M., Mason-D’Croz, D., Sherman, R., Garnett, T., Godfray, H.C.J., Gollin, D., Rayner, M., Ballon, P., Scarborough, P. (2016). Global and regional health effects of future food production under climate change: a modelling study. *The Lancet*, 387,10031, 1937-1946. doi: 10.1016/s0140-6736(15)01156-3

# Sterk, A., Schets, F.M., de Roda Husman, A.M., de Nijs, T., Schijven, J.F. (2015). Effect of climate change on the concentration and associated risks of *Vibrio* spp. in Dutch recreational waters. *Risk Analysis*, 35, 9, 1717-1729.doi:10.1111/risa.12365

Suffredini, E., Mioni, R., Mazzette, R., Bordin, P., Serratore, P., Fois, F., Piano, A., Cozzi, L., Croci, L. (2014). Detection and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish from Italian production areas. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 14-20. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.016

# Sun, Y., Guo, D., Hua, Z.,Sun, H., Zheng, Z., Xia, X., Shi, C. (2019). Attenuation of multiple *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors by Citral. *Frontiers in Microbiology*, 10, 894.doi:10.3389/fmicb.2019.00894

Taiwo, M., Baker-Austin, C., Powell, A., Hodgson, E., Natas, O.B., Walker, D.I. (2017). Comparison of *toxR* and *tlh* based PCR assays for *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 77, 116-120. doi:10.1016/j.foodcont.2017.02.009

Tan, C.W., Malcolm, T.T.H., Kuan, C.H., Thung, T.Y., Chang, W.S., Loo, Y.Y., Premarathne, J.M.K.J.K., Ramzi, O.B., Norshafawatie, M.F.S., Yusralimuna, N., Rukayadi, Y., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Radu, S. (2017). Prevalance and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from short mackarels (*Rastrelliger brachysoma*) in Malaysia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1087.

# Tan, C.W., Rukayadi, Y., Hasan, H., Thung, T.Y., Lee, E., Rollon, W.D., Hara, H., Kayali, A.Y., Nishibuchi, M., Radu, S. (2020). Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi Journal of Biologycal Sciences*, 27, 1602-1608. doi:10.1016/j.sjbs.2020.01.002

# Tan, K.K., Sin, K.S., Ng, A.J., Yahya, H., Kaur, P. (1994). Non-O1 *Vibrio cholerae* septicaemia: a case report. *Singapore Medical Journal*, 35, 648-649.

Tanaka, Y., Kimura, B., Takahashi, H., Watanabe, T., Obata, H., Kai, A., Morozumi, S., Fujii, T. (2008). Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1283-1293. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03652.x

Tang, X., Zhao, Y., Sun, X., Xie, J., Pan, Y., Malakar, P.K. (2015). Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 growth on cooked *Litopenaeus vannamei.* *Annals of Microbiology*, 65, 487-493. doi:10.1007/s13213-014-0884-1

# Theethakaew, C., Feil, E.J., Castillo-Ramirez S., Aanensen, D.M., Suthienkul, O., Neil, D.M., Davies, R.L. (2013). Genetic relationship of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical, human carrier and environmental sources of Thailand, determined by multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 2358-2370. doi:10.1128/AEM.03067-12

# Tirado, M.C., Clarke, R., Jaykus, L.A., McQuatters-Gollop, A., Frank, J.M. (2010). Climate change and food safety: a review. *Food Research International*, 43, 1745-1765. doi:10.1016/j.foodres.2010.07.003

# Tran, T., Yanagawa, H., Nguyen, K.T., Hara-Kudo, Y., Taniguchi, T., Hayashidani, H. (2018). Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood and water environment in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80, 11, 1737-1742.doi:10.1292/jvms.18-0241

# Turner, J.W., Good, B., Cole, D., Lipp, E.K. (2009). Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *ISME Journal*, 3, 1082-1092.

Türkiye İstatistik Kurumu web sitesi (2021); [TÜİK Kurumsal (tuik.gov.tr)](https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Su-Urunleri-2020-37252) <https://data.tuik.gov.tr/bulten/Index?p=Su-urunleri-2020-37252> adresinden erişildi

Twedt, R.M., Novelli, R.M.E. (1971). Modified selective and differential isolation medium for *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology*, 22(4), 593-599. doi:10.1128/aem.22.4.593-599.1971

# U.K. Health Protection Agency. (2009). Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foodsplaced on the market. London, UK: Health Protection Agency.

# U.S. Food and Drug Administration (U.S. FDA). (2017). National Shell-fish Sanitation Program (NSSP). <http://www.fda.gov/food/federalstate-food-program/national-shellfish-sanitation-program-nssp> sitesinden alınmıştır

# Vanderzant, C., Nickelson, R. (1972). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp tissue under various environmental conditions. *Applied Microbiology*, 23, 34-37.

# Vezulli, L., Grande, C., Reid, P.C., Helaouet, P., Edwards, M., Höfle, M.G., Brettar, I., Colwell, R.R., Pruzzo, C. (2016). Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 113, E5062-E5071. doi: 10.1073/pnas.1609157113

# Wang, Y., Zhao, P., Zhang, H., Chen, W., Su, X., Suo, B. (2013). A simple and rapid realtime PCR assay for detection of *Shigella* and *Escherichia coli* species in raw milk. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 8, 313-319. doi:10.1007/s00003-013-0837-9.

Ward, L.N., Bej, A.K. (2006). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes. *Applied and Environmental Microbiology*, , 2031-2042.

Watts, N., Amann, M., Arnell, N., Ayeb-Karlsson, S., Belesova, K., Berry, H., Bourley, T., Boykoff, M., Byass, P., Cai, W., Campbell-Lendrum, D., Chambers, J., Daly, M., Dasandi, N., Davies, M., Depoux, A., Domingues-Salas, P., Drummond, P., Ebi, K.L., Ekins, P., Montoya, L.F., Fischer, H., Georgeson, L., Grace, D., Graham, H., Hamilton, I., Hartinger, S., Hess, J., Kelman, I., Kiesewetter, G., Kjellstrom, T., Kniveton, D., Lemke, B., Liang, L., Lott, M., Lowe, R., Sewe, M.O., Martinez-Urtaza, J., Maslin, M., McAllister, L., Mikhaylov, S.J., Milner, J., Moradi-Lakeh, M., Morrissey, K., Murray, K., Nilsson, M., Neville, T., Oreszczyn, T., Owfi, F., Pearman, O., Pencheon, D., Pye, S., Rabbaniha, M., Robinson, E., Rocklöv, J., Saxer, O., Schütte., S., Semenza, J.C., Shumake-Guillemot, J., Steinbach, R., Tabatabaei, M., Tomei, J., Trinanes, J., Wheeler, N., Wilkinson, P., Gong, P., Montgomery, H., Costello, A. (2018). The 2018 report of the Lancet Countdown on health and climate change: shaping the health of nations for centuries to come. *The Lancet*, 392, 2479-2514. doi:10.1016/S0140-6736(18)32594-7

# Weichart, D., Oliver, J.D., Kjelleberg, S. (1992). Low temperature induced non-culturability and killing of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Letters*, 100, 205-210.

# Weissfeld, A.S. (2014). Infection from Eating Raw or Undercooked Seafood. *Clinical Microbiology Newsletter,*36,3, 17-21.

Whitaker, W.B., Parent, M.A., Naughton, L.M., Richards, G.P., Blumerman, S.L., Boyd, E.F. (2010). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4720-4729. doi:10.1128/AEM.00474-10

Whiteaker, W.B., Parent, M.A., Naughton, L.M., Richards, G.P., Blumerman, S.L., Boyd, E.F. (2010). Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4720-4729. doi: 10.1128/AEM.00474-10

# Whitesides, M.D., Oliver, J.D. (1997). Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1002-1005.

# WHO. (2014). Quantitative risk assessment of the effects of climate change on selected causes of death, 2030’s and 2050’s. Geneva <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/134014/9789241507691_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> adresinden erişildi

# WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Geneva <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1> adresinden erişildi

# Williams, T.C., Froelich, B.A., Phippen, B., Fowler, P., Noble, R.T., Oliver, J.D. (2017). Different abundance and correlational patterns exist between total and presumed pathogenic *Vibrio vulnificus* and *V. parahaemolyticus* in shellfish and waters along the North Carolina coast. *FEMS Microbiology Ecology*, 93, 1-11.

Wong, H.C., Wang, P. (2004). Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 359-366. doi:10.1046/j.1365-2572.2004.02166.x

World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: Interpretative summary and Technical Report, WHO, FAO, 16, Roma, 2011

World Health Organization. (2019). Food safety- Climate change and the role of WHO. <https://www.who.int/foodsafety/publications/all/Climate_Change_Document.pdf?ua=1> adresinden erişildi

# Wu, X., Lu, Y., Zhou, S., Chen, L., Xu, B. (2016). Impact of climate change on human infectious diseases: empirical evidence and human adaptation. *Environment International*, 86, 14-23.

# Xi, D., Liu, C., Su, Y.C. (2012). Effects of green tea extract on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and increasing shelf life of oyster meats. Food Control, 25, 368-373.

# Xi, D., Liu, C., Su, Y.C. (2014). Impacts of Lactobacillus plantarum in depuration for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23, 165-174.

# Xu, L.G., Sun, L.M., Wang, Y.S., Chen, P.P., Liu, Z.M., Li, Y.J., Tang, L.J. (2017). Simultaneous detection of *Vibrio cholerae, Vibrio alginolyticus, Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay. *Food Control*, 71, 64-70.

Xu, X., Cheng, J., Wu, Q., Zhang, J., Xie, T. (2016). Prevalence, characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail aquatic products in North China. BMC Microbiology, 16(32), 1-9.

Xu, X.K., Wu, Q.P., Zhang, J.M., Cheng, J.H., Zhang, S.H., Wu, K. (2014). Prevalance, pathogenity, and serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp from Chinese retail markets. *Food Control*, 46, 5-81.

# Xu, H.S., Roberts, N.C., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., Colwell, R.R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 8, 313-323.

# Xu, Y.G., Sun, L.M., Wang, Y.S., Chen, P.P., Liu, Z.M., Li, Y.J., Tang, L.J. (2017). Simultaneous detection of *Vibrio cholerae, Vibrio alginolyticus, Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay. *Food Control*, 71, 64-70. doi:10.1016/j.foodcont.2016.06.024

# Yaashikaa, P.R., Saravanan, A., Kumar, P.S. (2016). Isolation and identification of *Vibrio chlorea* and *Vibrio parahaemolyticus* from prawn (*Penaeus monodon*) seafood: Preservation strategies. *Microbial Pathogenesis*, 99: 5-13. doi:10.1016/j.micpath.2016.07.014.

# Yamamoto, S., Okujo, N., Matsuura, S., Fujiwara, I., Fujita, Y., Shinoda, S. (1994). Siderophore-mediated utilization of iron bound to transferrin by *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and Immunolgy*, 38(9), 687-693. doi: 10.1111/j.1348-0421.1994.tb01843.x

# Yamamoto, K. (2017). Food processing by high hydrostatic pressure. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 81, 672-679.

Yang, Z., Jiao, X., Li, P., Pan, Z., Huang, J., Gu, R., Fang, W.M., Chao, G. (2009). Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature. *Food Microbiology*, 26, 606-614. doi:10.1016/j.fm.2009.04.004

# Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I., Aue-umneoy, D. (2014). Diversity and characterization of oxytetracycline-resistance bacteria associated with non-native species, White-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), and native species, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), intensively cultured in Thailand. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 713-722. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04926.x

# Yoh, M., Kawakami, N., Funakoshi, Y., Okada, K., Honda, T. (1995). Evaluation of two assay kits for thermostable direct hemolysin (TDH) as an indicator of TDH-related hemolysin (TRH) produced by *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and Immunology*, 39, 2, 157-159.

Yoon, K.S., Min, K.J.,Jung, Y.J., Kwon, K.Y., Lee, J.K., Oh, S.W. (2008). A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Food Microbiology*, 25, 635-641. doi:10.1016/j.fm.2008.04.007

# Yu, W.T., Jong, K.J., Lin, Y.R., Tsai, S.E., Tey, Y.H., Wong, H.C. (2013). Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 185-192.

# Zha, Z., Li, C., Li, W., Ye, Z., Pan, J. (2016). LptD is a promising vaccine antigen and potential immunotherapeutic target for protection against *Vibrio* species infection. *Scientific Reports*, 6, 38577.

# Zhang, L.,Weng, Y., Wu, Y., Wang, X., Yin, Z., Yang, H., Yang, W., Zhang, Y. (2018). H-NS is an activator of exopolysaccharide biosynthesis genes transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Pathogenesis*, 116, 164-167. doi: 10.1016/j.micpath.2018.01.025

# Zhang, Y.,Gao, H., Osei-Adjei, G., Zhang, Y., Yang, W., Yang, H., Yin, Z., Huang, X., Zhou, D. (2017). Transcriptional regulation of the type VI secretion system 1 genes by quorum sensing and *ToxR* in *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2005. doi: 10.3389/fmicb.2017.02005