



Dondurulmuş Deniz Ürünlerinde *Vibrio spp.*'nin İlimiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) Yöntemiyle Belirlenmesi

Yusuf DOĞRUER^{1,a}, A. Ezgi TELLİ^{1,b,✉}, Nihat TELLİ^{2,c}, Yusuf BİÇER^{1,d}

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

²Konya Teknik Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Konya, TÜRKİYE

^aORCID: 0000-0002-3712-5021; ^bORCID: 0000-0001-8899-4537; ^cORCID: 0000-0002-4121-4588; ^dORCID: 0000-0001-7549-8323

Geliş Tarihi/Received
30.03.2022

Kabul Tarihi/Accepted
04.05.2022

Yayın Tarihi/Published
30.06.2022

Öz

Araştırmada, deniz ürünlerinde halk sağlığı bakımından yüksek riskli olarak tanımlanan *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae*'nin varlığının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla örneklerde etken tespiti için hızlı ve etkin bir yöntem olan İlimiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) metodu kullanıldı.

Araştırma materyali olarak farklı satış noktalarından temin edilen dondurulmuş deniz ürünleri kullanıldı (n=212). Örneklerde klasik kültür yöntemiyle etken izolasyonu için ISO / TS 21872-1:2007 ve ISO 21872-2:2007 yöntemleri uygulandı. Elde edilen şüpheli izolatlarda gerçekleştirilen DNA ekstraksiyonu sonrasında genus spesifik PCR reaksiyonuyla *gyrB1* gen bölgesi hedeflenerek *Vibrio spp.* varlığı doğrulandı. Pozitif örnekler *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae* için sırasıyla *toxR*, *vwA* ve *ompW* hedef gen bölgelerine yönelik LAMP primer setleri kullanılarak turbidite bazlı Real-Time LAMP uygulandı. Araştırma bulguları değerlendirildiğinde, klasik kültürel yöntemle örneklerin %16.98'inde (36/212) *Vibrio spp.* kontaminasyonu olduğu belirlendi. Bununla birlikte *Vibrio spp.* pozitif izolatlarda LAMP reaksiyonu bulgularına göre *V. cholerae* varlığı tespit edilemezken *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* kontaminasyon düzeyleri ise sırasıyla %36.1 (13/36) ve %5.5 (2/36) olarak saptandı. Bu çalışma, dondurulmuş muhafaza uygulanarak satışa sunulan dondurulmuş deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* gibi patojenik suşların varlığının tespiti ve bu gıdaların vibriosis bakımından önemini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda deniz ürünlerinde dondurulmuş muhafaza öncesi mikrobiyal kalitenin ve muhafaza esnasındaki koşulların ve hijyenik standartların oluşturulmasının önemli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dondurulmuş deniz ürünleri, LAMP, *Vibrio spp.*

Presence of *Vibrio spp.* in Frozen Seafoods by Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method

Abstract

In the study, it was aimed to determine the presence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae*, which are defined as high risk for public health in seafood. For this purpose, Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method, which is a fast and effective method for agent detection in samples, was used. Frozen seafoods obtained from different sales points were used as research material (n=212). ISO / TS 21872-1:2007 and ISO 21872-2:2007 methods were applied for the isolation from the samples using the classical cultural method. After DNA extraction performed on the suspected isolates, presence of *Vibrio spp.* was confirmed by genus-specific PCR reaction using the *gyrB1* gene region. A turbidity-based Real-Time LAMP was applied to positive samples using LAMP primer sets for *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae* targeted gene regions of *toxR*, *vwA* and *ompW*, respectively.

When the results were evaluated, it was determined that 16.98% (36/212) of the samples were contaminated with *Vibrio spp.* using the classical cultural method. However, the presence of *V. cholerae* could not be detected in *Vibrio spp.* positive isolates according to the LAMP reaction, while the contamination levels of *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* were found to be 36.1% (13/36) and 5.5% (2/36), respectively. This study reveals the presence of pathogenic strains such as *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in seafood products sold in frozen storage and the importance of these foods in terms of vibriosis. In this context, it is thought that it is important to establish microbial quality before frozen storage, conditions during storage and hygienic standards in frozen seafood.

Key Words: Frozen seafood, LAMP, *Vibrio spp.*

GİRİŞ

Vibriosis, genellikle yetersiz ısıtma maruz bırakılan balık ve kabuklu deniz ürünlerinin tüketilmesiyle meydana gelen gıda enfeksiyon ve intoksikasyon vakalarında en sık rastlanan etkenlerden olan *Vibrio spp.* tarafından meydana getirilen

hastalık olarak tanımlanmaktadır (1, 2). *Vibrio* türlerinden *V. anguillarum* ve *V. tapetis* gibi türler yalnızca akuatik hayvanlarda gözlenirken *V. cholerae* gibi türler de yalnızca insanlar için oldukça patojen olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra genus içindeki *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* gibi

çok az tür de hem insan hem de akuatik hayvanlar için patojen olarak kabul edilmektedir (2-4).

Vibrinoceae familyası; Gram negatif, virgül şeklinde, polar flagellaları ile hareket özelliğine sahip, fakültatif anaerob, katalaz ve oksidaz pozitif basillerden oluşmaktadır. *Vibrio* türleri; D-glikoz, dekstrin, glikojen, N-asetil-D-glikozamin, D-fruktoz, maltoz, D-trehaloz, metil pirüvat, L-asparjin asonit, L-prolin veya inosini karbonhidrat kaynağı olarak kullanırlar (3).

Deniz kaynaklı ürünlerin halofilik *Vibrio* spp., *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* gibi patojenleri bulundurabildiği ve dışıyla kirlenmiş su kaynaklarından elde edilen balık ve kabuklu su ürünlerinin *V. cholerae* gibi fırsatçı patojenleri içerebildiği belirtilmektedir (5). Bunun yanı sıra, soğuk sularda yaşayan balıkların derisinde hakim durumda olan bakteri cinsleri arasında *Vibrio* spp.'nin yer aldığı (6), tatlı su ve deniz balıklarının bağırsak mikroflorasında *Vibrio* türlerine ait bakterilerin bulunduğu bilinmektedir (4, 7). Özellikle yüksek risk taşıyan *Vibrio* türleri (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) dünya genelinde halk sağlığını tehdit eden mikroorganizmalar olarak kabul edilmektedir. Nitekim gıda kaynaklı mikrobiyal etkenler olarak yüksek risk taşıyan *Vibrio* türlerinin gıda ve çevresel kaynaklarda varlığının tespiti yönünde yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. *Vibrio* türleri; gastroenteritis, yumuşak doku enfeksiyonları ve bakteriyeminin ilerlemesiyle sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra sistemik enfeksiyonlar, duyarlı bireylerde *Vibrio* spp. tarafından oluşturulan fatal septisemi sonucu meydana gelebilmektedir (1, 8).

İlimiğe dayalı izotermal çoğaltma yöntemi (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) DNA'yı izotermal koşullarda, yüksek seçicilik, etkinlik ve hızda çoğaltmayı sağlayan bir moleküler yöntemdir. Bu yöntem, DNA polimeraz enzimi ve bakteriye özel gen bölgelerini içeren iki ya da üç çift primerden oluşan primer setini içermektedir (9). İner olarak adlandırılan primer, hedef DNA'ya bağlanarak reaksiyonu başlatıcı etki gösterir. Bir sonraki aşama ise, dış primer vasıtasıyla tek iplikçikli DNA'nın açığa çıkmasıdır. Daha sonra ikincil iç ve dış primerlerin gerçekleştirdiği DNA sentezi için şablon oluşturulmaktadır. Söz konusu primerler, kopyalanacak DNA'nın diğer uç bölgesine bağlanarak kök DNA ilmik parçasını üretir. Bir sonraki aşama ise, iç primerin üretilen ilmiğe hibridize olarak DNA'nın ayrılmasının başlaması ile orijinal kök ilmik DNA ve aynı uzunluktaki yeni kök ilmik DNA elde edilmesidir (10). Reaksiyon döngüsüyle, yaklaşık bir saat gibi kısa bir sürede başlangıç DNA miktarı 10^9 kopyaya erişebilmektedir. PCR bazlı moleküler yöntemler, ek donanımlar gerektirdiğinden geniş kapsamlı laboratuvar şartlarına ihtiyaç duyulmaktadır (9). LAMP metodunun PCR metodundan en önemli farkı, izotermal sıcaklıklarda gerçekleşmesidir. Bunun yanı sıra LAMP metodunda, pozitif olarak tespit edilen örnekler herhangi ileri bir işleme gerek duyulmaksızın gözle görülebilir beyaz bir çökelti oluşumuyla karakterizedir. Bu çökelti, amplifikasyon sonucu oluşan ürünlerin magnezyum sülfat ile birleşmesi sonucu oluşan magnezyum pirofosfattır. Magnezyum pirofosfatın oluşturduğu bulanıklık, çıplak gözle kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (11). Bunun yanı sıra turbidite tespiti sağlayan basit düzenekli cihazlarla kantitatif ölçüm de gerçekleştirilebilmektedir. Son yıllarda geliştirilen ve

pahalı bir aygıt gerektirmeyen, hızlı ve yüksek özgünlüğe sahip olan LAMP, bu özelliği sayesinde teşhisin hızlı yapılması gerekliliği olan gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonların tanısında önümüzdeki yıllarda daha yaygın olarak kullanılacak bir yöntem olarak görülmektedir. LAMP metodu çok sayıda patojen mikroorganizmada olduğu gibi *Vibrio* türlerinin tespitinde de uygulanmıştır (12-16).

Düşük sıcaklıklarda özellikle de dondurulmuş muhafazada mikrobiyal ve enzimatik reaksiyonlar kontrol altına alınsa da patojenler tam olarak yıkılmamakta ve önemli bir kısmı uygun muhafaza sıcaklıklarında yeniden metabolik olarak aktif hale gelebilmektedir. Bu nedenle özellikle son yıllarda Türkiye'de ve Dünya'da tüketimi giderek artan dondurulmuş muhafaza edilen deniz ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesi halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Bu çalışmada, dondurulmuş olarak satışa sunulan deniz ürünlerinde yüksek riskli *Vibrio* türleri olan *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae*'nin LAMP yöntemi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Numunelerin Temini

Araştırma materyali olarak Konya ilinde bulunan süpermarket ve balık hallerinden 2018 yılı Mart ve Temmuz ayları arasında toplanan örnekler kullanıldı. Toplam 212 adet dondurulmuş deniz ürünü; hamsi fileto (*Engraulis encrasicolus*, n=20), hamsi bütün, (*E. encrasicolus*, n=25), mezgit balık köfte (*Merlangius merlangus*, n=10), ahtapot (*Octopus vulgaris*, n=6), karides (*Parapenaeus longirostris*, n=20), kalamar halka (*Loligo vulgaris*, n=20), kalamar çitir halka (*L. vulgaris*, n=15), kabuklu Akivades midyesi (*Tapes decussatus*, n=15), iç Akdeniz midye (*Mytilus galloprovincialis*, n=15), kabuklu Akdeniz midye (*Mytilus galloprovincialis*, n=15), kabuklu Vongole midye (*Donax trunculus*, n=5), uskumru fileto (*Scomber scombrus*, n=10), sardalya (*Sardina pilchardus*, n=20), surimi çubuk (n=10), kaya levreği (*Argyrosomus regius*, n=6) toplanarak örnekler laboratuvar ortamına parçalanmış buz içeren numune toplama kaplarında getirilip en fazla 2 saat içerisinde analize alındı.

Klasik Kültürel Metot

Klasik kültürel metot, ISO/TS 21872-1:2007 (17) ve ISO 21872-2:2007 (18) prosedürlerine göre uygulandı. Buna göre 25 g numune ve 225 mL alkali tuzlu peptonlu su (ASPW, Liofilchem, 610377), stomacher (Interscience, Fransa) kullanılarak steril bir stomacher poşeti (VWR, 432-3119) içerisinde 2 dk boyunca homojenize edildi. Homojenat, 37°C'de 6 saat ön inkübasyona alındı. Daha sonra, homojenatın üst kısmından 1'er mL alınarak 9'ar mL taze ASPW broth içeren tüplere aktarıldı. *V. parahaemolyticus* ve *V. cholerae* için 41±1°C, *V. vulnificus* için de 37±1°C'de 24 saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında ön zenginleştirme kültüründen tiyosülfat sitrat bile sükröz besiyeri (TCBS, Merck, 110263, Almanya) üzerine yayma plak yöntemi uygulanarak 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. TCBS Agarda gözlenen şüpheli *Vibrio* kolonilerinden 5'er adet seçildi ve %3 NaCl (w/v) ilaveli Nutrient Agar (Merck 105450, Almanya) üzerine yayma plak

yöntemiyle ekildi. Daha sonra şüpheli izolatlar oksidaz, katalaz, Gram boyama, mikroskop altında motilite testi, %0 ve %6 NaCl'de üreme açısından test edildi. *Vibrio* spp. şüpheli kolonilerin klasik PCR reaksiyonu ile doğrulanması amacıyla 493 bp büyüklüğündeki *gyrB* gen bölgesinin tespitine yönelik olan ve Teh ve ark. (19) tarafından dizayn edilen primer çifti kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 1. *Vibrio* türlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

| Primer | Sekans | Kaynak |
|-------------------|--|--------|
| <i>toxR</i> -FIP | TGAGATTCGCGAGGGTTGTAA-TTATTTTT-GGCACCTACTACCG | 20 |
| <i>toxR</i> BIP | GTTCCGTCAGATTGGTGTAGATC-TAGAAGGCAACCGATTGTT | |
| <i>toxR</i> -F3 | TTGGATTCCACGCGTTAT | |
| <i>toxR</i> -B3 | CGTTCAATGCACGTCTCA | |
| <i>toxR</i> -Loop | AGAACGTACCAGTGATGACACC | |
| <i>vvhA</i> -FIP | TGCCACTCGGCTACGATAACGTTTTT-GAGCTGTCACGGCAGTTG | 12 |
| <i>vvhA</i> -BIP | ACGCAGACAAAACGCTCACAGTTTTT-GAGCTTATCGCTTCCCAAT | |
| <i>vvhA</i> -F3 | TGGTTCGGTTAACGGCTG | |
| <i>vvhA</i> -B3 | GCCATCAACATAGCGGCTAA | |
| <i>ompW</i> -FIP | CAAGCGTTAACCCTAAGTGGGTATTTTT-TAAAGTGTTAAACACTCAAAGTGAG | 21 |
| <i>ompW</i> BIP | ACATCAGTTTTGAAGTCTCGCTTTTTAT-CACCAAGGCTACCTAAC | |
| <i>ompW</i> -F3 | CGGTAGTACCTAATGACAGTAG | |
| <i>ompW</i> -B3 | GCAAATGTTTTGTTCCACCAAT | |
| <i>ompW</i> -Loop | ACATAAGATTTCTACCTCTGGTGGT | |
| <i>gyrB1</i> | AGCCAAACNAAGAYAARYT | 19 |
| <i>gyrB2</i> | CGYARYTRTCYGGRTTRTRYTC | |

Referans Suşlar

Genus düzeyi ve tür düzeyinde pozitif kontrol amaçlı *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. vulnificus* ATCC 29307 ve *V. cholerae* ATCC 14035 suşları referans olarak kullanıldı.

DNA Ekstraksiyonu

Saf kültür ve toplanan numunelerden DNA ekstraksiyonu amacıyla kaynatma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla *Vibrio* spp. şüpheli olduğu tespit edilen kolonilerden 3-4 adet seçilerek 200 µL Tris-EDTA (TE, pH:8.0) solüsyonu içerisinde vorteks-lendi. Elde edilen bu bakteri süspansiyonu 95°C'lik ısıtıcı blokta 8 dk bekletildikten sonra 2-3 dk süre ile -20°C'deki buzdolabında bekletildi. Son olarak 10.000 g'de santrifüj işlemi (Nüve NF 1200 R, Türkiye) gerçekleştirildikten sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüpe aktararak LAMP reaksiyonu uygulanacak zamana kadar -20°C'deki buzdolabında muhafaza edildi.

LAMP

Klasik kültürel yöntemde *Vibrio* spp. şüpheli olarak değerlendirilen ve sonrasında *gyrB* bazlı PCR ile pozitif olarak doğrulanan örnekler LAMP yöntemi uygulandı. LAMP yönteminde hedef gen bölgeleri için, önceki çalışmalarda (12, 20, 21) dizayn edilen primerler kullanılmıştır.

LAMP reaksiyonu ile *V. parahaemolyticus* (*toxR*), *V. vulnificus* (*vvhA*) ve *V. cholerae* (*ompW*)'nın tür düzeyinde belirlenebilmesi ve Klasik PCR yöntemi ile *Vibrio* spp. (*gyrB*) şüpheli izolatlarının genus düzeyinde doğrulanması için kullanılan gen bölgelerine ait primer setleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Farklı konsantrasyonlardaki *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* ve *V. vulnificus* saf kültürlerinden elde edilen DNA dilüsyonları ile hazırlanan LAMP reaksiyon karışımının Real Time Turbidimeter (MVL300 Loopamp Realtime Turbidimeter LA-500, Eiken, Japonya)'de sıcaklık, reaksiyon süresi, MgSO₄ konsantrasyonu, primer oranları yönünden optimizasyonu sağlandı. Buna göre, LAMP reaksiyon karışımı, F3 ve B3 primerleri (0.5 µM), FIP ve BIP primerleri (0.8 µM), Loop Primerleri (0.4 µM), Reaksiyon Tampon çözeltisi (10X) (2.5 µL), MgSO₄ (6 mM), 1 mL Bst DNA polimeraz (8U/µL, New England Biolab) ve 2 µL hedef DNA içerecek şekilde hazırlandı. Optimize edilen koşullarda analiz edilen örneklerdeki hedef bakteri varlığı, elde edilen time threshold (*tt*) değerine göre belirlendi.

BULGULAR

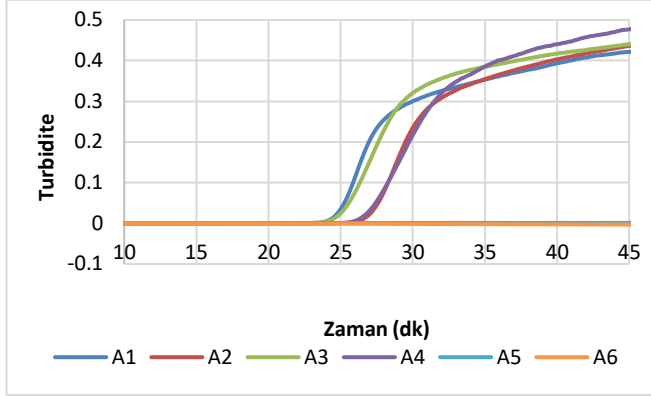
Araştırma sonuçlarına göre, analiz edilen 212 adet dondurulmuş deniz ürününün 36 (%16.98)'sı *Vibrio* spp. olarak doğrulandı. *Vibrio* spp. pozitif örneklerde LAMP metodu ile tespit edilen patojen türlerin sayısı ise 15/36 (%41.7) olarak belirlendi (Tablo 2).

| Numune türleri | <i>Vibrio</i> spp. | V.c | V.p | V.v | TOPLAM |
|-----------------------------------|--------------------|----------|-----------|----------|-----------|
| Hamsi (fileto n=20) | 1 | - | - | - | - |
| (<i>Engraulis encrasicolus</i>) | | | | | |
| Hamsi (bütün, n=25) | 4 | - | - | - | - |
| (<i>E. encrasicolus</i>) | | | | | |
| Balık köfte (mezgıt, n=10) | - | - | - | - | - |
| (<i>Merlangius merlangus</i>) | | | | | |
| Ahtapot (n=6) | 1 | - | 1 | - | 1 |
| <i>Octopus vulgaris</i> | | | | | |
| Karides (n=20) | 3 | - | 1 | - | 1 |
| <i>Parapenaeus longirostris</i> | | | | | |
| Kalamar (halka, n=20) | 4 | - | 3 | - | 3 |
| <i>Loligo vulgaris</i> | | | | | |
| Kalamar (çıtır halka, n=15) | 10 | - | 6 | 2 | 8 |
| <i>Loligo vulgaris</i> | | | | | |
| Kabuklu Akivades midyesi (n=15) | 2 | - | - | - | - |
| <i>Tapes decussatus</i> | | | | | |
| İç Akdeniz midye (n=15) | 2 | - | 2 | - | 2 |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | | | | | |
| Kabuklu Akdeniz midye (n=15) | 1 | - | - | - | - |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | | | | | |
| Kabuklu Vongole midye (n=5) | 2 | - | - | - | - |
| <i>Donax trunculus</i> | | | | | |
| Uskumru fileto (n=10) | 1 | - | - | - | - |
| <i>Scomber scombrus</i> | | | | | |
| Sardalya (n=20) | 5 | - | - | - | - |
| <i>Sardina pilchardus</i> | | | | | |
| Surimi çubuk* (n=10) | - | - | - | - | - |
| Kaya levreği (n=6) | - | - | - | - | - |
| <i>Argyrosomus regius</i> | | | | | |
| TOPLAM | 36 | - | 13 | 2 | 15 |

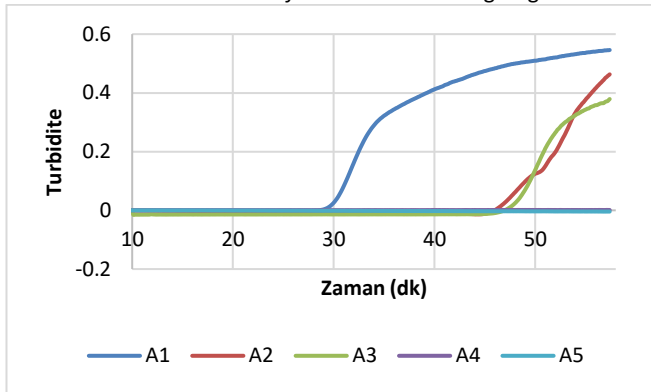
V.c.: *V. cholerae*; V.p.: *V. parahaemolyticus*; V.v.: *V. vulnificus*

*: İçerik bilgisinde çeşitli beyaz etli balık türlerinden üretildiği belirtilmektedir.

V. parahaemolyticus ve *V. vulnificus* pozitif örneklerin bazılarının Real Time Turbidimetredeki *tt* değerlerine ait grafikler Grafik 1 ve Grafik 2'de gösterilmektedir.

Grafik 1. *V. parahaemolyticus* pozitif örneklerinin bazılarında time threshold (tt) grafiği

A1: Pozitif kontrol (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802); A2-A4: Pozitif örnekler; A5,A6: Negatif kontrol

Grafik 2. *V. vulnificus* örneklerinin tt grafiği

A1: Pozitif kontrol (*V. vulnificus* ATCC 29307); A2,A3: pozitif örnekler; A4, A5: Negatif kontrol

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada dondurulmuş deniz ürünlerinde önemli patojen etkenlerden olan *Vibrio spp.*'nin analize alınan örneklerdeki tespit oranı 36/212 (%16.98) olarak bulunmuştur. Taze ve dondurulmuş deniz ürünlerinde *Vibrio spp.* varlığını belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirilen ulusal ve uluslararası düzeydeki çalışmalarda çalışmamızdan yüksek (22-25) ve düşük (26) kontaminasyon oranlarının tespit edildiği gözlemlenmiştir.

Noorlis ve ark. (22), Malezya'da hipermarketlerde satışı sunulan tatlı su balıklarından Asya kedi balığı (*Pangasius hypophthalmus*) ve kırmızı tilapia (*Oreochromis sp.*) türlerine ait 150 numunede MPN-PCR metoduyla *Vibrio spp.* ve *V. parahaemolyticus* varlığını araştırmışlardır. Araştırmacılar, örneklerde *Vibrio spp.* kontaminasyon oranlarını %98.67 olarak bulmuşlardır. Benzer bir çalışmada Raissy ve ark. (23), 100 adet istakoz ve 32 adet yengeç örneğinde *Vibrio spp.* kontaminasyon oranını %25 olarak tespit etmişlerdir. Son yıllarda yapılan ulusal bir çalışmada ise Avşar ve ark. (24), Sinop ilindeki balıkçılardan temin edilen 44 adet hamsi ve zargana balık örneklerinden klasik kültürel yöntemle 12 adet (%27.27) *Vibrio spp.* izole etmişlerdir. Dondurulmuş örneklerde benzer düzeyde kontaminasyon oranları, Vu ve ark. (25) tarafından Berlin'de *Vibrio spp.* varlığının araştırıldığı çalışmada 6/29 (%34.6) olarak bulunmuştur. Mevcut çalışmamızdan

daha düşük *Vibrio spp.* kontaminasyon düzeyi (%11) Ripabelli ve ark. (26) tarafından İtalya ve bazı Avrupa ülkelerinden toplanan dondurulmuş deniz ürünlerinde belirlenmiştir.

Bu çalışmada kontaminasyon oranının taze ürünlerdeki oranlara göre düşük bulunması, düşük sıcaklıkta muhafaza özellikle de dondurulmuş muhafazanın patojen kontrolünde etkili olduğu görüşünü destekler niteliktedir. Dondurulmuş muhafazanın etken tespit oranını azaltması yönünde sağlamış olduğu etkinin yanı sıra, deniz ürünlerinde mikrobiyal kaliteyi etkileyen birçok faktörün (örn., suyun mikrobiyal kalitesi, sıcaklığı, tuzluluk oranı, kirliliğin olduğu yerleşim bölgelerine olan mesafe, sudaki doğal bakteriyel flora, balıklar tarafından tüketilen besinler, avlama yöntemleri ve soğutma koşulları) kontaminasyon oranlarında farklılıklar oluşturabileceği ifade edilmektedir (27, 28).

Çalışmada *Vibrio spp.* olarak tespit edilen izolatlarda *toxR* gen bölgesinin tespitine yönelik gerçekleştirilen LAMP reaksiyonunda 13 (13/36, %36.1) örneğin *V. parahaemolyticus* pozitif olduğu tespit edilmiştir. Tüm örnekler dikkate alındığında ise *V. parahaemolyticus* pozitif örnekler 13/212 (%6.13) olarak tespit edilmiştir. Araştırma bulgularından daha yüksek (29, 30, 31) ve daha düşük (23, 32, 33, 34) kontaminasyon oranları elde edilen çalışmalar bulunmaktadır. Nitekim, Elhadi ve ark. (32) tarafından Malezya'da satışa sunulan 768 adet deniz ürününde *V. parahaemolyticus* kontaminasyon oranı %6.7 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Yang ve ark. (29) Çin'de marketler, balık çiftlikleri, restoranlar ve pişirme yerlerinden topladıkları 1293 adet deniz ürününün 251 (%19.4) tanesinin *V. parahaemolyticus* ile kontamine bulunduğunu bildirmişlerdir. Daha yüksek kontaminasyon oranına sahip bir başka çalışmada ise Tang ve ark. (31) Malezya'da *V. parahaemolyticus* varlığı ve antibiyotik direnç özelliklerini belirlemeye yönelik yapmış oldukları çalışmada toplam 80 adet midye, istiridye ve deniz tarağı örneğinde örnek gruplarına göre %40 ile %80 arasında bir kontaminasyon oranı tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra, Popovic ve ark. (33) tarafından 2010 yılında Hırvatistan'da yapılan bir çalışmada balık, midye, kabuklu ve yumuşakça türlerinden oluşan taze ve dondurulmuş deniz ürünlerinde *V. parahaemolyticus* tespit edilen örneklerin %5, İran'da Raissy ve ark. (23) tarafından yengeç ve istakozlarda yapılan çalışmada %3.03 ve daha yakın zamanda COVID pandemisi öncesi Dünya'nın deniz aşırı altı farklı bölgesinden Çin'e ihraç edilen deniz ürünlerinde incelenen 140 örneğin 8'inde (%5.7) pozitif olarak gözlemlenen kontaminasyon oranı ile çalışmamızdan daha düşük düzeye sahip olduğu gözlemlenmiştir (34). Taze ve dondurulmuş ürünlerde daha önce yapmış olduğumuz çalışmamızda ise dondurulmuş balık ve karideslerde *V. parahaemolyticus* kontaminasyon oranı LAMP yöntemiyle sırasıyla %2 ve %4 olarak tespit edilmiştir (16). Mevcut çalışmamızda gözlemlenen nispeten daha yüksek kontaminasyon oranının ise ön zenginleştirme ve klasik kültürel yöntemin dondurulmuş muhafaza esnasında hasara uğramış olan bakteri hücrelerinin yeniden kültüre edilebilir forma geçebilmeleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde Sadeghi ve ark. (35), dondurulmuş karideslerde ön zenginleştirme işleminin direkt kültür yöntemiyle karşılaştırıldığında TCBS agarda üreyen *V. parahaemolyticus*'un selektivitesini arttırdığını ortaya koymuştur.

İzolatlarda *V. vulnificus* varlığının tespiti amacıyla gerçekleştirilen LAMP reaksiyonunda iki izolatin (2/36, %5.5) tür spesifik *vvhA* gen bölgesine sahip olduğu bulunmuştur. *V. vulnificus* kontaminasyon oranının daha yüksek (23, 36) ve daha düşük bulunduğu çalışmalar (25) bulunmaktadır. Nitekim, Raissy ve ark. (23) yengeç ve istakozlarda *Vibrio* spp. türlerini belirledikleri çalışmada *V. vulnificus* tespit düzeyini %13.6 olarak bulmuşlardır. Benzer bir çalışmada Turner ve ark. (36), toplam 210 adet su ve plankton örneğinden *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae* izole etmişlerdir. Örneklerden en çok identifiye edilen *Vibrio* türleri, çalışmamızla benzer şekilde sırasıyla *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. cholerae* şeklinde olmuştur. Daha düşük kontaminasyon oranı, Vu ve ark. (25) tarafından Berlin'de satışı sunulan deniz ürünlerinde toplam 160 adet örnekte gerçekleştirilen çalışmada %0.6 olarak tespit edilmiştir.

V. cholerae'nin belirlenmesi amacıyla yapılan *ompWA* gen bölgesinin tespitine yönelik LAMP reaksiyonunda ise izolatların hiçbirinde *V. cholerae* bulunamamıştır. Benzer şekilde *V. cholerae*'nin tespit edilmediği çalışmalar (23, 37) olduğu gibi mikroorganizmanın farklı düzeylerde kontaminasyon varlığını bildiren çok sayıda araştırma da (32, 38, 39) bulunmaktadır.

Ulusal düzeydeki bir çalışmada İrkin ve ark. (37), Marmara ve Ege Denizi'nden avlanan ve işlenerek ihraç edilen karides numunelerinde klasik kültürel yöntemle *V. cholerae* varlığının saptanmadığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Raissy ve ark. (23) yengeç ve istakoz örneklerinde *Vibrio* spp. olarak tespit ettikleri izolatlarda *V. cholerae* varlığına rastlamadıklarını ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmamızdan farklı şekilde Wong ve ark. (38), dondurulmuş deniz ürünlerinde *Vibrio* spp. türlerini identifiye ettikleri çalışmada *V. cholerae* kontaminasyon oranını %14.9; Elhadi ve ark. (32) ise Malezya'da karides, kalamar, yengeç, istiridy ve midyelerde *V. cholerae* kontaminasyon oranını %4.7 olarak tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Ottaviani ve ark. (39) tarafından lokal ve ithal deniz ürünlerinde O1 ve non-O139 *V. cholerae* tespiti amacıyla yapılan çalışmada toplam *V. cholerae* kontaminasyon oranı %5.6 olarak tespit edilmiştir.

Araştırma sonuçlarına göre *Vibrio* spp. pozitif örneklerde en çok identifiye edilen tür *V. parahaemolyticus* ve daha sonra *V. vulnificus* şeklinde olmuştur. Bu açıdan değerlendirildiğinde benzer kontaminasyon oranlarına sahip çalışmalar (36) bulunmakla birlikte örneklerin toplanma yeri, su sıcaklığı, avlanma dönemi ve suyun tuzluluk oranı gibi pek çok faktöre bağlı olarak daha farklı kontaminasyon dağılımına sahip çalışmalar da (38, 40) bulunmaktadır.

Wong ve ark. (38) tarafından satışı sunulan dondurulmuş deniz ürünlerinde *Vibrio* türlerini belirlemeye yönelik gerçekleştirilen çalışmada *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* ve *V. fluvialis*'in tespit oranlarının sırasıyla %36.0, %15.8, %14.9 ve %13.2 olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızdan farklı tür dağılımlarına sahip bir başka çalışmada Yano ve ark. (40), Tayland'da yetiştirme karideslerde patojenik *Vibrio* türlerinin prevalansını araştırdıkları çalışmada 16 karides örneğinin 15 tanesinde *V. cholerae*, 6 tanesinde *V. parahaemolyticus* ve 2 tanesinde *V. vulnificus* tespit etmişlerdir.

Araştırma kapsamında deniz ürünleri kaynaklı gıda enfeksiyon ve intoksikasyon vakalarında en sık rastlanan etkenlerden olan *Vibrio* spp. tespiti halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde özellikle dondurulmuş deniz ürünlerinde uygun çözündürme ve yetersiz ısı işlem uygulanmasının enfeksiyon ve intoksikasyon riskini arttırabileceği göz önüne alınmalıdır. Bununla birlikte, gıda kaynaklı hastalıkların önemli bir kaynağını oluşturan deniz ürünlerinde önem arz eden mikrobiyal etkenlerin LAMP gibi pahalı alt yapı gerektirmeyen, yüksek özgünlüğe sahip, kısa sürede tespit sağlayan moleküler yöntemlerle araştırılmasının yaygınlaştırılması gerektiği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Araştırmayı 15401068 numaralı proje ile destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz. Araştırma özeti "3rd International Congress on Advances in Veterinary Science and Technics (ICAVST)" Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Ina-Salwany MY, Al-saari N, Mohamad A et al. (2019). Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. J Aquat Anim Health. 31 (1): 3-22.
2. Helmi AM, Mukti AT, Soegianto A, Effendi MH. (2020). A Review of Vibriosis in Fisheries: Public Health Importance. Sys Rev Pharm. 11 (8): 51-58.
3. Janda JM, Newton AE, Bopp CA. (2015). Vibriosis. Clin. Lab. Med. 35(2): 273-288.
4. Baker-Austin C, Oliver JD, Alam M et al. (2018). *Vibrio* spp. infections. Nat Rev Dis Primers. 4(1): 1-19.
5. Heperkan D. (2016). Temel Gıda Mikrobiyolojisi, Editör: Heperkan D. Bölüm: Gıdaların Normal Mikrobiyolojik Kalitesi ve Önemi. Osmanlı Mücellit Matbaacılık, Bursa. s.41-50.
6. Al-Ashhab A, Alexander-Shani R et al. (2022). Fish Skin Microbiota Under Healthy and Diseased Conditions. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1311488/v1>.
7. Liu C, Zhao LP, Shen YQ (2021). A Systematic Review of Advances in Intestinal Microflora of Fish. Fish Physiol. Biochem. 47(6): 2041-2053.
8. Zarei M, Borujeni MP, Jamnejod A, Khezzadeh M. (2012). Seasonal Prevalence of *Vibrio* species in Retail Shrimps with an Emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. Food Control. 25: 107-109.
9. Garg N, Ahmad FJ, Kar S. (2022). Recent Advances in Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Rapid and Efficient Detection of Pathogens. CRMICR, 3, 100120. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100120>
10. Mori Y, Notomi T. (2009). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): a Rapid, Accurate, and Cost-effective Diagnostic method for Infectious Diseases. J. Infect. Chemother. 15(2): 62-69.
11. Tomita N, Mori Y, Kodama H, Notomi T. (2008). Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products. Nat Protoc. 3: (877-882).

12. Ren CH, Hu CQ, Luo P, Wang QB. (2009) Sensitive and Rapid Identification of *Vibrio vulnificus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Microbiol Res.* 164(5): 514-521.
13. Okada K, Chantaroj S, Taniguchi T, Suzuki Y, Roobthaisong A, Puiprom O, Honda T, Sawanpanyalert P. (2010). A Rapid, Simple and Sensitive Loop-mediated Isothermal Amplification Method to Detect Toxigenic *Vibrio cholerae* in Rectal Swap Samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 66:135-139.
14. Jones JL, Hara-Kudo Y, Krantz JA et al. (2012) Comparison of Molecular Detection Methods for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Food Microbiol.* 30:105-111.
15. Telli AE, Doğruer Y. (2019). Discrimination of Viable and Dead *Vibrio parahaemolyticus* Subjected to Low Temperatures Using Propidium Monoazide—quantitative Loop Mediated Isothermal Amplification (PMA-qLAMP) and PMA-qPCR. *Microb Pathog.* 132: 109-116.
16. Doğruer Y, Telli AE. (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(4): 349-355.
17. International Organization for Standardization (2007). ISO/TS 21872–1:2007. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Horizontal Method for the Detection of Potentially Enteropathogenic *Vibrio* spp.* —part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. <https://www.iso.org/standard/38278.html>.
18. International Organization for Standardization (2007). ISO/TS 21872–2:2007. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Horizontal Method for the Detection of Potentially Enteropathogenic *Vibrio* spp.* — Part 2: Detection of Species Other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. International Organization for Standardization (ISO). <https://www.iso.org/standard/38279.html>.
19. Teh CSJ, Chua KH, Thong KL (2010): Simultaneous Differential detection of Human Pathogenic and Nonpathogenic *Vibrio* Species Using a Multiplex PCR Based on *gyrB* and *pntA* genes. *J Appl Microbiol.* 108: 1940-1945.
20. Chen S, Ge B. (2010). Development of a *toxR*-based Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol.* 10(41): 1-9.
21. Srisuk C, Chaivisuthangkura P, Rukpratanporn S, Longyant S, Sridulyakul P, Sithigorngul P. (2010). Rapid and Sensitive Detection of *Vibrio cholerae* by Loop-mediated Isothermal Amplification Targeted to the Gene of Outer Membrane Protein *ompW*. *Lett Appl Microbiol.* 50(1): 36-42.
22. Noorlis A, Ghazali FM, Cheah YK ve ark. (2011). Prevalence and Quantification of *Vibrio* Species and *Vibrio parahaemolyticus* in Freshwater Fish at Hypermarket Level. *Int Food Res J.* 18 (2): 689-695.
23. Raissy M, Moumeni M, Ansari M, Rahimi E. (2012). Occurrence of *Vibrio* spp. in Lobster and Crab From the Persian Gulf. *J Food Safety.* 32: 198-203.
24. Avşar C, Berber İ, Yıldırım AK. (2016). Sinop İlindeki Hamsi ve Zargana Balıklarından *Vibrio* spp. İzolasyonu ve Karakterizasyonu. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 73(2): 121-130.
25. Vu TTT, Alter T, Huehn S. (2018). Prevalence of *Vibrio* spp. in Retail Seafood in Berlin, Germany. *J Food Protection.* 81(4): 593-597.
26. Ripabelli G, Sammarco ML, Fanelli I, Grasso GM. (2004). Detection of *Salmonella*, *Listeria* spp., *Vibrio* spp., and *Yersinia enterocolitica* in Frozen Seafood and Comparison with Enumeration for Faecal Indicators: Implication for Public Health. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità.* 16(4): 531-539.
27. Beyari EA, Aly MM, Jastaniah SD. (2021). Incidence of Food-borne Bacteria That Cause Serious Health Hazards in Fish: A Review. *Annals of Medical and Health Sciences Research | Volume, 11(S4).*
28. Wei Q, Wang X, Sun DW, Pu H. (2019). Rapid Detection and Control of Psychrotrophic Microorganisms in Cold Storage Foods: A Review. *Trends Food Sci Technol.* 86: 453-464.
29. Yang ZQ, Jiao XA, Zhou XH, Cao GX, Fang WM, Gu RX. (2008). Isolation and Molecular Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from Fresh, Low-temperature Preserved, Dried, and Salted Seafood Products in Two Coastal Areas of Eastern China. *Int J Food Microbiol.* 125(3): 279-285.
30. Rodriguez Castro A, Ansedo-Bermejo J, Blanco-Abad V, Varela-Pet J, Garcia-Martin O, Martinez-Urtaza J. (2010). Prevalence and Genetic Diversity of Pathogenic Populations of *Vibrio parahaemolyticus* in Coastal Waters of Galicia, Spain. *Environ Microbiol Rep.* 2 (1): 58-66.
31. Tang JYH, Wan-Rosli WF, Abdul-Razak NH, Yeo CC, Abu Bakar CA, Son R. (2014). Incidence and Antibigram of *Vibrio parahaemolyticus* in Processed and Frozen Bivalve Mollusks in Kuala Terengganu, Malaysia. *Int Food Res J.* 21(4): 1349-1353.
32. Elhadi N, Radu S, Chen CH, Nishibuchi M. (2004) Prevalence of potentially Pathogenic *Vibrio* Species in the Seafood Marketed in Malaysia. *J Food Protection.* 67(7): 1469-1475.
33. Topić Popović N, Benussi Skukan A, Džidara P. ve ark. (2010). Microbiological Quality of Marketed Fresh and Frozen Seafood Caught off the Adriatic Coast of Croatia. *Vet med.* 55(5): 233-244.
34. Fu S, Wang W, Wang Q, He F, Hao J, Pang B. (2021). Surveillance of Enteric Pathogens in Imported Seafood and Environmental Surfaces in Five Seafood Markets before the Outbreak of COVID-19. *Biosafety and Health.* 3(4): 183-186.
35. Sadeghi S, Thong KL, Chai LC. (2019). Pre-enrichment Step, Incubation Temperature and Type of Selective Media Affect the Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Detection Efficiency in Frozen Prawns. *JCF.* 14(4): 355-364.
36. Turner JW, Malayil L, Guadagnoli D, Cole D, Lipp EK. (2013). Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* with Respect to Seasonal Fluctuations in Temperature and Plankton Abundance. *Environ Microbiol.* 16(4): 1019-1028.
37. İrkin R, Korukluoğlu M, Tavşanlı H. (2007). Microbial Properties of Some Sea Products Intended for Export. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 64 (1): 26-30.
38. Wong HC, Chen LL, Yu CM. (1995). Occurrence of vibrios in frozen Seafoods and Survival of Psychrotrophic *Vibrio cholerae* in Broth and Shrimp Homogenate at Low Temperatures. *J food protection.* 58(3): 263-267.
39. Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, et al. (2009) Prevalence and Virulence Properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* Strains from Seafood and Clinical Samples Collected in Italy. *Int J Food Microbiol.* 132(1): 47-53.
40. Yano Y, Hamano K, Satomi M, Tsutsui I, Ban M, Aue-Umneoy D. (2014). Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio* species Related to Food Safety Isolated from Shrimp Cultured at Inland Ponds in Thailand. *Food Cont.* 38: 30-36.

✉ Sorumlu Yazar:

A. Ezgi TELLİ

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE

E-posta: ezgiyilmaz@selcuk.edu.tr