

Gökkuşluğu Alabalığı Kökenli *Listonella anguillarum* İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu

Ertan Emek Onuk¹, Soner Altun², Muhammed Duman², İzzet Burçin Satıcıoğlu², H. Kaan Müştak³

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun

²Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa

³Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 07.11.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 23.11.2018

Özet: Bu çalışmada, gökkuşluğu alabalıklarından izole edilen altı *L. anguillarum* izolatı ve bir referans suş fenotipik ve genotipik özellikler açısından incelendi. İzolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde klasik mikrobiyolojik testler ve API 20 E strip testi kullanıldı. İzolatların moleküler identifikasyonu *amiB* genine dayanan *L. anguillarum* tür spesifik PCR uygulaması ve sonrasında aynı bölgenin sekans analizinin yapılmasıyla gerçekleştirildi. İzolatların dokuz farklı antibiyotiğe karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. Ayrıca izolatlar arasındaki olası klonal ilişkiler Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA (RAPD) metodu ile ortaya konuldu. API 20 E testlerinde izolatlar arasında β -Galaktosidaz, arginin dihidrolaz, sitrat, sorbitol, amygdalin ve arabinoz testlerinde farklılıklar görülmüştür. Tüm izolatların *L. anguillarum* spesifik 429 bp'lik bant verdiği saptanmış ve bu sonuç sekans analizi ile doğrulanmıştır. *L. anguillarum* izolatlarının çalışmada kullanılan dokuz farklı antibiyotiğe karşı değişik düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlendi. En yüksek direnç oranı neomisin ve linkomisin'e (% 100), en düşük direnç oranı ise doksisklin'e (% 14,2) karşı gözlemlendi. RAPD analizi sonucunda *L. anguillarum* izolatları % 60 benzerlik katsayısına göre bir unique tip ve beş alt türden oluşan bir küme (cluster) içerisinde gruplanmıştır. Bu çalışmanın balık kökenli *L. anguillarum* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili ileride yapılacak çalışmalara temel oluşturabileceği düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar, balık hastalıklarının tedavisinde uygun antimikrobiyal ajanların seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik, Genotiplendirme, Gökkuşluğu alabalığı, *Listonella anguillarum*

Phenotypic and Genotypic Characterization of *Listonella anguillarum* Isolates from Rainbow Trout

Abstract: In this study, six *L. anguillarum* isolates obtained from rainbow trout and one reference strains were examined in terms of phenotypic and genotypic characteristics. Conventional microbiological and API 20E tests were used to determine phenotypic characteristics of isolates. Molecular identification of isolates was carried out by applying the *L. anguillarum* specific PCR method based on the *amiB* gene followed by sequence analysis of the analysis of amplified product with the same primer pairs. Antimicrobial activity of isolates was determined by disk diffusion method against the nine different antibiotics. Additionally, possible clonal relationships between isolates were demonstrated by the RAPD-PCR method. There were differences between strains in terms of β -galactosidase, arginine dihydrolase, citrate, sorbitol, amygdalin and arabinose tests in API 20E system. In *L. anguillarum* specific PCR assay all of isolates gave the final PCR product of 429 bp and this result was confirmed by sequence analysis. *L. anguillarum* isolates were found to have different levels of antimicrobial activity against nine different antibiotics used in the study. There was a high incidence of resistance to neomycine and lincomycine (84%), and a low incidence of resistance to doxycycline (14.2%). In RAPD method, *L. anguillarum* isolates were grouped into one unique type and one cluster including five subtypes according to 60% similarity coefficient index. The present study was considered to may provide a basis for further studies on phenotypic and genotypic characterization of *L. anguillarum* isolates from fishes. Moreover the present results showed the importance of choosing appropriate antimicrobial agents for treatment of fish diseases.

Key words: Antibiotic, Genotyping, *Listonella anguillarum*, Rainbow trout

Giriş

Vibriozis çeşitli deniz ve tatlı su balıklarında, çift kabuklu ve eklem bacaklılarda ölümcül hemorajik septisemi ile seyreden ve tüm dünyada hem akua-

kültürde hem de larvikültürde önemli ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır [11]. Hastalığın etkeni olan *Vibrio anguillarum* başlangıçta Biotip 1 ve 2 olarak iki biyotipe ayrılmıştır [15]. Ancak, *V. anguillarum* biyotip 2 DNA teknolojisindeki geliş-

meler sonucunda *V. ordalii* adıyla yeni bir tür olarak yeniden sınıflandırılmıştır [28]. *V. anguillarum* biyotip 1 ise 5S ribozomal RNA (rRNA) gen dizisi analizine dayanarak *Listonella anguillarum* olarak yeniden sınıflandırılmıştır [21]. Ancak bazı araştırmacılar halen *V. anguillarum* ismini kullanmayı tercih etmektedirler [11, 35].

Vibriosis hastalığının neden olduğu ekonomik kayıpların etkili bir şekilde en aza indirilmesi ve uygun kontrol önlemlerinin alınması için *L. anguillarum*'un hızlı, doğru ve güvenilir bir şekilde saptanması önem arz etmektedir. Geleneksel olarak etkenin tanımlanması klinik ve histolojik bulguların yorumlanması, patojenin seçici bir ortamda kültüre edilmesi, morfolojik veya biyokimyasal özelliklerinin ortaya konulması ile yapılmaktadır [11]. Ancak karışık kültürlerden morfolojik ve biyokimyasal olarak *L. anguillarum*'un identifikasyonunda yanlış sonuçların elde edildiği bildirilmiştir [3, 14, 20]. Bunun yanında bakteriyel balık patojenlerinin identifikasyonunda API 20E minyatürize test sistemlerinin kullanımının giderek arttığı görülmektedir. Fakat API Web tabanında *V. anguillarum*'un bulunmaması bu sistemin kullanımını sınırlamaktadır [5, 25]. Klasik kültür ve minyatürize sistemlere dayanan saptama ve tanımlama tekniklerinde yaşanan bu sınırlamalar, bu yöntemlerin yerine kültürden bağımsız tekniklerin geçmesine veya onlar ile desteklenmelerine neden olmaktadır [5, 9]. Günümüzde *L. anguillarum* izolatlarının genetik olarak identifikasyonunda *rpoN* geni, *amiB* geni ve *empA* genini hedef alan spesifik PCR metotları geliştirilmiştir [13, 17, 35].

Moleküler tiplendirme metotları çevresel ve klinik örneklerden elde edilen izolatlar arasındaki ilişkiyi belirleyen güçlü araçlardır ve etkenlerin ortak bulaş yolları hakkında kanıtlar sağlarlar. Bakteriyel izolatların genetik olarak tiplendirilmesinde restriction fragment length polymorphism, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), RAPD PCR ve repetitive-sequence-based polymerase chain reaction gibi çeşitli moleküler yöntemler kullanılmıştır. Bu metotlardan PFGE'nin bakterilerin tiplendirilmesinde en iyi metot olduğu düşünülmektedir, ancak bu metodun prosesinin zahmetli olması, zaman gerektirmesi ve teknik olarak zor olması çok sayıda örneğin işlenmesinde rutin kullanımda sınırlamaktadır. PCR tabanlı yöntemlerden RAPD PCR

yöntemi PFGE ile karşılaştırıldığında hızlı ve uygulaması basit olan yöntemlerdir [6]. RAPD PCR metodu son yıllarda bakteriyel balık patojenleri arasındaki klonal yakınlıkların belirlenmesinde yaygın bir kullanım alanı bulmuştur [18, 23, 26].

Bu çalışma ile ülkemiz su ürünleri sektöründe, özellikle, alabalık işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olan *L. anguillarum* izolatlarının fenotipik ve genotipik karakterizasyonunun yapılması, izolatların antimikrobiyal profillerinin ortaya konulması ve izolatlar arası klonal ilişkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bakteriyel İzolatlar: Çalışmada Türkiye'nin değişik illerinden izole edilen altı *L. anguillarum* izolatı ve 1 referans suş (ATCC 14181) kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *L. anguillarum* suşları

No	İzolasyon Yeri	İzolasyon Yılı
1	İzmir	2012
2	Kütahya	2012
3	Bilecik	2012
4	Muğla	2012
5	İzmir	2012
6	İstanbul	2012
7	ATCC 14181	-

İzolatların Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi: İzolatların Gram morfoloji, oksidasyon-fermentasyon (O/F), jelatin hidrolizi, sitokrom oksidaz, katalaz, % 0 ve % 7, NaCl'de üreme, 37 °C'de üreme, indol, metil kırmızısı, voges proskaver (VP) reaksiyonu, arabinoz, inositol, sakkaroz, laktoz, mannitol ve glukoz'dan asit üretimi, vibriostatik ajan (O/129) duyarlılık ve Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) besiyerindeki koloni morfolojisi konvansiyonel mikrobiyolojik metotlar ile belirlendi. Ek olarak bütün izolatların, API 20E (BioMerieux) hızlı teşhis kiti yönergesine uygun olarak striplere ekimleri yapıldı ve 25°C'de 24 saat inkübe edilerek sonuçlar değerlendirildi.

***L. anguillarum* Spesifik PCR ve Sekans Analizi:** Konvansiyonel olarak identifiye edilen *L. anguillarum* izolatları moleküler olarak PCR metodu

ile doğrulandı. Bu amaçla öncelikle izolatlar a ait saf kültürlerden ticari DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, GmbH) kullanılarak kromozal DNA'lar elde edildi. *L. anguillarum* izolatlarının PCR ile moleküler konfirmasyonunda *N*-acetylmuramoyl-l-alanine amidase enzimini kodlayan *amiB* genine özgü van-ami 8 (5'-ACATCATCCATTTGTTAC-3') ve 417 (5'-CCTTATCACTATCCAAATTG-3') oligonukleotid primer seti kullanıldı [17]. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1.2 mM of MgCl₂ her bir dNTP'den 0.2 mM, her bir primerden 2 µM, 1.0 U Taq polymerase ve 5 µl template DNA içeren 25 µl PCR master mix'i oluşturuldu. Oluşturulan karışım 95°C'de 10 dk ön denatürasyonu takiben 95°C'de 30 sn denatürasyon, 56°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn uzama olmak üzere 25 siklus ve 72°C'de 7 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Sonuçta 429 bp'lik amplifikasyon ürününün görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Elde edilen 429 bp'lik amplifikasyon ürünlerinin sekans analizi Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer'da aynı primerler kullanılarak çift yönlü olarak yapıldı. Elde edilen sekanslar Blast programı kullanılarak GenBank veri tabanında bulunan mevcut sekanslar ile karşılaştırıldı. İzolatlar a ait sekans dizileri GenBank'a yüklenerek kabul numaraları alındı.

İzolatlar Arası Genetik İlişkinin Belirlenmesi: İzolatlar arası klonal ilişkinin belirlenmesinde M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') primerinin kullanıldığı RAPD PCR metodu kullanıldı [32]. Amplifikasyon aşaması Versalovic ve ark. [33] tarafından bildirilen metodun modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. Bu aşamada DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 2.5 mM MgCl, 200 µM her bir dNTP, 1.25 U Taq DNA polimeraz, 25 pmol primer ve 5 µl template DNA içeren 25 µl'lik bir master karışımı oluşturuldu. Bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 40°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 3 dk uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 7 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1.5'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi.

DNA profilleri CHEF-DR® III, Quantity One® yazılımı (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) ile

analiz edildi. Dendrogramları unweighted-pair grup metodu (UPGMA) ile oluşturuldu.

Antimikrobiyal Duyarlılık Testi: Tüm izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları Mueller-Hinton agar'da Kirby-Bauer disk difüzyon metodu ile test edildi [7]. Antimikrobiyal duyarlılıkların belirlenmesinde amoksisilin (25 µg), doksisisiklin (30 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (120 µg), florfenikol (30 µg), linkomisin (2 µg), neomisin (10 µg), oksiyetrasiklin (30 µg), ve sulfamethoksazoleazole+trimethoprim (25 µg) (Oxoid) diskleri kullanıldı. 24 - 48 saat inkübasyon sonrasında zon çapları ölçülerek kaydedilmiştir.

Bulgular

İzolatlarının Fenotipik Karakterizasyonu: *L. anguillarum* izolatlarının TSA besi yerinde 22 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda 1-2 mm çapında, yuvarlak, kenarları düz, hafif konveks, kabarık görünümde ve krem renginde, TCBS agarda ise sarı renkte koloniler oluşturduğu belirlendi. API 20E test sonuçlarına göre izolatlar arasında β-galaktosidaz (ONPG), arginin dihidrolaz (ADH), sitrat, sorbitol, amygdalin ve arabinoz testleri yönünden farklılıklar olduğu belirlendi (Tablo 2). Konvansiyonel mikrobiyolojik testler ile API 20E test sonuçları karşılaştırıldığında *L. anguillarum* izolatlarının büyük ölçüde benzer olduğu ancak lizin dekarboksilaz (LDC), VP ve sitrat testlerinde farklı sonuçların görüldüğü tespit edildi. Çalışmada kullanılan saha izolatlarının konvansiyonel testler ile belirlenmiş fenotipik özellikleri ve bu özelliklerin diğer araştırmacıların bildirmiş oldukları sonuçlar ile karşılaştırması Tablo 3'de verildi.

Tablo 2. *L. anguillarum* izolatlarının API 20E hızlı teşhis kiti test sonuçları

Fenotipik Özellikler	İzolat No						
	1	2	3	4	5	6	7
ONPG	+	+	+	-	+	+	+
ADH	+	-	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat Üretimi	-	+	+	+	-	+	-
H ₂ S Üretimi	-	-	-	-	-	-	-
Ureaz Üretimi	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-
İndol Üretimi	+	+	+	+	+	+	+

Fenotipik Özellikler	İzolat No						
	1	2	3	4	5	6	7
VP	+	+	+	+	+	+	+
Jelatin Hidroliz	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz*	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol*	+	+	+	+	+	+	+
İnositol*	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol*	-	+	+	+	+	+	-
Rhamnoz*	-	-	-	-	-	-	-
Sakkaroz*	+	+	+	+	+	+	+
Melibioz*	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin*	-	-	-	-	-	-	+
Arabinoz*	-	-	-	+	-	-	+

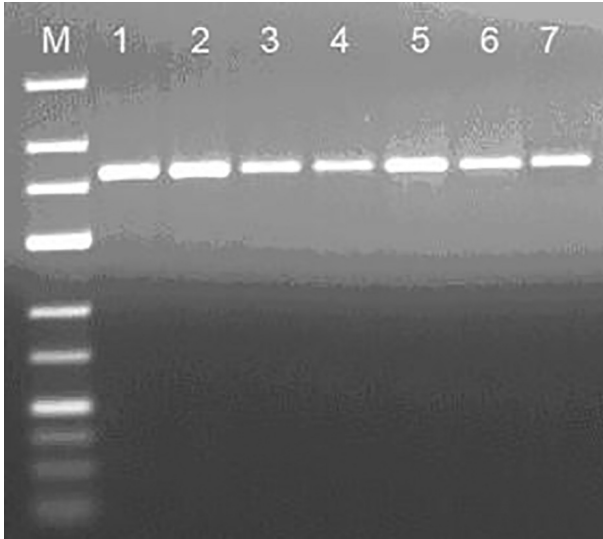
ONPG: β -Galaktosidaz, ADH: Arginin dihidrolaz, LDC: Lizin dekarboksilaz, ODC: Ornitin dekarboksilaz, TDA: Triptofan deaminaz, VP: Voges proskauer Reaksiyonu, *: 'den Asit Üretimi

***L. anguillarum* Spesifik PCR ve Sekans Analizi:** Çalışmada fenotipik olarak tanımlanan izolatlar genotipik olarak bakteriyel türlere özgü spesifik primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi ile doğrulandı. Tüm izolatlar ve ATCC 14181 suşu *L. anguillarum* spesifik olan 429 bp bant verdiği saptandı (Şekil 1). Sekans analizi sonucu izolatlara ait *amiB* gen bölgesi dizgileri Genbank'a MK091482, MK091483, MK091484, MK091485, MK091486, MK091487 ve MK091488 kabul numaraları ile kaydedildi. Elde edilen sekansların GenBank veri tabanında yer alan DQ431190 erişim numaralı *L. anguillarum* *AmiB* (*amiB*) gene, complete cds sekansıyla karşılaştırılması sonucu, izolatların en düşük %96.1 en yüksek %99.4 oranında benzer oldukları belirlendi.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan *L. anguillarum* izolatlarının fenotipik özelliklerinin diğer araştırmacıların izolatlarıyla karşılaştırılması

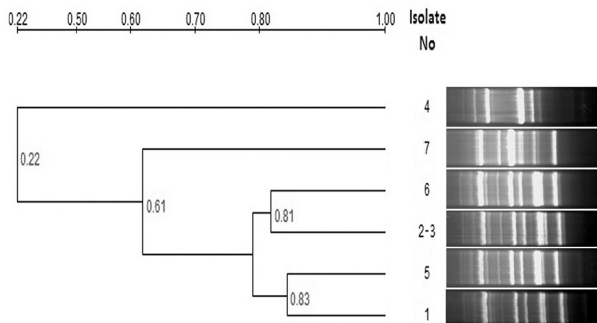
Fenotipik Özellikler	<i>L. anguillarum</i> 6 İzolat	Colorni ve ark., [8]	Austin ve Austin, [4]	Akaylı ve Durna, [1]
Gr boyama	- (6/6)	-	-	-
Morfoloji	Çubuk eğri	Çubuk eğri	Çubuk eğri	Basil
Haraket	+	+	+	+
Stokrom oksidaz	+	+	+	+
Katalaz	+	▪	+	+
Oksidasyon/Fermentasyon	F (6/6)	F	F	F
O/129	+	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	- (5/6)	+	-	-
Arginin dihidrolaz	+	-	+	+
İndol	+	+/-	+	+
Üre	- (6/6)	+/-	-	-
Jelatin	+	+	+	+
H ₂ S	- (6/6)	+/-	-	▪
Metil Red	+	+	-	▪
Voges proskauer	+	-	+	+
Sitrat	+	-	+	+
%0 NaCl'de üreme	+	-	-	-
%7 NaCl'de üreme	+	+	-	▪
37°C üreme	+	▪	+	+
Glukoz	+	+	▪	▪
Arabinoz	- (5/6)	+/-	+	-
İnositol	- (6/6)	-	-	-
Sakkaroz	+	▪	▪	+
Laktöz	- (6/6)	+/-	-	-
Mannitol	+	+/-	+	+

(+): Pozitif, (-): Negatif, (▪): Yapılmadı



Şekil 1. *L. anguillarum* spesifik PCR, 429 bp. M; Marker (25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 700), 1-6; *L. anguillarum* saha izolatları, 7; *L. anguillarum* ATCC 14181.

İzolatlar Arası Genetik İlişkinin Belirlenmesi: RAPD PCR analizi sonucunda *L. anguillarum* izolatlarının 6 farklı RAPD bant profili verdiği, izolatların % 60 benzerlik katsayısına göre 1 tekli (unique) tip ve 1 küme (cluster) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. Buna göre ilk grupta sadece 4 numaralı izolatın yer aldığı, ikinci grupta ise 1, 2, 3, 5, 6 ve 7 numaralı izolatların yer aldığı, ayrıca 2 ve 3 numaralı izolatların aynı RAPD bant paternine sahip olduğu belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. *L. anguillarum* izolatlarının RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi

İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılık Profilleri: *L. anguillarum* izolatlarının çalışmada kullanılan dokuz farklı antibiyotiğe karşı değişik düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlendi

(Tablo 4). En yüksek direnç oranı neomisin ve linkomisin'e (% 100), en düşük direnç oranı ise doksisisiklin'e (% 14.2) karşı gözlemlendi.

Tablo 4. *L. anguillarum* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık profilleri

Antibiyotikler	<i>L. anguillarum</i> izolatları						
	1	2	3	4	5	6	7
Gentamisin	R	S	S	S	S	S	R
Neomisin	R	R	R	R	R	R	R
Linkomisin	R	R	R	R	R	R	R
Oksitetrasiklin	R	I	R	R	S	I	I
Amoksisilin	R	S	R	R	R	R	R
Florfenikol	R	S	S	S	R	S	I
Trimetoprim-sulfametoksazol	R	S	S	S	S	S	R
Eritromisin	R	I	R	R	R	R	R
Doksisisiklin	R	S	S	I	I	S	I

Tartışma ve Sonuç

L. anguillarum, en az 28 farklı ülkede, toplamda 90'dan fazla akuatik organizma için patojenik olan bir bakteridir [16]. Etken Türkiye'de geniş bir coğrafik dağılıma sahip olup çipura deniz levreği, kırmızı porgy (*Pagrus pagrus*) ve Gökkuşluğu alabalıklarından izole edilmiştir [24].

Genel olarak Vibrioların identifikasyonu ve sınıflandırılması biyokimyasal testler kullanılarak yapılmaktadır [22]. Bakteriyel hastalık etkenlerinin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde ve teşhisinin yapılmasında en çok kullanılan yöntemlerden birisi de API 20E test kitleridir [2]. Ancak API test kitlerinin inkübasyon sıcaklıklarının balık patojenlerinin inkübasyon sıcaklıklarına uygun olmayışı, bu kitlerin balık patojenleri için kullanıldığında hatalı sonuçlar ortaya çıkmasına neden olmaktadır [5, 25]. Vibrio türlerinin fenotipik özelliklerinin ortaya konulmasında API 20E hızlı teşhis kitlerinin kullanıldığı birçok çalışmada bulunmaktadır [5, 19, 30, 31]. Özellikle bu sistemin birbirine çok yakın iki tür olan *V. anguillarum* ile *V. ordalii*'yi kolaylıkla ayırt edebildiği rapor edilmiştir. Ancak sitrat testinde *V. ordalii* ve *V. anguillarum* izolatlarında büyük oranda değişkenlik görülmüş ve bu nedenle değerlendirme yapılırken sitrat testinin çıkartılması gerektiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada *V. anguillarum* izolatları arasında bazı şeker testlerinde (Amygdalin ve

Arabinoz) farklı sonuçların elde edildiği görülmüştür [14]. Yine bazı araştırmacılar ADH, sitrat, indol, VP ve sorbitol testlerinde izolatlar arasında farklı sonuçların elde edildiğini bildirmişlerdir [5, 14, 30, 31]. Benzer şekilde çalışmamızda API 20E test sonuçlarına göre çalışmada kullanılan izolatlar arasında ADH, sitrat, amygdalin, arabinoz ve sorbitol testlerinde izolatlar arasında farklılıkların olduğu görülmüştür. Ek olarak Konvansiyonel mikrobiyolojik testler ile API 20E testi arasında LDC, VP ve sitrat testlerinde farklı sonuçların olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada konvansiyonel mikrobiyolojik testler ile elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların bildirdiği sonuçlar ile karşılaştırıldığında *L. anguillarum* izolatlarının fenotipik olarak heterojen bir yapıya sahip olduğunu belirtilebilir (Tablo 4).

Apiweb veri tabanında *L. anguillarum* bulunmadığı için sisteme girilen kodların *V. fluvialis* ve/veya motil *Aeromonas* türlerinden biri olarak yanlış tanımlanabilmektedir [5]. Yapılan bir çalışmada *V. anguillarum* izolatlarının % 66'ya yakın bir oranda *A. hydrophila* olarak tanımlanmış [27]. Bu bağlamda son yıllarda *L. anguillarum* saptama metotları, tanı ve önleyici tedbirleri hızlı bir şekilde hayata geçirmek için kültür bazlı yöntemlerden uzaklaşmaya başlamıştır [16]. Çalışmamızda API ve konvansiyonel mikrobiyolojik test sonuçlarında görülen farklılıklar ve bu farklılıklara göre yapılabilecek olası yanlış değerlendirmelerden kaçınmak için izolatlar genetik olarak *AmiB* genin kullanıldığı PCR ile konfirme edilmiş ve sonrasında PCR ürünlerinin sekans analizi yapılması ile sonuçlar konfirme edilmiştir.

Uzun yıllardır, kültür balıklarında bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin Norveç'te *Vibrio* salgınlarının önlenmesinde oksolinik asit ve florfenikol kullanılmaktadır [11]. Ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliğinde Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü verilerine göre balıklarda kullanılacak 40 adet ruhsatlı antibakteriyel ürün bulunmakta ve bu ürünlerin ise 5 farklı etken madde florfenikol, oksitetrasiklin HCl, enrofloksasin, sülfadiazin-trimetoprim ve amoksisilin trihidrat içerdiği görülmektedir [12]. Ülkemizde *L. anguillarum*'un antibiyotik etkinliklerinin belirlendiği çalışmalar bulunmaktadır. Balta ve Balta, [5] Doğu Karadeniz Bölgesi'nden Gökkuşluğu alabalıklarından elde ettikleri *L. angu-*

illarum izolatlarının enrofloksasin, oksalinik asit ve florfenikol'e karşı, Tanrıku, [29] ise gökkuşluğu alabalıklarından izole ettiği 12 izolatın amoksisilin ve trimetoprim-sulfadiazine karşı duyarlı olduklarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen test sonuçlarına göre hastalığın tedavisinde florfenikol veya trimetoprim-sulfametoksazol'den birinin kullanılmasının uygun olacağı belirlenmiştir.

L. anguillarum izolatları arasındaki genetik ilişkiler farklı random primerlerin kullanıldığı RAPD PCR metodu ile belirlenmiştir. Vaseeharan ve ark., [34] OPP6, OPP9, OPAX5, OPAX18 ve OPX1 primerlerini kullandıkları çalışmalarında izolatların unique tipte RAPD profili sergilediklerini dolayısıyla genetik olarak heterojen bir yapıda olduklarını ortaya koymuşlardır. OPV-12 ve OPN-08 kullanıldığı başka bir çalışmada ise *L. anguillarum* izolatları 5 genotipe ayrılmıştır. Gökkuşluğu alabalıklarından elde edilen izolatların levrek balıkları ve sedimentten izole edilen izolatlar ile aynı genogrupsa yer aldığını belirlemişlerdir [10]. Bu çalışmada RAPD PCR metodunda kullanılan M13 primerinin *L. anguillarum* izolatların genotiplendirmesinde kullanılabilir olduğu ancak diğer araştırmacılar tarafından farklı olarak izolatların genetik olarak homojen bir yapıda olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın izolat sayısına ve coğrafi dağılıma bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışma ile *L. anguillarum* izolatların identifikasyonunda konvansiyonel mikrobiyolojik metotlar ile API 20E test kitleri arasında farklı sonuçların görülebileceği, dolayısıyla tür identifikasyonunun moleküler çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği, izolatlar arası klonal ilişkilerin belirlenmesinde M13 primerinin kullanıldığı RAPD PCR metodunun hızlı ve güvenilir bir sonuç verdiği ortaya konulmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma, 2'inci Uluslararası Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

1. Akaylı T, Durma M, (2017). *Kültür Levrek (D. labrax) Balıklarından izole edilen Vibrio anguillarum izolatlarının karakterizasyonu*. Kocatepe Vet J. 10(3), 134-141.

2. Altun S, Kubilay A, Diler O, (2010). *Yersinia ruckeri* suşlarının fenotipik ve serolojik özelliklerinin incelenmesi. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 16(Suppl B), 223-229.
3. Austin B, Alsina M, Austin DA, Blanch AR, Grimont F, Grimont PAD, Jofre J, Koblavi S, Larsen JL, Pedersen K, Tiainen T, Verdonck L, Swings J, (1995). *Identification and typing of Vibrio anguillarum: a comparison of different methods*. Syst Appl Microbiol. 18, 285-302.
4. Austin B, Austin DA, (1993). *Bacterial fish pathogens disease of farmed and wild fish*, Second edition. Chichester, England, Ellis Horwood. p.269-270.
5. Balta F, Balta ZD, (2017). Doğu Karadeniz'de yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Vibrio anguillarum* suşlarının serotiplendirilmesi, genetik karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 64, 321-328.
6. Beaz-Hidalgo R, Lopez-Romalde S, Toranzo AE., Romalde JL, (2008). *Polymerase Chain Reaction amplification of Repetitive Intergenic Consensus and Repetitive Extragenic Palindromic Sequences for molecular typing of Pseudomonas anguilliseptica and Aeromonas salmonicida*. J Aquat Anim Health. 20, 75-85.
7. CLSI, (2014). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth Informational Supplement*. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, M100-S24, 230s.
8. Colomi A, Paperna I, Gordin H, (1981). *Bacterial infections in gilt-head sea bream Sparus aurata cultured at Elat*. Aquaculture, 23, 257-267.
9. Cunningham CO, (2002). *Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control*. Aquaculture. 206, 19-55.
10. Frans I, Dierckens K, Crauwels S, Assche AV, Leisner J, Larsen MH, Michiels CW, Willems KA, Lievens B, Bossier P, Rediers H, (2013). *Does virulence assessment of Vibrio anguillarum using Sea Bass (Dicentrarchus labrax) Larvae correspond with genotypic and phenotypic characterization?* Plos One. 8(8), e70477.
11. Frans I, Michiels CW, Bossier P, Willems KA, Lievens B, Rediers H, (2011). *Vibrio anguillarum as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention*. J Fish Dis. 34, 643-661.
12. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. İyi Üretim Uygulamaları Sertifikası (GMP) Bakanlığımızca Verilmiş veya Kabul Edilmiş Pazarlama İzinli Veteriner Biyolojik Ürünler. <https://www.tarim.gov.tr/Konular/Veteriner-Hizmetleri/Veteriner-Saglik-Urunleri>. İnternet Erişimi: 15.03.2018.
13. Gonzalez SF, Osorio CR, Santos Y, (2003). *Development of a PCR-based method for the detection of Listonella anguillarum in fish tissue and blood samples*. Dis Aquat Org. 55, 109-115.p
14. Grisez L. Ceusters R. Ollevier F, (1991). *The use of API 20E for the identification of Vibrio anguillarum and V. ordalii*. J Fish Dis. 14, 359-365.
15. Harrell LW, Novoty AJ, Schiewe MH, Hodgins HO, (1976). *Isolation and description of two vibrios pathogenic to Pacific salmon in Puget Sound, Washington*. Fish Bullet. 74, 447-449.
16. Hickey ME, Lee J-L, (2018). *A comprehensive review of Vibrio (Listonella) anguillarum: ecology, pathology and prevention*. Rev Aquacult. 10, 585-610.
17. Hong GE, Kim DG, Bae JY, Ahn SH, Bai SC, Kong IS, (2007). *Species-specific PCR detection of the fish pathogen, Vibrio anguillarum, using the amiB gene, which encodes N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase*. FEMS Microbiol Lett. 269, 201-206.
18. Huang Y, Runge M, Michael GB, Schwarz S, Jung A, Steinhagen D, (2013). *Biochemical and molecular heterogeneity among isolates of Yersinia ruckeri from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) in north west Germany*. BMC Vet Res. 9, 215
19. Korun J, Gokoglu M, (2007). *Listonella anguillarum isolated from hatchery cultured red porgy Pagrus pagrus in Turkey*. J Anim Vet Adv. 6, 823-827.
20. Kuhn I, Austin DA, Austin B, Blanch AR, Grimont PAD, Jofre J, Koblavi S, Larsen JL, Mollby R, Pedersen K, Tiainen T, Verdonck L, Swings J, (1996). *Diversity of Vibrio anguillarum isolates from different geographical and biological habitats, determined by the use of a combination of eight different typing methods*. Syst Appl Microbiol. 19, 442-450.
21. MacDonell MT, Colwell RR, (1985). *Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, Listonella and Shewanella*. Syst Appl Microbiol. 6, 171-182.
22. Noguerola I. Blanch AR, (2008). *Identification of Vibrio spp. with a set of dichotomous keys*. J Appl Microbiol. 105, 175-185.
23. Onuk EE, Çiftçi A, Findık A, Çiftçi G, Altun S, Balta F, Özer S, Çoban AY, (2011). *Phenotypic and molecular characterization of Yersinia ruckeri isolates from Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792) in Turkey*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 124 (7-8), 320-328.
24. Öztürk RÇ, Altınok İ, (2014). *Bacterial and viral fish diseases in Turkey*. Turk J of Fish Aquat Sci. 14, 275-297.
25. Popovic TN, Coz-Rakovac R, Strunjak-Perovic I, (2007). *Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: a review*. Vet Med. 52(2), 49-53.
26. Ravelo C, Magarinos B, Lopez-Ramade S, Toranzo AE, Romalde JL, (2003). *Molecular fingerprinting of fish-pathogenic Lactococcus garvieae strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis*. J Clin Microbiol. 41(2), 751-756.
27. Santos Y, Romalde JL, Bandin I, Magarinos B, Nunez S, Barja JL, Toranzo AE, (1993). *Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens*. Aquaculture. 116(2-3), 111-120.
28. Schiewe MH, Trust TJ, Crosa JH, (1981). *Vibrio ordalii sp.nov.: a causative agent of vibriosis in fish*. Curr Microbiol. 6, 343-348.

29. Tanrikul TT, (2007). *Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (Onchorhynchus mykiss) in Turkey*. Pak J Biol Sci. 10, 1733-1737.
30. Tanrikul TT, Cagirgan H, Toksen E, (2004). *Levreklerden (Dicentrarchus labrax L., 1758) izole edilen vibrio türlerinin API 20E yöntemiyle identifikasyonu*. EÜ Su Ürünleri Dergisi. 21, 243-247.
31. Tanrikul TT, Gultepe N, (2011). *Mix infections in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) Lactococcus garvieae and Vibrio anguillarum O1*. J Anim Vet Adv. 10, 1019-1023.
32. Tekerekoglu MS, Ay S, Otlu B, Çiçek A, Kayabaş Ü, Durmaz R, (2007). *Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from clinical specimens of patients with nosocomial infection: are there unnoticed silent outbreaks?* New Microbiol. 30, 131-137.
33. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R, (1991). *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*. Nuc Acid Res. 19(24), 6823-6831.
34. Vaseeharan B, Hussian MR, Chen JC, (2008). *RpoN gene, RAPD profile, antimicrobial resistance and plasmids of Vibrio anguillarum isolates from vibriosis infected Penaeus monodon*. Lett Appl Microbiol. 47, 380-385.
35. Xiao P, Mo ZL, Mao YX, Wang CL, Zou YX, Li J, (2009). *Detection of Vibrio anguillarum by PCR amplification of the empA gene*. J Fish Dis. 32, 293-296.