

Deniz Suyuna Nakledilen Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yavrularında Görülen *Vibrio* Enfeksiyonu ve TedavisiFikri BALTA^{1*} Zeynep DENGİZ BALTA¹¹Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 53100, Rize, Türkiye**ÖZET**

Bu çalışmada, Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yüzer ağ kafeslere 8°C'deki deniz suyuna nakledilen gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularında görülen hastalık salgınlarından izole edilen etkenin identifikasyon ve serotiplendirilmesi yapılarak antibiyogram profili belirlenmiştir. Tipik hastalık semptomları gösteren alabalık yavrularının böbrek, dalak gibi iç organlardan T-TSA (%1,5 NaCl ilave edilmiş) ve TCBS agar ekimleri yapılarak hastalık etkeni 20±1°C de 48 saat soğutmalı inkübatörde üretilmiştir. Lam aglütinasyon testi, klasik mikrobiyolojik testler, API 20E testi ve PZR gibi yöntemleri kullanılarak etkenin tanısı gerçekleştirilmiştir. Dizi analizine gönderilen PZR ürünlerin GenBank veri tabanındaki "LK021130" kabul numarasıyla kayıtlı olan *V. anguillarum* suşları ile %99 oranında benzerlik gösterdiği ve izolatların lam aglütinasyon testine göre serotip O1 olduğu belirlenmiştir. Antibiyogram hassasiyet testi sonuçlarına göre ise bakterinin sulphamethoxazol, ampisilin, eritromisin ve oksitetrasiklin'e dirençli, fakat oksolinik asit, enrofloxasin ve florfenikol'e duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Gökkuşluğu alabalığı, *V. anguillarum*, API 20E, PZR, lam aglütinasyon testi, antimikrobiyal duyarlılık.

ABSTRACT

Vibrio Infection and Treatment on the Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Transferred Seawater: The aim of this study is to determine the antibiotic profile, serotyping and identification of isolated bacteria from disease outbreaks in cultured rainbow trout juveniles transferred to seawater at 8°C floating net cages in the Eastern Black Sea Region of Turkey. The kidney and spleen of diseased rainbow trout that showed typical disease symptoms was streaked on the surface of T-TSA (added with 1.5% sodium chloride) and TCBS, and was incubated in the cooled incubator at 20±1°C for 48 hours. To identify of isolated bacteria was carried out by using slide agglutination, API 20E, PCR and conventional biochemical tests. *V. anguillarum* isolates were detected serotype O1, and sequenced PCR products were confirmed to be similar to *V. anguillarum* strain at the rate of 99% (with accession numbers: LK021130) compered in GenBank database. Results of the testing susceptibility to antibiotics showed that *V. anguillarum* isolates were resistant to sulphamethoxazole, ampicillin, erythromycin and oxytetracyclin, but all strains were found susceptible to oxolinic acid, enrofloxacin and florfenicol.

Key words: Rainbow trout, *V. anguillarum*, API 20E, PCR, slide agglutination test, antimicrobial sensitivity.

GİRİŞ

Vibriozis, deniz balıklarında vibrio genusuna ait bakteriler tarafından özellikle kültürü yapılan balıklarda ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir. Canestrini tarafından 1893 yılında yılan balıklarında görülen bir hastalık vakasından ilk kez izole edilen hastalık etkeni *Bacterium anguillarum* olarak tanımlanmıştır. Bergman 1907'de İsveç'te yılan balıklarında görülen bir epizootiden aynı etkeni izole ettikten iki yıl sonra (1909) etkenin tanımlanması gerçekleştirilerek etken *Vibrio anguillarum* olarak isimlendirilmiştir. McDonell ve Colwell tarafından 1985 yılında bakterinin ribozomal RNA filogenetik verilerin incelenmesi sonucu *Listonella* genusuna transfer edilmiştir (Austin ve Austin, 1987).

Vibrio izolatlarının tanımlanmasında bu güne kadar farklı yöntemler kullanılmıştır. Klasik biyokimyasal ve fiziksel testler, lam aglütinasyon testi, API 20E testi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi testler en çok tercih edilenler olmuştur. Son yıllarda bakteriyel balık hastalıklarının hızlı tanısı için klasik geleneksel testler yerine API 20E sistemi bir çok araştırmacı tarafından kullanılmış (Grisez ve ark., 1991; Austin ve Austin, 1993; Korun, 2006; Maugeri ve ark., 1983; Tanrikul ve ark., 2004; Balta, 2016), fakat api web sisteminde *V. anguillarum* kayıtlı olmaması nedeniyle kullanımı tartışmalıdır (Popovic ve ark.,

2007). Deniz suyundan ve hastalıklı balıklardan *V. anguillarum*'un 23 farklı O serotipi (O1, O2, O3, ..., O23) izole edilmiştir. Serotip O1 ve O2'nin ise en virulent serotipler olduğu rapor edilmiştir (Pedersen ve ark., 1999). Dünya genelinde levreklerde serotip O1, alabalıklarda ise serotip O1 ve O2 (Toranzo ve Barja, 1990; Toranzo ve ark., 1997), ülkemizdeki hastalık olgularından farklı referanslarda sadece serotip O1'in ölümlerden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Çağırğan, 2004; Tanrikul ve ark., 2004; Demircan ve Candan, 2006; Tanrikul, 2007; Tanrikul ve Gültepe, 2011).

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yüzer ağ kafeslerde yetiştirilmek üzere 8°C'deki deniz suyuna transfer edilen gökkuşluğu alabalık yavrularında ortaya çıkan hastalık vakalarından izole edilen etkenlerin farklı yöntemlerle kullanılarak tanımlanması, antimikrobiyallere karşı duyarlılıkları belirlenerek tedavide en etkili antibiyotiklerin kullanılması ve böbrek izolatu ile deneysel enfeksiyon yapılarak etkenin patojen olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Balık örnekleri: Rize ili açıklarında özel bir alabalık işletmesinde Ocak 2009'da ortalama ağırlığı 5±2 gr olan gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularında deniz transfer edildikten bir hafta sonra şiddetli ölümler meydana gelmiştir.

Ölümlerin görüldüğü her kafesten 30 adet balık alınarak laboratuvara getirilen tipik hastalık semptomları gösteren balıkların bakteriyolojik muayenesi ve otopsi yapılarak böbreklerden alınan örnekler mikroskop altında incelenmiştir. Ayrıca Papilla Alabalık İşletmesinin kuluçkahanesinden temin edilen 120 adet balık 6 adet akvaryuma eşit olarak rastgele dağıtılarak deneysel enfeksiyon oluşturulmuştur.

Bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu: Tipik hastalık semptomu gösteren balıkların böbrek, dalak, karaciğer, deri ve bağırsak içeriğinden alınan örnekler %1,5 NaCl ilave edilmiş triptik soy agar (T-TSA, Merck), triptik soy broth (T-TSB, Merck)'a ve TCBS agara (thiosulphate citrate bile salts sucrose, Merck) ekimler yapılarak soğutmalı etüvde $20\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Austin ve Austin, 1987; Demircan ve Candan, 2006; Tanrikul, 2007; Austin ve Austin, 2012). TCBS agarda üreyen saf kolonilerden T-TSA'ya inoküle edilmiştir. Biyokimyasal testlerin yapılmadan önce T-TSA agarda ekim hattı üzerine O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylteridine phosphate salt, Sigma) vibriostatik ajan diski (150µg) yerleştirildi. İzolatların O/129 duyarlı olduğu tespit edildikten sonra sırasıyla, hareket muayenesi, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri, OF testi, %5 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agarda hemoliz testi yapıldı. Tuza tolerans testi %0 ve %7 tuz içeren peptonlu brotda gerçekleştirildi. T-TSA'da üretilen bakteri suşlarına ait saf kolonilerden önceden hazırlanıp steril edilen 5 ml %1,5 tuz içeren suda McFarland 4 (bioMerieux) bulanıklığına ayarlanarak steril 1 ml otomatik pipet yardımıyla API 20E test kiti kuyucuklarına prosedüre uygun olarak ilave edildi. API 20E test kitleri literatürde tarif edildiği üzere $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı (MacDonell ve ark., 1982; Grisez ve ark., 1991; Austin ve Austin, 1999; Tanrikul ve ark., 2004; Popovic ve ark., 2007; Balta 2016).

Lam aglutinasyon testi: Lam aglutinasyon testi Toranzo ve ark., (1987) tarafından tarif edilen metota göre *V. anguillarum* serotip O1'e (ATCC 43305) karşı tavşandan elde edilen poliklonal antikor kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, temiz bir lam üzerine öze yardımı ile alınan bir damla fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) üzerine T-TSA'da $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 24 saatte üretilen saf kolonilerden öze yardımı ile alınarak, yoğun bir süspansiyon hazırlanmıştır. Daha sonra, bu süspansiyonun yakınına bir damla *V. anguillarum* ait serotip O1 serumu ilave edilerek öze yardımıyla karıştırılmıştır. Pozitif kontrol için *V. anguillarum* ATCC 43305 referans suş ve negatif kontrol için ise *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suşları kullanılmıştır (Sørensen ve Larsen, 1986; Roberson, 1990).

Total DNA izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR): Genomik DNA izolasyonu için 6 izolat 2 ml'lik T-TSB'e ekim yapılarak, $25\pm 1^\circ\text{C}$ 18 saat çalkamalı etüvde üretilmiştir. Kültürlerin 1 ml'si ependorf tüplere aktarılıp 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı kısım uzaklaştırılmış, ardından ependorf tüplere 500 µl steril deiyonize su ilave edilmiştir. Tüplerin dip kısmına çöktürülen bakteriler vortex yardımıyla çözülerek, thermo shakerda 100°C de 12 dakika ısıtılarak bakterinin hücre duvarının parçalanması sağlanmış, 5 dakika soğuması bekletildikten sonra 13.000 rpm'de 10 dakika mikrosantrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Üste kalan süpernatant steril ependorf tüplere aktarılıp, süpernatantların 1-3 µl'si PZR'da kalıp DNA olarak kullanılmıştır (Weisburg ve ark., 1991; Urakawa ve ark., 1997; Drancourt ve ark., 2000; Balta ve ark., 2010; Balta, 2016). Geri kalanı kısmı daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C 'de stoklanmıştır. Standart PZR'da kullanılan karışımları için, 1,5 ünite *Taq* DNA polimeraz (GoTaq, Promega), 5 µl DNA, 10 µl 5x reaksiyon tamponu (Promega), 3 µl 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µl 2 mM her bir dNTP ve 2 µl her bir primerden

(25 pmol/µl) ve son hacim'e steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanmıştır (Balta ve diğ 2010). Amplifikasyon koşulları; 94°C 'de 3 dakika ilk denatürasyondan sonra 34 döngü olarak ikinci denatürasyon 94°C 'de 30 sn, primer bağlanması 47°C 'de 30 sn, zincir uzaması 72°C 'de 1 dakika ve takiben son zincir uzaması 72°C 'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri 0,5 µg/ml ethidium bromid içeren %1,5 agaroz jelde 90 V'da 30 dakika yürütülmüştür. Elde edilen PCR ürünü UV ışığı altında görüntülenmiştir. Yavru gökkuşağı alabalıklarının iç organlarından izole edilen izolatların tanımlamada bakteriler için spesifik olan 16S rRNA universal primerleri (27 F 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 1492 R 5' GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') kullanılmıştır (Weisburg ve ark., 1991; Drancourt ve ark., 2000). PZR ürünlerinin saflaştırılıp MacroGen Inc. (Amsterdam, Hollanda)'de sekans için gönderilmiş ve sonuçlar GenBank veri tabanındaki BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) opsiyonu kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testi: Antimikrobiyal duyarlılık testi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır (CLSI, 2014). Böbrek izolatu 25°C 'de T-TSA'da üretilen 24 saatlik kültürleri steril FTS'de McFarland No: 0,5 bulanıklığına vorteks yardımı ile ayarlandıktan sonra 37°C 'de nemi alınmış %1,5 NaCl ilave edilmiş Mueller Hinton agar (T-MHA) üzerine dökülmüştür. Antibiyotik diskleri (sırasıyla, oksitetrasiklin, oksolinik asit, trimetoprim+sulfametoksazol, sulfametoksazol, ampisilin, florfenikol, streptomisin, enrofloksasin ve eritromisin, Bioanalyse, Türkiye) dispenser (Bioanalyse) yardımıyla T-MHA üzerine yerleştirilmiş, 25°C 'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testi için *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suş olarak kullanılmış, antibiyotik zon zapı standartları oluşturulmuştur (Balta ve ark., 2010).

Deneysel enfeksiyon: Deneysel enfeksiyonda kullanılan deniz suyu (tuzluluk $17,6\pm 0,2$; pH $7,08\pm 0,02$; su sıcaklığı $8\pm 1^\circ\text{C}$; amonyak 0,023 mg/l; nitrit 0,079 mg/l ve nitrat 1,46 mg/l) UV lambası (JEBO UV-H-13) yardımıyla sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. Hava motoru ile sürekli havalandırılan (minimum 8,77 mg/l çözülmüş oksijen) 70 litrelik 5 adet plastik akvaryumlara biri stok, diğerleri 2'er paralel olmak üzere kontrol ve deneme grupları oluşturulmuştur. Akvaryumların suyu gün aşırı UV lambası ile steril edilmiş taze deniz suyu ile %30 oranında değiştirilmiştir. Çalışmada kullanılan ortalama ağırlığı $5\pm 0,7$ gr olan 120 adet sağlıklı gökkuşağı alabalık yavruları Papilla Alabalık (Hopa/Artvin) çiftliğinin kuluçkahanesinden sağlanmıştır. Gökkuşağı alabalık yavruları rastgele 20'er adet akvaryumların her birine yerleştirilerek, 5 gün süreyle adaptasyona tabi tutulmuştur. Balıklar ticari alabalık yemi ile günde iki kez yemlenmiştir. Hastalıklı gökkuşağı alabalık yavrularından izole edilen böbrek izolatu 200 ml steril T-TSB'de 20°C 'de üretilerek, deneysel enfeksiyonda kullanılan bakteri sayısı (cfu/ml), koloni sayım yöntemi ile (10 katlı seri dilüsyonlardan 10^5 , 10^6 , 10^7 ve 10^8 'den T-TSA'a 100'er µl) belirlenmiştir (Knappskog ve ark., 1993). Final konsantrasyonu $1,5 \times 10^8$ cfu ml⁻¹ olan 16 saatlik bakteri kültürü 1'e 3 oranında steril deniz suyu ile seyreltilmiştir. Deneme balıkları 5 dakika süreyle 2'er paralel olmak üzere bu solüsyonda tutulmuştur. Bakteri kültürü içermeyen T-TSB ile aynı işlem kontrol gruplarındaki balıklarda uygulanmıştır (Knappskog ve ark., 1993; Çağırğan, 2004). Balıklarda meydana gelen hastalık belirtileri ve mortalite takip edilmiştir. Ölen ve ölmek olan balıkların böbreklerinden T-TSA, T-TSB ve TCBS agara inokülasyon yapılarak, soğutmalı etüvde $20\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deneysel enfeksiyon sonrası izole edilen bakteri suşuna (V6) tanımlama testleri uygulanarak, testin sonuçları Tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

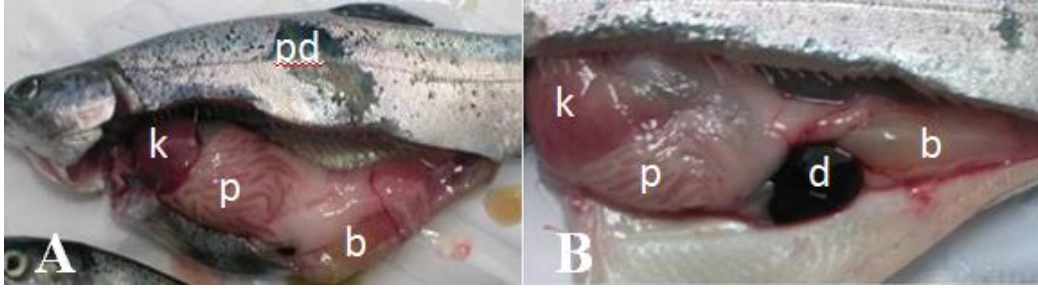
BULGULAR

Rize ili açıklarında yüzer ağ kafeslere yetiştirilmek üzere 5 ± 2 gr canlı ağırlığında deniz suyuna nakledilen gökkuşağı alabalık yavrularında 8°C 'deki su sıcaklığında yaklaşık %30 civarlarında ölüm ile seyreden vibriosis vakasına rastlanılmıştır. Deniz suyuna ait tespit edilen su parametreleri; sıcaklık 8°C , pH 7,20, oksijen 8,50 mg/l ve tuzluluk ‰ 17,6 olarak ölçülmüştür. Ölen ve ölmekte olan balıklarda tipik hastalık semptomları olarak renkte kararma, gözlerde ekzoftalmus, vücut yüzeyinde yaygın hemorajiler, pulların dökülmesi, kronik vakalarda dejenerasyon ve ülser, solungaçların solgun olduğu, boğaz altında, operkulum üzerinde, pektoral ve pelvik yüzgeç kaidesinde kanamalar Şekil 1A'de gösterilmiştir. Hastalıklı balıkların otopsisinde midenin boş, karaciğerin solgun olduğu, dalakta büyüme ve normal görünümünü kaybetmiş olduğu, pilorik sekaların gergin, bağırsak şişkin ve sarı bir içerikle dolu olduğu belirlenmiştir (Şekil 1B).

Hastalıklı balıklardan 5 farklı bölgesinden yapılan ekimlerde; suş 1 (böbrek), suş 2 (dalak), suş 3 (karaciğer), suş 4 (deri ülseri) ve suş 5 (bağırsak) etken üretilmiştir. Morfolojik ve

biyokimyasal testlere göre suşların hareketli, Gr (-), kıvrık, pleomorfik, katalaz ve oksidaz testlerinin pozitif olması, OF test sonuçlarına göre fermentatif, TCBS agarda sarı koloni oluşturması, %0 ve %7 NaCl tolerans test sonuçları, %5 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agarda β hemoliz pozitif, lam aglütinasyon testine göre serotip O1 ve vibriostatik ajana (O/129, 150 μg) duyarlılık testinin pozitif olması ile izolatin *V. anguillarum* olduğu belirlenmiştir. Lam aglütinasyon test görüntüsü Şekil 2'de ve vibriostatik ajana duyarlılık test sonucu Şekil 3 verilmiştir.

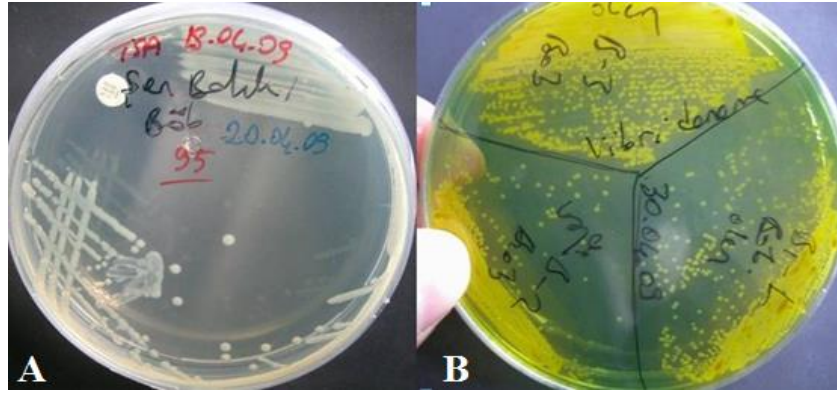
Aynı izolatların API 20E test kitine ekilmesinden 48 saat sonunda ayırıcılar döküldükten sonraki test sonuçları Şekil 4'de verilmiştir. İzolatlara ait API 20E test sonuçları apiweb™ veri tabanında *V. anguillarum* yer almadığı için sisteme girilen kodların *V. fluvialis* ve/veya başka bir tür olarak yanlış tanımlanmaktadır. Bu izolatların PZR ürünlerine ait sekans sonuçları GenBank veri tabanında karşılaştırıldığında "LK021130" kabul numarasıyla kayıtlı olan *V. anguillarum* suşları ile %99 benzer olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1).



Şekil 1. A) Normal karaciğer (k), Pilorik sekalarda şişkinlik (p), Bağırsak şiş ve açık sarı içerikle dolu (b), Deride pul dökülmesi (pd), **B)** Karaciğer solgun (k), Pilorik sekalarda şişkinlik (p), Dalak büyümüş, gevşek kıvamda ve koyu kırmızı (d), Bağırsak açık sarı yapışkan sıvı ile dolu ve gergin (b) (Orijinal).
Figure 1. A) Normal liver (k), Pyloric caeca distended (p), Full with clear yellow content and distension the gut (d), Lost scales (pd), **B)** Pale liver (k), Pyloric caeca distended (p), Dark red, soft and enlarged spleen (d), Filled with clear yellow viscous fluid and distended the gut (b) (Orijinal).



Şekil 2. Tavşan anti-*V. anguillarum* serotipi O1 serumu kullanarak lam aglütinasyon testi (Orijinal).
Figure 2. Slide agglutination test using rabbit anti-*V. anguillarum* Serotype O1 serum (Original).



Şekil 3. A) TSA'da O/129 vibriostatik ajana duyarlılık testi (Orijinal).

B) Deneysel enfeksiyonda izole edilen *V. anguillarum* kolonilerin TCBS agardaki görünümü (Orijinal).

Figure 3. A) Susceptibility test to vibriostatic compound O/129 on T-TSA (Original).

B) Appearance of *V. anguillarum* colonies isolated after in experimental infection on TCBS agar (Original).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *V. anguillarum* izolatları ve PZR sonuçlarına göre benzerlik oranları.

Table I. Sources of *V. anguillarum* strains used in this study and likelihood ratios according to the PCR results.

Suş No	İzolasyon	Çoğrafik Bölge	Tarih	GenBank Giriş No	Benzerlik Oranı (%)
V1	Böbrek	Rize/Merkez	31.01.12	LK021130	%99
V2	Dalak	Rize/Merkez	31.01.12	LK021130	%99
V3	Karaçiğer	Rize/Merkez	31.01.12	LK021130	%99
V4	Deri ülser	Rize/Merkez	31.01.12	LK021130	%99
V5	Bağırsak	Rize/Merkez	31.01.12	LK021130	%99
V6*	Böbrek	Rize/Fakülte	10.01.13	LK021130	%99

*Deneysel enfeksiyon sonrası ölen balıkların ön böbreklerinden izole edilen bakteriye ait suş.



Şekil 4. *V. anguillarum*'un tanımlamasında API 20E kitleri kullanarak pozitif ve negatif sonuçların değerlendirilmesi (Orijinal).

Figure 4. Evaluation of positive and negative results API 20E strip for identification of *Vibrio anguillarum* (Orijinal).

Bu çalışmada, API 20E testine ait biyokimyasal testlere göre; β -galaktosidaz, arjinin hidrolaz, sitrat, indol, voges-proskauer, jelatin tesleri ile karbonhidrat testlerinden glikoz, mannitol, inostol, sorbitol, sukroz, arabinoz testlerinin pozitif

olmasına karşın diğer testlerin ise lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz, H₂S, üre vs. testlerin negatif olduğu belirlenmiştir. Farklı referanslar ile API 20E testi sonuçlarının karşılaştırması Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. *V. anguillarum* izolatlarına ait morfolojik, biyokimyasal ve API 20E test sonuçları.**Table 2.** The morphologic, biochemical and API 20E test results for isolated *Vibrio anguillarum*.

Morfolojik ve Biyokimyasal Testler	Sus 1	Sus 2	Sus 3	Sus 4	Sus 5	Sus 6	Ref. 1	Ref. 2	Ref. 3	Morfolojik ve Biyokimyasal Testler	Suş 1	Suş 2	Suş 3	Suş 4	Suş 5	Suş 6	Ref. 1	Ref. 2	Ref. 3
	Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+		+	CIT	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Şekil	B	B	B	B	B	B	B	B	B	URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCBS sarı koloni	+	+	+	+	+	+	+	+	+	TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aglütinasyon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF Üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	GLU*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/129 (150µg)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	MAN*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%0 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	N	-	INO*	+	+	+	+	+	+	-	-	+
%7 NaCl	+	+	+	+	+	+	-	+	-	SOR*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemoliz (KA)	β	β	β	β	β	β	N	N	N	RHA*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	SAC*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	MEL*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AYM*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ARA*	+	+	+	+	+	+	+	+	+

B: Basil, H: Hassas, +: Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon, β: Beta hemoliz, *Karbonhidratlardan asit oluşum.

B: Basil, H: Susceptibility, +: Positive reaction, -: Negative reaction, β: Beta hemolysis, *Acid formation from carbohydrates.

Ref.: Referanslar, Ref.-1: Austin ve Austin, (1987); Ref.-2: Demircan ve Candan, (2006); Ref.-3: Tanrıkul, (2007).

Ref.: References, Ref.-1: Austin ve Austin, (1987); Ref.-2: Demircan ve Candan, (2006); Ref.-3: Tanrıkul, (2007).

Deneysel enfeksiyonda *V. anguillarum* ile enfekte edilen balıklarda 48 saat içinde deneme grubunda (2x20 balık) toplam %100'lük bir ölüm meydana gelirken, kontrol grubunda hiçbir balığın ölmediği görülmüştür. Deneysel enfeksiyon sonrası ölen ve ölmek üzere olan balıkların ön böbreklerinden TCBS agar'a yapılan ekimlerden 24 saat sonunda sarı renkli kolonilerin ürediği ve izole edilen bakteri (suş 6) ile yapılan tanımlama testleri sonucu etkenin *V. anguillarum* olduğu belirlenerek Koch postulatları

sağlanmıştır (Tablo 1). Deneysel enfeksiyon sonrası ölen balıkların ön böbreklerinden TCBS agar'a yapılan ekim sonrası besi yeri üzerinde sarı kolonilerin varlığı, lam aglütinasyon testi ve vibriostatik ajana (O/129, Sigma) duyarlılık testi ve diğer testler yapılarak etkenin kesin *V. anguillarum* olduğu teyit edilmiştir. Deneysel enfeksiyon sonrası ölen balıklarda görülen dış semptomlar Şekil 5'de verilmiştir.



Şekil 5. *V. anguillarum* ile deneysel enfeksiyon sonrası gelişen dış belirtiler (Orijinal).

Figure 5. External symptoms developing after the experimental infection with *V. anguillarum* (Original).

Antibiyotik hassasiyet testi için 9 farklı diski sırasıyla; oksitetrasiklin (T, 30µg), oksolinik asit (OA, 2µg), sulfametoksazol (SMZ, 100µg), ampicilin (AM, 10µg), florfenikol (FFC, 30µg), streptomisin (S, 10µg), trimetoprim+sulfametoksazol (STX, 25µg), enrofloksasin (ENR, 5µg) ve eritromisin (E, 15µg) kullanılmıştır. İzolatların hepsinden hazırlanan antibiyogram testi sonuçunda T-MHA üzerine yerleştirilen antibiyotik disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları dijital kompas yardımıyla ölçülmüştür.

Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) tarafından tarif edilen Gram negatif ve *Enterobacteriaceae* familyası için akuakültürde kullanılan veteriner ilaç rehberindeki antibiyotik standart inhibisyon zon çaplarına göre Tablo 2'de verilen duyarlılığa göre yorumlanmıştır (CLSI, 2014). Antibiyogram test sonuçlarına göre *V. anguillarum* izolatlarına ait antimikrobiyel duyarlılık profili Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Antimikrobiyellerin disk konsantrasyonları ve inhibisyon zon çaplarına göre duyarlılık aralıkları.
Table 3. Antimicrobial susceptibility test disc content of antimicrobials and breakpoints used in the study.

Antimikrobiyel ajanlar ve disk konsantrasyonları	İnhibisyon zon çapı (mm)			Vibrio anguillarum izolatları					
	D	O	H	V1	V2	V3	V4	V5	V6*
T (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19	D	D	D	D	D	D
OA (2 µg)	≤ 10	11-12	≥ 13	H	H	H	H	H	H
SMZ (100 µg)	≤ 12	13-16	≥ 17	D	D	D	D	D	D
AM (10 µg)	≤ 13	14-16	≥ 17	D	D	D	D	D	D
FFC (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19	H	H	H	H	H	H
S (10 µg)	≤ 11	12-14	≥ 15	O	O	O	O	O	O
ENR (5 µg)	≤ 16	17-20	≥ 21	H	H	H	H	H	H
E (15 µg)	≤ 11	14-22	≥ 23	D	D	D	D	D	D
SXT (25 µg)	≤ 10	11-15	≥ 16	O	O	O	O	O	O

AM: Ampisilin, E: Eritromisin, ENR: Enrofloksasin, FFC: Florfenikol, OA: Oksolinik asit, S: Streptomisin, SMZ: Sulfametoksazol, STX: Trimetoprim+ Sulfametoksazol, T: Oksitetrasiklin.

D: Dirençli (Resistance), O: Orta hassas (Intermediate), H: Hassas (Susceptible).

*Deneyisel enfeksiyondan izole edilen *V. anguillarum* (*V. anguillarum* isolated from experimental infection).

Antibiyoqram hassasiyet test sonuçlarına göre 6 adet *V. anguillarum* suşunun hepsi ampisilin, eritromisin, sulfametoksazol, oksitetrasiklin, trimetoprim+sulfametoksazol ve streptomisine dirençli olmasına karşın oksolinik asit, enrofloksasin ve florfenikole karşı ise duyarlı olduğu belirlenmiştir. Antibiyogram test sonuçlarına göre *V. anguillarum* izolatlarının duyarlılık profiline ait veriler Tablo 3’de verilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Karadeniz’de yüzer ağ kafeslerde yetiştirilen gökkuşuğu alabalık yavrularında görülen hastalıklardan izole edilen bakteri türleri farklı yöntemlerle belirlenmiştir. Hastalığa neden olan bakterinin *V. anguillarum* olduğu tespit edilmiştir. Tipik hastalık semptomu gösteren gökkuşuğu alabalık yavruların böbreklerinden izole edilen, *V. anguillarum* izolatı ile 8±1°C ile yapılan deneysel enfeksiyon ile 1,5x10⁸ cfu/ml bakteri ile yapılan deneysel enfeksiyonda 48 saat içinde %100’lük ölüm meydana gelmesi ile Koch postulatları sağlanmış olup, etkenin virülensinin de yüksek olduğunun bir kanıtıdır (Knappskog ve ark., 1993). Hastalık, su sıcaklığı 10°C üzerine çıktığı yaz aylarında, tatlı suda ve düşük su sıcaklığında (1-4°C) sporadik olarak salgınlar meydana getirmektedir (Austin ve Austin, 1987). Bu sıcaklıkta hastalık meydana gelmesinin nedeni; taşıma öncesi balıkların aç bırakılması, tuzlu suya adaptasyon, su sıcaklığı farkı, taşıma esnasında oluşan stres (balıkların elleme, tanklara doldurup boşaltma, taşıma süresi, vs) immun sistem üzerine fizyolojik baskı ve tuzlu suda ilk kez karşılaşılan farklı mikrobiyal patojenlerin de önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.

İzolatların API 20E testi ile yapılan identifikasyonu sonuçları referanslarla karşılaştırıldığında *V. anguillarum* olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). API 20E test sonuçları referanslar ile karşılaştırıldığında indol testinin (+) olması, Austin ve Austin (1999), Demircan ve Candan (2006) ile benzerlik gösterirken Tanrikul (2007) farklılık olduğu; inositol testi (+) olması ile Tanrikul (2007) benzerlik gösterirken, Austin ve Austin (1999), Demircan ve Candan (2006) farklılık göstermiş; amigdalin testi (-) olması ile Demircan ve Candan (2006), Tanrikul (2007) benzerlik göstermesine karşın Austin ve Austin (1999) farklılık gösterdiği; arabinoz testi (+) olması Austin ve Austin (1999), Tanrikul (2007)’a benzerlik göstermekte iken, Demircan ve Candan (2006) farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı tablodaki diğer testlerin sonuçları ise referans test sonuçları ile aynı olduğu belirlenmiştir.

Hastalıklı gökkuşuğu alabalık yavrularından izole edilen bakteri izolatlarının moleküler sekans sonuçları genbankta karşılaştırıldığında “LK021130” kabul numarası ile kayıtlı *V. anguillarum*’a %99 oranında benzerlik göstermişlerdir.

Vibriozisin tedavisi için flumequin (6 mg/kg) 6 gün, furanace (2-4 mg/kg) 3-5 gün, furazolidon (25-75 mg/kg) 20 gün, kanamisin (50 mg/kg) 7 gün, nifurprazin hidroklorid (10 mg/kg) 3-6 gün, nitrofuran (50 mg/l) 1 saat banyo, oksolinik asit (10 mg/kg) 10 gün, oksitetrasiklin (50-75/kg) 10 gün, güçlendirilmiş sülfonamidler (30 mg/kg) 10 gün, sulfonamidler (sülfisoksazol, sülfamerazin, sülfametazin; 100-200 mg/kg) 10-20 gün dozunda kullanılması önerilmektedir (Austin ve Austin, 1987; Austin ve Austin, 1993; Austin ve Austin, 1999; Austin ve Austin, 2007; Frans ve ark., 2011), florfenikol (10 mg/kg) 10 gün (Austin ve Austin, 2007), *V. anguillarum* suşlarının R-factor taşıdığı ve plazmidler aracılığı ile özellikle streptomisin, sülfonamidler ve tetrasiklin’e direnç geliştirdiği farklı çalışmalarda tespit edildiği bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Austin ve Austin, 1993; Austin ve Austin, 1999; Austin ve Austin, 2007; Frans ve ark., 2011; Balta, 2016). Ayrıca, farklı çalışmalarda *V. anguillarum* suşlarına karşı ampisilin (Korun ve Gökoğlu, 2007; Akaylı ve ark., 2013; Akinbowale ve ark., 2006; Vaseeharan ve ark., 2005; Balta, 2016), amoksisilin (Akinbowale ve ark., 2006; Korun ve Gökoğlu, 2007), kanamisin (Korun ve Gökoğlu, 2007; Austin ve Austin, 2012), eritromisin (Akinbowale ve ark., 2006; Korun ve Gökoğlu, 2007; Tanrikul ve Gültepe, 2011; Akaylı ve ark., 2013, Vaseeharan ve ark., 2005; Balta, 2016), sülfametaksazol (Korun ve Gökoğlu, 2007; Balta, 2016), bazı suşların enrofloksasin (Tanrikul, 2007) ve oksitetrasiklin (Akaylı ve ark., 2013, Akinbowale ve ark., 2006, Tanrikul, 2007; Tanrikul ve Gültepe, 2011; Vaseeharan ve ark., 2005; Balta, 2016), trimetoprim+sulfametoksazol (Tanrikul ve Gültepe 2011; Balta, 2016) dirençli olduğu rapor edilmiştir.

Bu çalışmada ise sulfametoksazol, ampisilin, eritromisin, oksitetrasiklin, trimetoprim+sulfametoksazol ve streptomisin’e dirençli olduğu, fakat bütün suşların oksolinik asit, enrofloksasin ve florfenikol’e duyarlı olduğu saptanmıştır. Ancak antibiyogram hassasiyet test sonuçlarına göre 30 mg/kg canlı ağırlık dozunda kullanılan florfenikol yavru balıklardaki ölümleri durdurulmuş ve bu dozda tedavinin etkili olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Akaylı T., Ürkü Ç. ve Özgür Ç., (2013). Kültür gökkuşuğu alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)’ından izole edilen Gram-negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılığı. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 6, 11-15.
- Akinbowale OL., Peng H. and Barton MD., (2006). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J. Appl. Microbiol.*, 100, 1103-1113.

- Austin B. and Austin DA., (1987).** Bacterial Fish Pathogens: Disease in farmed and wild fish. First Edition, Ellis Horwood Ltd., Chichester. pp 364.
- Austin B. and Austin DA., (1993).** *Vibrionaceae representatives*. 265-307. In: Austin B, Austin DA (Ed), Bacterial Fish Pathogens. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK.
- Austin B. and Austin DA., (1999).** *Characteristics of the disease: gram-negative bacteria, Vibrionaceae representatives*. 29-30, 108-115, 313-332. In: Austin B, Austin DA (Ed), Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Springer-Praxis Publishing, Chichester, UK.
- Austin B. and Austin DA., (2007).** Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. Praxis Publishing Chichester, UK.
- Austin B. and Austin DA., (2012).** *Vibrionaceae representatives*. 357-411. In: Austin B, Austin DA (Ed), Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish. Springer, New York.
- Balta F., Çağırğan H. ve Kayış Ş., 2005.** Kültürü yapılan gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) İzole edilen *Yersinia ruckeri*'nin idenfikasyonunda API 20E testinin kullanılabilirliği. *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, **3** (4); 434-237.
- Balta F., 2016.** Phenotypic, serotypic and genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *Vibrio anguillarum*, isolated from cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in the southeast Black Sea, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, **25** (10); 4393-4400.
- Balta F., Sandalli C., Kayis S. and Ozgumus OB., (2010).** Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **30**, 211-219.
- CLSI., (2014).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth Informational Supplement. *Clinical Laboratory Standards Institute*, Wayne, USA, M100-S24, 230s.
- Çağırğan H., (2004).** Vaccine development in sea bass fry (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) against vibriosis. *EU Su Ürünleri Dergisi*, **21**, 271-274.
- Demircan D. ve Candan A., (2006).** Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (rpoN gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey. *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, **30**, 305-310.
- Drancourt M., Bollet C., Carliz A. and Raoult D., (2000).** 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3623-3630.
- Frans I., Michiels CW., Bossier P., Willems KA., Lievens B. and Rediers H., (2011).** *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *J Fish Dis*, **34**, 643-661.
- Grisez L., Ceusters R. and Oliever F., (1991).** The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. *J. Fish Dis.*, **14**, 359-365.
- Knappskog DH., Rodseth OM., Slinde E. and Endersen C., (1993).** Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from vibriosis. *Journal of Fish Diseases*, **16**, 327-338.
- Korun J., (2006).** Kültürü yapılan çipuralarda (*Sparus aurata* L.) görülen *Listonella anguillarum* enfeksiyonu üzerine bir çalışma. *EU Su Ürünleri Dergisi*, **23**, 259-263.
- Korun J. and Gokoglu M., (2007).** *Listonella anguillarum* isolated from hatchery cultured red porgy *Pagrus pagrus* in Turkey. *J. Anim. Vet. Adv.*, **6**, 823-827
- MacDonell MT., Singleton FL. and Hood MA., (1982).** Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 423-427.
- Maugeri TL., Crisafi E., Genovese L. and Scoglio MER., (1983).** Identification of *Vibrio anguillarum* with the API 20 E system. *Microbiologica*, **1**, 73-79.
- Pedersen K., Grisez L., van Houdt R., Tiainen T., Ollevier F. and Larsen JL., (1999).** Extended serotyping scheme for *V. anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Curr. Microbiology*, **38**, 183-189.
- Popovic NT., Coz-Rakovac R. and Strunjak-Petrovic I., (2007).** Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: a review. *Veterinarni Medicina*, **52**, 49-53.
- Roberson BS., (1990).** *Bacterial agglutination*. 81-86. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, van Muiswinkel WB (Ed). Techniques in fish immunology. SOS Publications, Fair Haven, NJ.
- Sørensen UBS. and Larsen JL., (1986).** Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 593-597.
- Tanrikul TT. and Gultepe N., (2011).** Mix infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) *Lactococcus garvieae* and *Vibrio anguillarum* O1. *J. Anim. Vet. Adv.*, **10**, 1019-1023.
- Tanrikul TT., (2007).** Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey. *Pak. J. Biol. Sci.*, **10**, 1733-1737.
- Tanrikul TT., Çağırğan H. ve Tokşen E., (2004).** Levreklerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) izole edilen *Vibrio* türlerinin API 20E yöntemiyle identifikasyonu. *EÜ Su Ürünleri Dergisi*, **21**, 243-247.
- Toranzo AE. and Barja JL., (1990).** A review of the taxonomy and sero epizootiology of *V. anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis. Aquat. Org.*, **9**, 73-82.
- Toranzo AE., Santos Y. and Barja JL., (1997).** Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. *Dev. Biol. Stand.*, **90**, 93-105.
- Urakawa H., Kita-Tsukamoto K. and Ohwada K., (1997).** 16s rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family *Vibrionaceae*. *FEMS Microbiology Letters*, **152**, 125-132.
- Vaseeharan B., Ramasamy P., Murugan T. and Chen JC., (2005).** In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **26**, 285-291.
- Weisburg WG., Barns SM., Pelletier DA. and Lane DJ., (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, **173**, 697-703.

Geliş tarihi: 28.09.2016

Kabul tarihi: 20.10.2016

* Başlıca Yazar Yazışma adresi:

Doç. Dr. Fikri BALTA

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Hastalıklar Anabilim Dalı, Zihni Derin Yerleşkesi, Fener Mh., 53100, Rize, Türkiye.

E-mail: fikri.balta@erdogan.edu.tr