



## Mavi Yengeçlerden *Vibrio parahaemolyticus*'un İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Bazı Antibiyotiklere Karşı Direnç Profillerinin Belirlenmesi\*

Sadık BÜYÜKYÖRÜK<sup>1</sup>, Meltem ÇALIŞKAN<sup>2</sup>, Cemil ŞAHİNER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Aydın/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Aydın/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 08.03.2022

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 15.03.2022

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Büyükyörük S, Çalışkan M, Şahiner C. Mavi Yengeçlerden *Vibrio parahaemolyticus*'un İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Bazı Antibiyotiklere Karşı Direnç Profillerinin Belirlenmesi. Bozok Vet Sci (2022) 3, (1):1-4.

**Özet:** Bu çalışmanın amacı Aydın İli ve çevresinden temin edilen mavi yengeçlerden *Vibrio parahaemolyticus*'un izolasyonu, identifikasyonu ile bu suşların antibakteriyel direnç profillerinin belirlenmesidir. İzole edilen altmış adet şüpheli izolattan 4'ü, real-time PCR ile *Vibrio parahaemolyticus* olarak tanımlanmıştır. Bu suşların, penicillin G, clindamycin, piperacilin, amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloksacin ve gentamicin gibi antibiyotiklere karşı dirençlilikleri disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Tüm izolatların penicillin G ve clindamycin'e karşı dirençli olduğu, diğer antibiyotiklere karşı ise değişen düzeylerde duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mavi yengeç, *Vibrio parahaemolyticus*, Antibiyotik dirençlilik, Halk sağlığı

## Isolation, Identification and Determination of Some Antibiotics Resistance Profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from Blue Crabs\*

**Abstract:** The purpose of this study was the isolation, identification and determination of antibacterial resistance profiles of *Vibrio parahaemolyticus* from blue crabs obtained from Aydın province. Out of four isolates from sixty suspected isolates were identified as *Vibrio parahaemolyticus* by real-time PCR. The susceptibility level of these strains to antibiotics, such as penicillin G, clindamycin, piperacilin, amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloxacilin and gentamicin was identified with disc diffusion method. It was determined all isolates were resistant to penicillin G and clindamycin and sensitive to other antibiotics at varying levels.

**Keywords:** Blue crabs, *Vibrio parahaemolyticus*, Antibiotic resistance, Public health

### 1.Giriş

Kabuklu ve yumuşakçalar, balık dışında tüketilmesi tercih edilen başlıca su ürünleridir. Kabuklular sınıfında istakoz, karides, yengeç ve kerevit yer alırken yumuşakçalar içerisinde midye, istiridye, mürekkep balığı ve tarak bulunmaktadır (1). Yengeçler, et kalitesinin ve ekonomik değeri bakımından birçok ülkede yüksek oranda talep görmektedir. Mavi yengeç (*Callinectes sapidus*), dünyada ve Türkiye'de avcılığı ve yetiştiriciliği yapılan en önemli yengeç türlerinden biridir. Ülkemizde özellikle Ege ve Akdeniz bölgelerinde tüketimi ve ticari olarak önemi her geçen gün artmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu'na göre 2016 yılında avlanan kabuklu ve yumuşakça toplam miktarı 37739,1 ton olup, bu verinin 2,0 tonu mavi yengece aittir ve bu miktardaki mavi yengeç, tamamen insan tüketiminde kullanılmıştır (2). *Vibrio* (*V.*) cinsi; virgül şeklinde, Gram Negatif, hareketli, sporsuz ve kapsülsüz, aerob veya fakültatif anaerob organizmalardır (1). Optimal gelişme sıcaklıkları 22-40°C arasındadır (2). Sporsuz ve kapsülsüz olmasından dolayı farklı çevre koşullarında canlılığını

devam ettiremediğinden dolayı asıl habitatını tatlı ya da tuzlu su ile bu ortamda yaşayan organizmalar oluşturmaktadır (3). Son yıllarda antibiyotik dirençlilik, antimikrobiyallerin aşırı ve/veya kontrolsüz kullanılmasından dolayı kendini belli etmiştir (4). Antibiyotik dirençliliğinin insanlarda ve hayvanlarda patojen organizmalarda gelişmesi durumunda önemli bir halk sağlığı problemi yaratabilmektedirler (5). *V. cholerae*, içme suyu ve gıdalarla bulaşabilen ve pirinç suyu görünümünde şiddetli bir diyarenin etkeni olup *Vibrio* cinsindeki önemli etkenlerden birisidir. Bunun dışında *V. parahaemolyticus*, akut gastroenterite ve kanlı diyareye sebep olabilmektedir. Ayrıca bu soyda, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, ve *V. damsela*; yara enfeksiyonları, septisemi, menenjit gibi gastrointestinal sistem dışı semptomlara da sebep olmaktadır (6). Gıda toksikasyonlarına sebep olabilmesi adına riskli gıdalar arasında su ve su ürünleri başlıcalarıdır (7-9). Mavi yengeçler, aynı diğer kabuklularda ya da su ürünlerinde olduğu gibi hızlıca bozulabilen bir yapıya sahip olmasından dolayı yakalandıktan ya da

✉: sbuyukyork@adu.edu.tr

\* Bu çalışma, 9. Ulusal ve 3. Uluslararası Veteriner Gıda Hijyeni Kongresinde poster bildiri olarak sunulmuştur (04-07 Kasım 2021, Antalya).

yetiştiriciliği yapıldıktan sonra mümkün olan en kısa sürede dondurulmalı ya da kaynatılmalıdır (10). *Vibrio* cinsinde yer alan organizmaların, su ile ilgili tabiatta bulunabilmelerinden dolayı bu su veya su ürünlerinin tüketilmesiyle birlikte gıda enfeksiyonlarına ya da intoksikasyonlarına rastlanılmaktadır (11).

Bu çalışmada, mavi yengeç örneklerinden *V.parahaemolyticus*'un izolasyonu, identifikasyonu ile antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Örneklem

*Vibrio*'lar, sıcak yaz aylarında daha sıklıkla kendilerini belli ettiği için, toplam 30 adet mavi yengeç (*Callinectes sapidus*) örneği Aydın İli ve çevresindeki balıkçılardan Mayıs-Eylül aylarında temin edildi.

### 2.2. *Vibrio parahaemolyticus*'un izolasyonu ve identifikasyonu

*Vibrio* türlerinin belirlenmesi amacıyla, 25 g örnek, 225 ml Alkali salin peptonlu su (Oxoid, CM1117)'da 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra bu inkübasyon sıvısından 1ml örnek Thiosulfate Citrate Bile Sucrose TCBS (Oxoid, CM0333B)'a geçiş yapıldı ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Bu besi yerinde üreyen şüpheli kolonilere (2-3 mm çapında ve sükröz negatif olduğu için yeşil ile mavi-yeşil renkteki, her bir örnekten 2 adet koloni seçildi), %3 NaCl içeren Nutrient Broth (Oxoid, CM0501) ve Nutrient Agar (Oxoid, CM0309) 37°C'de bir gece inkübe edilerek ileri saflaştırma işlemleri uygulandı ve bu izolatlar (n=60), Real Time PCR ile onaylanıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi (12). PCR ile onaylama işlemi için DNA izolasyonu Roche firmasının talimatları doğrultusunda yapıldı. Bu amaçla High Pure PCR Template Preparation kiti ile çalışıldı.

DNA'ların elde edilmesiyle, uygulanacak olan PCR koşulları ise, Eschbach ve ark. (11)'e göre yapıldı. Bu amaçla; Tüm PCR analizleri, TaqMan prob prensibine göre, Roche Light Cycler 480 ile ABI Prism 7700 Sequence Detector ve LightCycler 480 software (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak yapıldı.

Tek bir PCR siklus;

95°C'de 10 dk başlangıç denatürasyonu,

95°C'de 20 sn ve 45 siklus denatürasyon,

60°C'de 30 sn bağlanma (annealing),

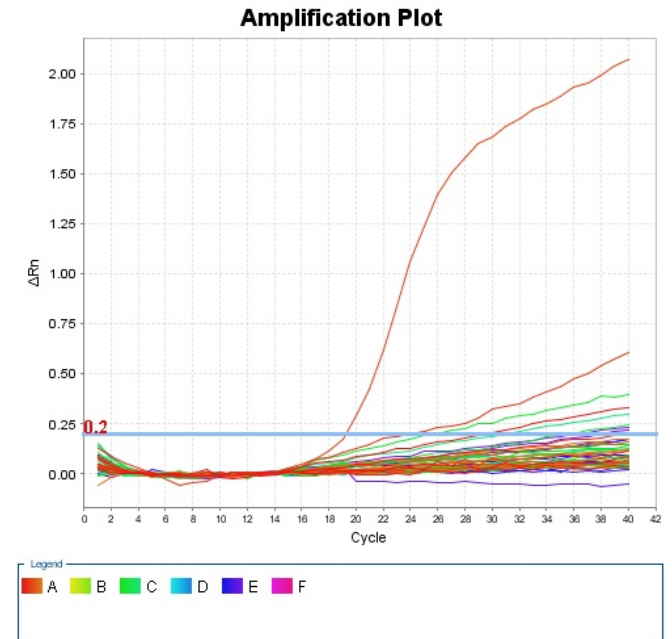
72°C'de 20 sn uzatma (extension) uygulandı ve *V. parahaemolyticus* sentetik plazmid kontrol, pozitif kontrol olarak kullanıldı (11).

### 2.3. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

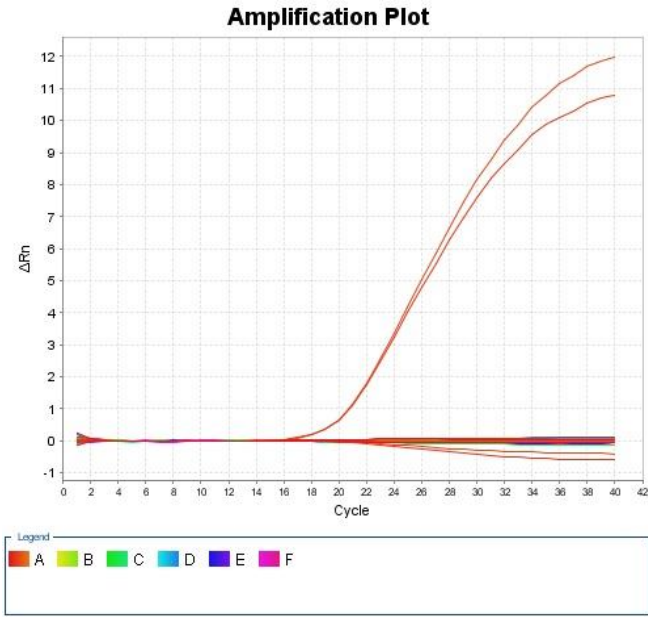
Real Time PCR ile *V. parahaemolyticus* olarak onaylanmış suşlar için penicillin G (10 unit), clindamycin (2 µg), piperacilin (100 µg), amoxicillin-clavulanic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg) ve gentamicin (10 µg) antibiyotiklerine karşı dirençlilikleri disk-difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi (13). Bakteriyel dirençlilik, clindamycin, piperacilin, amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloxacin ve gentamicin için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2010) klavuzu, penicillin G için ise CLSI (2016) kılavuzuna göre değerlendirildi.

### 3. Bulgular

Konvansiyonel yöntemlerle elde edilen ve real-time pcr ile analize alınıncaya kadar -80°C'de muhafaza edilen 60 adet izolatın, 4 adedi (%6,66) polimeraz zincir reaksiyonu ile *V. parahaemolyticus* olarak pozitif sonuç vermiştir. Real-Time PCR görüntülerine ait şekiller "Şekil 1 ve 2'de gösterilmektedir. Her bir örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol dublike çalışılmıştır. Real Time PCR ile *V. parahaemolyticus* olarak onaylanmış izolatların antibiyotik dirençlilikleri Tablo 1'de özetlenmiştir. Buna göre penisilin G ve klindamisine tüm izolatlar direnç gösterirken diğer antibiyotiklere değişen düzeylerde direnç göstermişlerdir.



Şekil 1: Real Time PCR sonuçlarına göre örneklere, pozitif kontrole ve negatif kontrole ait amplifikasyon görüntüsü



**Şekil 2:** Pozitif kontrollere ve negatif kontrollere ait amplifikasyon görüntüsü

**Tablo 1:** Real Time PCR ile *Vibrio parahaemolyticus* olarak onaylanmış izolatların antibiyotik dirençlilikleri.

Antibiyotik	İz*4	İz10	İz33	İz37
Penicillin G	R	R	R	R
Clindamycin	R	R	R	R
Piperacilin	S	S	S	R
Amoxicillin- Clavulanic acid	I	R	I	R
Ciprofloxacin	S	S	S	R
Gentamicin	S	S	S	R

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

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda şüpheli *V. parahaemolyticus* olarak izole edilen 60 adet suşun, real time pcr ile yapılan analizlerinden, 4 tanesi (%6,66) pozitif reaksiyon 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 ayırımı için propidium monoazide (PMA)-qLAMP yoluyla araştırmışlar ve bu organizmayı sırası ile 8 (%4), 12 (%6) ve 12 (%6) oranlarında tespit etmişlerdir (14). Xu ve ark. (2017), incelemiş oldukları 50 adet karides örneğinden 2 adet (%10) *V. parahaemolyticus* ve 1 adet (%5) *V. vulnificus*'u multiplex PCR ile tespit etmişlerdir (4).

Chang ve ark. (2017), *V. parahaemolyticus*'u incelemiş oldukları 117 adet istiridyeden 44 tanesinde (%37,6), Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül ve Ekim aylarında sırası

ile 3 (%6.8), 11 (%25.0), 16 (%36.4), 8 (%18.2) ve 6 (%13.6) oranında izole etmişlerdir. Yine aynı çalışmada izole edilen bu 44 adet suşun antibiyotik dirençliliği incelenmiş; 6 izolatin gentamisine ve 40 izolatin vankomisine dahi direnç gösterdiği bildirilmiştir (7). Yaashikaa ve ark. (2016), *V. parahaemolyticus*'un antibiyotik dirençliliğini disk difüzyon ile kontrol etmiş ve çalışmamızdakine benzer şekilde bu mikroorganizmanın penisilin G ve clindamisine dirençli olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda, 11 adet izolattan birisinde piperasiline karşı dirençlilik tespit edilirken aynı çalışmada bu antibiyotiğe karşı dirençlilik belirtilmiştir (10).

Tan ve ark. (2017), 130 uskumru örneğinden 116 (%89,2)'sında toplam *V. parahaemolyticus*'u izole ederken, bu örneklerden 21'inin (%16,2) patojenik karakterde olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda disk difüzyon ile bu izolatların antibiyotik dirençlilik durumları incelenmiş, ampisilin sulbaktam, meropenem, seftazidim ve imipeneme yüksek oranda duyarlı, penisilin G ile ampisiline ise dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. İki (%2,99) izolatin ise çoklu antibiyotik (7 adet antibiyotiğe) dirençliliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir (13). Çalışmamızda da bir (%1,1) izolat, incelemiş olduğumuz tüm antibiyotiklere direnç göstermiştir. Maestu ve ark. (2016) incelemiş oldukları 101 adet midye örneğinde *V. cholerae* ya da *V. vulnificus*'u tespit edemezken, %68 oranında *V. parahaemolyticus*'u izole etmişlerdir. Tespit 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 (3).

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğinde ve Uluslararası Mikrobiyolojik Standartlar Komisyonu tarafından yengeçlerde *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*'nin bulunmaması gerektiği önerilmiştir. Kaya ve Yalçın (2018), incelemiş oldukları 180 adet mavi yengecin bu standarda uygun olmadığını bildirmişlerdir (2). Rodgers ark., (2014) Maryland Körfezindeki mavi yengeçlerde yaptıkları çalışmada ise *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* tespit etmişlerdir (15). Yalcinkaya ve ark. (16), mavi yengeçler üzerine yaptıkları çalışmada, *V. alginolyticus* (30.1%), *V. fluvialis* (10.8%), *V. damsela* (9.6%), *V. harveyi* (3.6%), *V. metschnikovii* (3.6%) ve *V. vulnificus*'u (2.4%) oranında izole etmişler ve türlere göre değişmekle birlikte doxycycline, tetracycline ve ciprofloxacin antibiyotiklerine hayli duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Parlapani ve ark. (2019), mavi yengeçlerin raf ömrü üzerine yaptıkları çalışmada, +4°C'de ve 10°C'de bu süreyi sırasıyla 10 gün ve 6 gün olarak tespit etmişler ve bozulmada

dominant etkili florayı ise Rhodobacteraceae ailesi (%52) ve *Vibrio* spp. (%40.2) olarak bildirmişlerdir (17).

Gerek doğal yaşamdaki gerekse kültürü yapılan mavi yengeçler, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* ile enfekte olabilmekte (18) ve hemolenf yumrularında bu etkenlerin yüksek sayılarda bulunmasıyla birlikte solunum kapasitesinin, metabolik aktivitenin ve diğer fizyolojik etkinliklerin düşmesi ile birlikte yengecin zayıf düşmesine ve ölümüne sebep olmaktadır (19).

Sonuç olarak, *Vibrio*'ların su ürünlerinde potansiyel bir biyoteknik olabildikleri için bu ürünlerin yetiştiriciliği ile ticaretinin yapıldığı yerlerde patojen *Vibrio* türlerinin izlenmesi, bu *Vibrio* türlerin bulunabileceği özellikle tüketime hazır gıdaların üretim akış hattında HACCP ve iyi üretim sistemlerinin uygulanmasına yönelik çalışmaların yapılması sağlanmalıdır. Halk sağlığının sağlanması adına su ürünlerinde önemli derecede bir risk arz eden bu patojen *Vibrio* türlerinin coğrafi dağılımlarının yoğun olduğu yerlerde takip sistemi ile rutin kontrollerin geliştirilmesi önerilmektedir.

#### Kaynaklar

- Baron S, Lesne J, Jouy E, Larvor E, Kempf I, et al. Antimicrobial susceptibility of autochthonous aquatic *Vibrio cholerae* in Haiti. *Frontiers Microbiology* 2016; 7: 1671-1683. doi: 10.3389/fmicb.2016.01671.
- Kaya KY ve Yalçın H. Mersin Körfezinde Avlanan Mavi Yengecin (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi* 2018; 6: 881-886. doi: 10.24925/turjaf.v6i7.881-886.1858
- Maestu AG, Leon AL, Souto RRR, Maneiro RV, Chapela MJ, et al. Presence of pathogenic *Vibrio* species in fresh mussels harvested in the southern Rias of Galicia (NW Spain). *Food Control* 2016; 59:759-765. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.054.
- Xu YG, Sun LM, Wang YS, Chen PP, Liu ZM, et al. 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* 2017; 71: 64-70. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.06.024.
- Cecchini F, Fajš L, Cosnier S, Marks RS. *Vibrio cholerae* detection: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *Trends in Analytical Chemistry* 2016; 79: 199–209. doi: 10.1016/j.trac.2016.01.017.
- Singh A and Barnard TG. Surviving the acid barrier: responses of pathogenic *Vibrio cholerae* to simulated gastric fluid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2016; 100: 815–824. doi: 10.1007/s00253-015-7067-2.
- Chang HK, Shin YJ, Jang SC, Yu HS, Kim SK, et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea: Resistance to various antibiotics and prevalence of virulence genes. *Marine Pollution Bulletin* 2017; 118: 261–266. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.02.070.
- Lü CH, Yuan Y, Sun N, Bi Z, Guan B, et al. Characterization of *Vibrio cholerae* isolates from 1976 to 2013 in Shandong Province. *Brazilian Journal of Microbiology* 2017; 48: 173–179. doi: 10.1016/j.bjm.2016.09.013.
- Li B, Chen R, Wang D, Tan H, Ke B, et al. Distribution and molecular characteristics of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates recovered in Guangdong Province, China, 1961–2013. *Infection, Genetics and Evolution* 2016; 37: 70–76. doi: 10.1016/j.meegid.2015.11.004.
- Yaashikaa PR, Saravanan A, Kumar PS. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from prawn (*Penaeus monodon*) seafood: Preservation strategies. *Microbial Pathogenesis* 2016; 99: 5-13. doi: 10.1016/j.micpath.2016.07.014.
- Eschbach E, Martin A, Huhn J, Seidel J, Heuer R, et al. Detection of enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*: performance of real-time PCR kits in an interlaboratory study European Food Research Technology 2017; 243: 1335–1342. doi:10.1007/s00217-017-2844-z.
- Tan CW, Rukayadi Y, Hasan H, Thung TY, Lee E, et al. Prevalence and antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different types of seafood in Selangor, Malaysia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2020; 27: 1602-1608. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.01.002.
- Tan CW, Malcolm TTH, Kuan CH, Thung TY, Chang WS, et al. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Short Mackerels (*Rastrelliger brachysoma*) in Malaysia. *Frontiers Microbiology* 2017; 8: 1087-1096. doi: 10.3389/fmicb.2017.01087.
- Doğruer Y ve Telli AE. Determination of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods using direct plate counting, quantitative loop-mediated isothermal amplification and propidium monoazide-qLAMP. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2020; 67: 349-355. doi: 10.33988/auvfd.603868.
- Rodgers C, Parveen S, Chigbu P, Jacobs J, Rhodes M, et al. Maryland Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* in blue crabs (*Callinectes sapidus*), seawater and sediments of the coastal bays. *Journal of Applied Microbiology* 2014; 117: 1198–1209. doi: 10.1111/jam.12608.
- Yalcinkaya F, Ergin C, Agalar C, Kaya S, Aksoylar Y. The presence and antimicrobial susceptibilities of human-pathogen *Vibrio* spp. isolated from blue crab (*Callinectes sapidus*) in Belek tourism coast, Turkey. *International Journal of Environmental Health Research* 2003; 13: 95–98. doi: 10.1080/0960312021000063304.
- Parlapani FF, Michailidou S, Anagnostopoulos DA, Koromilas S, Kios K et al. Bacterial communities and potential spoilage markers of whole blue crab (*Callinectes sapidus*) stored under commercial simulated conditions. *Food Microbiology* 2019; 82: 325–333. doi: 10.1016/j.fm.2019.03.011.
- Sullivan TJ, Neigel JE. Effects of temperature and salinity on prevalence and intensity of infection of blue crabs, *Callinectes sapidus*, by *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in Louisiana. *Journal of Invertebrate Pathology* 2018; 151: 82–90. doi: 10.1016/j.jip.2017.11.004.
- Thibodeaux LK, Burnett KG, Burnett LE. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. *The Journal of Experimental Biology* 2009; 212: 3428-3439. doi: 10.1242/jeb.033431.