

Akdeniz Bölgesindeki Gökkuşuğu Alabalıklarından İzole Edilen *Flavobacterium psychrophilum* Suşlarının Fenotipik Ve Genetik Farklılıklarının Belirlenmesi*

Ahmet Tahir ERSOY¹, Seçil METİN^{1**}, Ertan Emek ONUK²

¹Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta.

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Bölümü, Samsun.

Geliş : 02.03.2018

Kabul : 18.04.2018

Araştırma Makalesi / Research Paper

**Sorumlu Yazar: secil_ekici@yahoo.com

E.Dergi ISSN: 1308 -7517

[DOI: 10.22392/egirdir.400641](https://doi.org/10.22392/egirdir.400641)

Özet

Bu çalışma ile Akdeniz bölgesinde bulunan 14 farklı gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) işletmesinde *Flavobacterium psychrophilum*'un varlığı ile fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla Kasım 2012-Mart 2013 tarihleri arasında ticari alabalık işletmelerinden sperm, yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli larva ve 0.2-5 gr ağırlığındaki larvalardan örnekler alınmıştır. Örneklerden olası *F. psychrophilum*'un izolasyonu konvansiyonel mikrobiyolojik metotlar kullanılarak yapılmış ve toplamda 172 adet izolat elde edilmiştir. Elde edilen tüm izolatların enzim aktivitesi API ZYM test sistemine göre tespit edilmiştir. Yapılan fenotipik testler sonucunda *F. psychrophilum* olduğu düşünülen 65 izolat belirlenmiştir. Bu izolatların moleküler olarak doğrulanmasında *F. psychrophilum* spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) metodu kullanılmıştır. Hasta balıklardan izole edilen 17 izolatın (11 karaciğer, 3 dalak ve 3 böbrek) *F. psychrophilum*'a özgü 971 bp'lik bant verdiği saptanmıştır. İzolatlar arası klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla RAPD-PCR metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre *F. psychrophilum* izolatlarının beş farklı RAPD bant paterni (F1-F5) verdiği saptanmıştır. İzolatların % 85 benzerlik katsayısına göre bir "unique" tip (F1 nolu genotip) ve bir küme içerisinde gruplandığı belirlenmiştir. Yapılan antibiyogram testi sonucu, izolatların trimetoprim/sulfametazol, klindamisin, ampicillin, tetrakisiklin, enrofloksasin, kloramfenikole, oksitetrasiklin, florfenikol ve tobramisin'e duyarlı olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen bulgular RAPD-PCR'da kullanılan M13 primerinin *F. psychrophilum* izolatları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesinde kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Oncorhynchus mykiss*, *Flavobacterium psychrophilum*, identifikasyon, API ZYM, PCR, RAPD PCR

Identification of Phenotypic and Genotypic Characteristics Diversity of Isolated *Flavobacterium psychrophilum* in Rainbow Trout Farms in Mediterranean Region

Abstract

In this study, it was aimed to investigate the phenotypic and genotypic characteristics with presence of *Flavobacterium psychrophilum* in fourteen rainbow trout farms in Mediterranean Region. For this purpose, sperm, eyed egg, egg, yolk-sac larvae and 0,2-5 g fry were sampled from commercial trout farms between November 2012- March 2013. Isolation of potential *F.psychrophilum* from samples was made using conventional microbiological methods and a total of 172 obtained strains. Enzyme activity of all isolates was identified according to the API ZYM test system. As a result of the phenotypic tests, 65 isolates thought to be *F. psychrophilum* were identified. PCR assay was used in molecular confirming of these strains. It was determined that, 17 strains isolated from diseased fish (11 of them liver, 3 of them spleen, 3 of them kidney) gave specific 971 bp band which was specific to *F.psychrophilum*. RAPD-PCR assay was used to identify the clonal relationship between strains. *F. psychrophilum* isolates were yielded five different RAPD band patterns (F1-F5) according to this method. This strains detected to be grouped into 1 cluster and according to similarity coefficient %85 "unique" type (F1 the genotype). According to antibiotic sensitivity tests, isolates were found to be sensitive to trimetoprim/sulfamethoxazole, clindamycin, ampicillin, tetracycline, enrofloxacin, chloramphenicol, oxytetracycline, florfenicol and tobramycine. In conclusion, the findings from this study

showed that the M13 primer used in RAPD-PCR can be used to determine the clonal relationship between *F. psychrophilum* isolates.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, *Flavobacterium psychrophilum*, identification, API ZYM, PCR, RAPD PCR

***Bu çalışma yüksek lisans tezi olarak Süleyman Demirel Üniversitesi B.A.P. (Proje No: 3660-YL1-13) tarafından desteklenmiştir.**

GİRİŞ

Flavobacterium psychrophilum özellikle salmonid balıklarda ve bazen de diğer balık türlerinde görülen bakteriyel soğuksu hastalığı veya diğer bir isimle gökkuşağı alabalığı fry sendromu'nun etkenidir (Cipriano ve Holt, 2005). Hastalık su sıcaklığının 10 °C nin altına düştüğü dönemlerde ortaya çıkmakta ve özellikle larva ve yavrularda yüksek mortaliteye neden olmaktadır.

Soğuk Su Hastalığı günümüzde pek çok ülkede enzootik bir hastalık olup, tüm dünyadaki gökkuşağı alabalığı kuluçkahanelerinde ciddi balık kayıplarına neden olmaktadır (Lorenzen vd., 1997; Cipriano ve Holt, 2005). Ülkemizde de 1993 yılından bu yana Ege, Marmara, Akdeniz, Karadeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerden de etken izole edilmiştir (Çağırğan vd., 1997; Korun ve Timur, 2001; Diler vd., 2003; İspir vd., 2004; Didinen vd., 2005; Durmaz vd., 2012).

F. psychrophilum alabalıkların deri, mukoza, yüzgeç, solungaç, operkulum gibi yapıların doğal florasında bulunmaktadır (Nematollahi vd., 2003). Çevresel faktörlerin (özellikle su sıcaklığının düşmesi, kalitesi düşük sular, yüksek stok yoğunluğu, kötü bakım-besleme gibi) değişmesiyle etkenin virulensi artmakta ve enfeksiyona neden olmaktadır. Etken horizontal olarak, temas ve su yoluyla balıklar arasında hızlı bir şekilde yayılarak bulaştığından gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde yaygın ölümlere ve sonuçta işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Cipriano ve Holt, 2005).

F. psychrophilum kültürünün zor olması, uzun inkübasyon dönemine ihtiyaç duyması (3-4 gün) gibi nedenlere bağlı olarak, teşhiste kullanılan fenotipik ve serolojik metotlar yavaş ve zaman alıcıdır (Winklund vd., 2000). Etkenin konakçı organizmadaki varlığının saptanmasında Floresans Poliklonal Antikorlar ve Enzyme Linked İmmunosorbent testi (ELISA) gibi teknikler de kullanılmaktadır (Lorenzen ve Karas 1992; Rangdale ve Way, 1995). Ancak, bu tekniklere rağmen, balık ve çevresel örneklerde düşük sayıda *F. psychrophilum*'un varlığının saptanması ve etkenin epidemiyolojisinin belirlenmesinde, daha hızlı ve daha duyarlı genetik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler genetik bir metot olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) bu amaçla tavsiye edilen ve yaygın bir kullanım alanı bulmuş bir tekniktir (Romalde vd., 1999; Magarinos vd., 2000; Ravelo vd., 2003; Mancuso vd., 2007; Beaz-Hidalgo vd., 2008; Onuk vd., 2011; Durmaz vd., 2012; Rochat vd., 2017).

Hastalığın kontrolünde etkin bir aşı uygulamasının olmaması ve bakteriyel bir hastalık olması nedeniyle antibiyotik ile tedavi ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle bakterinin hızlı identifikasyonu ve antimikrobiyallere olan duyarlılığının belirlenmesi önemlidir (Didinen vd., 2005).

Bu araştırmada Akdeniz bölgesinde yer alan 14 farklı gökkuşağı alabalığı işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum*'un neden olduğu enfeksiyonların varlığının/yaygınlığının araştırılması, elde edilen izolatların fenotipik özelliklerinin ve izolatlar arası genetik ilişkilerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Flavobacterium psychrophilum'un İzolasyonu

Bu araştırmada Kasım 2012-Mart 2013 dönemleri arasında Akdeniz bölgesinde yer alan 14 farklı ticari gökkuşağı alabalığı işletmesinden örneklemeler yapılmıştır. *F. psychrophilum*'un izolasyonu için 0.2-5 gr ağırlığındaki enfekte ve sağlıklı gökkuşağı alabalığı larva ve yavrularının böbrek, karaciğer, dalak ve solungaçlarından ekimlerin yanı sıra, döllenenmiş yumurta, döllenenmiş yumurta, sperminden ekimler yapılmıştır. İzolasyon için Anacker-Ordal (AO) Agar kullanılmıştır. Larvaların dalak, karaciğer ve böbreklerinden iğne öze, keseli larva ve yumurtalardan ise steril makas ya da enjektör kullanılarak örneklerin ekimleri yapılmıştır. 0.1 ml'lik sperm örnekleri besiyerlerine ilave edilerek aseptik koşullarda eküvyon ve öze kullanılarak mikrobiyolojik ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan petripler 18°C'de 5-7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besiyeri üzerinde oluşan sarı-pigmentli kolonilerden subkültürleri yapılarak saflaştırılmış ve kullanılmışcaya kadar Anacker-Ordal's Broth'a steril gliserin eklenerek -70°C'de stoklanmıştır.

İzolatların Biyokimyasal Ve Fizyolojik Karakterizasyonu

F. psychrophilum suşlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri geleneksel kültür yöntemleri, hızlı teşhis kitleri (API ZYM, BioMeriux) kullanılarak belirlenmiştir. İzolatların identifikasyonunda; Gram boyama, sitokrom oksidaz, katalaz testi, asılı damla ile hareket muayenesi, nişasta hidrolizi, jelatin hidrolizi, oksidasyon-fermentasyon testi (O/F), kongo red absorpsiyonu, flexirubin pigmentin varlığı, % 0,8, % 2 NaCl ve 4, 23 ve 30 °C'lerde büyüme özellikleri yönünden geleneksel mikrobiyolojik identifikasyon testleri çalışılmıştır. İzolatların enzim üretimi API ZYM stripleri yardımıyla belirlenmiştir. APIZYM testi üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmış ve stripler 18°C'de 20-24 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar referans *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T suşu ile karşılaştırılmıştır. (Madetoja ve Wiklund, 2002; Austin ve Austin, 2007).

İzolatların Moleküler İdentifikasyonu

İzolatların DNA ekstraksiyonları, prensibi spin kolon esasına dayanan PureLink™ Genomic Mini Kit (İnvitrogen, USA) marka ticari DNA ekstraksiyon kiti ile üretici firma talimatlarına göre yapılmıştır. *F. psychrophilum*'un PCR ile identifikasyonunda FP1 (5'-GTT AGT TGG CAT CAA CAC-3') (Urdacı vd., 1998) ve FP3 (5'-ACA CTG GCA GTC TTG CTA-3') (Del cerro vd., 2002) kullanılmıştır. Bu amaçla PCR amplifikasyon aşamasında DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1,6 mM MgCl₂, her bir dNTP'den 0,2 mM, 1.0 U Taq polymerase, 1 µM her bir primer ve 5µl template DNA içeren 25 µl PCR karışımı oluşturulmuştur. Oluşturulan bu karışım 95°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 60°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 1 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Amplifikasyon sonrasında oluşan ürünler etidium bromid (2µg/ml) içeren

%1,5'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Amplifikasyon sonrası 971 bp'lik PCR ürününün görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

İzolatlar Arası Klonal İlişkinin Belirlenmesi

İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesinde Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR metodu kullanılmıştır. Bu metotta random primer olarak M13 (GAG GGT GGC GGT TCT) primeri kullanılmıştır. RAPD-PCR'da amplifikasyon aşaması Tekerekoglu vd., (2007)'nin bildirdiği metodun modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada DEPC-treated water, 1XPCR Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM her bir dNTP, 2.5U Taq DNA polimeraz, 25 pmol primer ve 5 µl template DNA (50-100 µl/ng) içeren 25 µl'lik RAPD master karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım 95°C'de 1 dk ön denaturasyonu takiben 94°C'de 1 dk, 40°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 5 dk final uzama koşullarında amplifikasyona tabi tutulmuştur. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Oluşan RAPD paternlerinin dendogramları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) ile, CHEF-DR® III, Quantity One® yazılımı (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kullanılarak çizilmiştir. RAPD analizinin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla rastgele 5 suş seçilmiş ve RAPD analizi arka arkaya 3 kez tekrarlanmıştır.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

F. psychrophilum izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır (Kirby vd., 1966). Test için oksitetrasiklin, tobramisın, streptomisin, enoksasin, oksasillin, kloramfenikol, florfenikol, penisilin, klindamisin, tetrasiklin, enrofloksasin, amoksisilin, ampisilin, eritromisin, kanamisin ve sulfametoksazol+trimetoprim antibiyotikleri kullanılmıştır. Mc Farland 0,5'e göre (1.5x10⁸ cfu/ml) hazırlanan bakteri süspansiyonundan AO agar besiyerine 0,1 ml miktarında eklenerek homojen bir şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra steril pens yardımıyla antibiyotik diskleri yerleştirilmiş ve petriyerler 18°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra antibiyotik inhibisyon zonları ölçülmüş ve test sonuçları NCCLS'in kriterlerine göre değerlendirilmiştir (NCCLS, 1999).

BULGULAR

***Flavobacterium psychrophilum*'un İzolasyonu**

Akdeniz bölgesindeki 14 farklı işletmeden alınan hasta ve sağlıklı gökkuşacağı alabalığı larva ve yavrularının böbrek, dalak ve solungaçları yanı sıra, döllenmemiş yumurta, döllenmiş yumurta ve spermelerinden AO agara yapılan ekimlerde *F. psychrophilum* şüpheli 172 suş izole edilmiştir.

Ekim yapılan hasta gökkuşacağı alabalık örneklerinde renkte koyulaşma, karaciğerde solgunluk, karında şişkinlik, dalakta büyüme, yüzgeçlerde kanama, dorsal ve adipöz yüzgeçlerde aşınma, çenede kanama, ekzoftalmus, böbrekte kanama, ve karaciğerde konjesyon gibi genel klinik tablo gözlemlenmiştir.

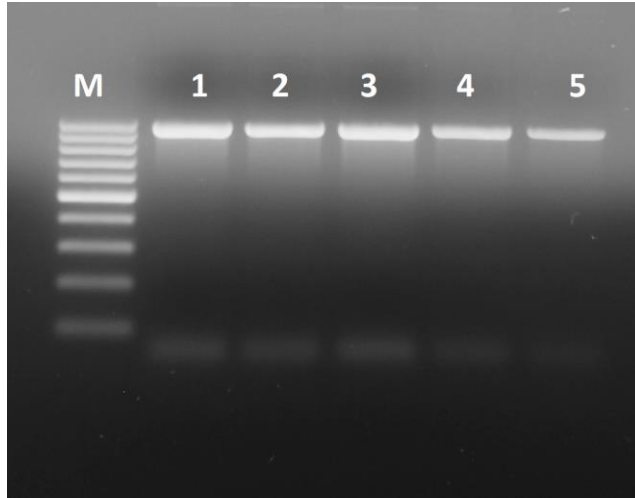
İzolatların Biyokimyasal ve Fizyolojik Karakterizasyonu

Fenotipik ve biyokimyasal özelliklerine göre 172 izolattan 65'i *F. psychrophilum* olduğu belirlenmiştir. Bu suşların AO Agarda 18 °C' de 5-7 günlük inkübasyondan sonra sarı-pigmentli koloniler oluşturdukları gözlenmiştir. İzole edilen suşların Gram (-) ince çubuk şeklinde, kayma hareketi gösteren, katalaz, fleksirubin pigmenti yönünden pozitif, jelatini ve kazeini hidrolize ettiği, O/F testi sonucunda glukoz kullanmadığı ve nişastayı hidrolize edemediği tespit edilmiştir. Sitokrom oksidaz testinde ise suşların pozitif reaksiyon verdiği belirlenmiştir. İzolatların biyokimyasal özellikleri çoğunlukla homojenlik göstermiştir.

65 izolatın API ZYM profiline bakıldığında, suşların alkalın fosfataz, esteraz, esteraz lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, asit fosfataz, Naphtol fosfohidrolaz, α -Glukosidaz testleri pozitif, lipaz, arilamidaz, tripsin, α -Kemotripsin, α -Galaktosidaz, β -Galaktosidaz, β -Glukuronidaz, β -Glukosidaz, α -Fucosidaz testleri yönünden negatif sonuç verdiği görülmüştür.

İzolatların PCR ile İdentifikasyonu

Klasik biyokimyasal testler ve API ZYM sonuçlarına göre *F. psychrophilum* seçilen izolatlarla (n=65) doğrulama amacıyla *F. psychrophilum* spesifik PCR uygulanmıştır. Sonuç olarak elde edilen saha izolatlarından 17'sinin ve standart suşun *F. psychrophilum*'a özgü 971 bp'lik bant verdiği saptanmıştır (Şekil 1). Bu izolatlar hasta gökkuşağı alabalıklarının karaciğer (11), dalak (3) ve böbreğinden (3) elde edilmiştir.

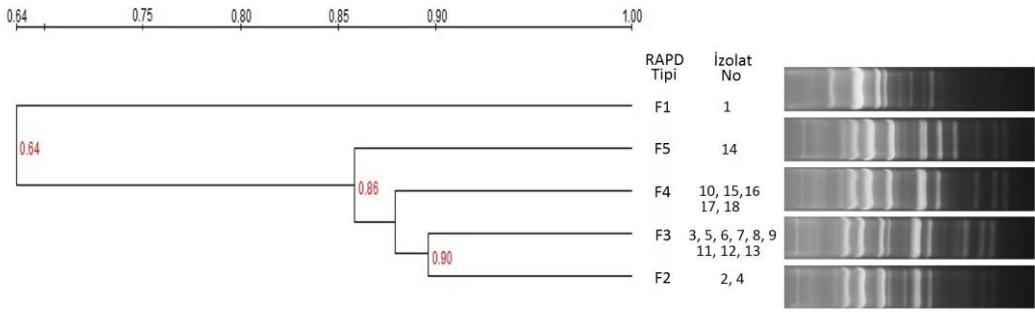


Şekil 1. *F. psychrophilum* spesifik PCR (971 bp). M; Molecular ağırlık standartı (100-1000 bp) 1; *F. psychrophilum* NCMB 1947, 2-5; *F. psychrophilum* saha izolatları.

İzolatlar Arası Klonal İlişkinin Belirlenmesi

F. psychrophilum izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılan M13 primerinin RAPD-PCR analizi sonrası reproducibile (üretken) bant verdiği ve bu primerin *F. psychrophilum* izolatları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesinde kullanılabilir olduğu saptanmıştır. Çalışmada RAPD-PCR ile *F. psychrophilum* izolatlarının beş farklı RAPD

bant paterni verdiği saptanmıştır (F1-F5). İzolatlar % 85 benzerlik katsayısına göre bir “unique” tip (F1 nolu genotip) ve bir küme içerisinde gruplanmıştır. Bu kümenin dört genotip (F2, F3, F4 ve F5 no’lu genotip) içerdiği belirlenmiştir. İzolatların genotipler içerisindeki dağılımı arasında farklılıklar gözlenmiştir. Buna göre; Genotip F1’in 1 (standart Suş), Genotip F2’nin 2 (izolat no 2 ve 4), Genotip F3’ün 9 (izolat no 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 ve 13), Genotip F4’ün 5 (izolat no 10, 15, 16, 17 ve 18) ve Genotip F5’in 1 (izolat no 14) izolat içerdiği belirlenmiştir. Analiz sonucunda genotip F3’ün içerdiği 9 izolat (%50) ile predominant tip olduğu saptanmıştır (Şekil 2). M13 primeri ile arka arkaya yapılan 3 RAPD-PCR analizi sonunda aynı bant paternleri belirlenmiş ve tekrarlanabilirlik %100 olarak bulunmuştur.



Şekil 2. M13 primeri ile oluşturulmuş örnek RAPD-PCR paternleri ve bu paternlerden elde edilmiş UPGMA dendrogramı

***Flavobacterium psychrophilum* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları**

F. psychrophilum olduğu teyit edilen 17 suşun tamamının trimetoprim/sulfametazol ve klindamisin’e duyarlı (%100), ampisillin ve tekrasiklin’e karşı % 94,12, enrofloksasin ve kloramfenikol’e % 88,24, oksitetrasiklin, florfenikol ve tobramisin’e % 82,36, amoksisiklin ve streptomisin’e %76,48, kanamisin’e %71 ve enoksasin ve eritromisin’e % 58, 83 oranında duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Kasım 2012-Mart 2013 dönemlerinde Akdeniz bölgesinde yer alan gökkuşağı alabalığı işletmelerinden *F. psychrophilum*’un varlığının belirlenmesi amacıyla örneklemeler yapılmıştır. Alınan örneklerden yapılan bakteriyolojik incelemeler sonucu *F. psychrophilum* yönünden şüpheli 172 izolat elde edilmiştir. Fenotipik ve biyokimyasal özelliklerine göre bu izolatların 65’i *F. psychrophilum* olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte uygulanan PCR ile sadece 17 izolatın *F. psychrophilum* olduğu teyit edilmiştir. PCR denemesinde 17 saha izolatının ve standart suşun (NCIMB 1947^T) *F. psychrophilum*’a özgü 971 bp’lik bant verdiği saptanmıştır.

Çalışmada elde edilen *F. psychrophilum* izolatlarının tamamının Gram negatif uzun çubuk biçiminde, kayma hareketi gösteren, katalaz, sitokrom oksidaz, fleksirubin pigmenti yönünden pozitif, jelatini ve kazeini hidrolize ettiği, O/F testi sonucunda glukoz

kullanmadığı, kongo red absorpsiyonu ve nişasta hidrolizinin negatif olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar *F. psychrophilum* suşlarının fenotipik olarak oldukça yüksek düzeyde homojen olduğunu göstermektedir (Lorenzen vd., 1997; Madetoja vd., 2001; Didinen vd., 2005; Hesami vd., 2008; Kubilay vd., 2009; Valdebenito ve Avendaño-Herrera, 2009; Durmaz vd., 2012; Özcan ve Sarıeyyüpoğlu, 2013; Boyacıoğlu vd., 2015). Bu çalışmada *F. psychrophilum* suşlarının fenotipik özelliklerinin homojen yapıda olduğu ve diğer araştırmacıların sonuçlarına benzer özellikler gösterdiği belirlenmiştir.

F. psychrophilum izolatlarının lipolitik ve proteolitik enzim aktivitesine sahip olduğu, ancak karbonhidrat metabolizması ile ilgili enzimleri üretme yeteneğinde olmadığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Lorenzen vd., 1997; Ostland vd., 1997; Madetoja vd., 2001; Didinen vd., 2005). Bu çalışmada da izolatların lipolitik ve proteolitik enzimleri ürettikleri fakat karbonhidrat metabolizması ile ilgili enzimleri üretmedikleri görülmüştür.

F. psychrophilum'un kültürünün zor olması, uzun inkübasyon dönemine ihtiyaç duyması (3-4 gün) gibi nedenlere bağlı olarak, teşhiste moleküler tekniklerden PCR yaygın olarak kullanılmaktadır (Romalde vd., 1999; Magarinos vd., 2000; Ravelo vd., 2003; Mancuso vd., 2007; Beaz-Hidalgo vd., 2008; Durmaz vd., 2012; Boyacıoğlu vd., 2015). Özcan ve Sarıeyyüpoğlu (2013) Elazığ'da bulunan 4 farklı işletmeden yaptıkları ekimlerde elde ettikleri 4024 izolattan sadece 160'nın *F. psychrophilum* olduğunu PCR ile teyit etmişlerdir. Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde bulunan ticari gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde *F. psychrophilum*'un varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada 12 izolattan sadece 5 tanesinin *F. psychrophilum* olduğu PCR ile teyit edilmiştir (Durmaz vd., 2012). Boyacıoğlu vd. (2015) yavru gökkuşağı alabalıklarında görülen salgınlardan 26 adet *F. psychrophilum* suşunu izole etmişler ve doğrulama amacıyla yaptıkları PCR sonucunda suşların tamamının *F. psychrophilum*'a özgü 971 bp'lik bant verdiği saptanmıştır. Arjantin'de hasta yavru gökkuşağı alabalıklarından izole edilen 7 suştan sadece 6 tanesinin *F. psychrophilum* olduğu PCR ile teyit edilmiştir (Moreno vd., 2016). Del Cerro vd., (2010) 12 farklı gökkuşağı alabalığı işletmesindeki hasta balıkların karaciğer ve böbreklerinden yaptıkları ekimlerde 25 adet *F. psychrophilum* suşunu izole etmişler ve tüm suşların PCR ile *F. psychrophilum* olduğu doğrulanmıştır. Chen vd. (2008), gökkuşağı alabalığı ve coho salmonların gözlü yumurta, karaciğer ve böbreklerinden yaptıkları ekimlerde elde ettikleri 140 suşun PCR ile *F. psychrophilum* olduğu teyit edilmiştir. Bu çalışmada da gökkuşağı alabalıklarında *F. psychrophilum*'un varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan ekimler sonucu elde edilen şüpheli 65 izolat ile yapılan PCR sonucu sadece 17 suşun *F. psychrophilum* olduğu teyit edilmiştir.

Moleküler tiplendirme metotları farklı konakçı veya çevreden elde edilen suşların ilişkili olup olmadıklarını belirleyen güçlü araçlardır ve etkenlerin ortak bulaşma veya enfeksiyon yolları hakkında kanıt sağlarlar. Bakteriyel izolatların epidemiyolojik analizlerinde Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), RAPD ve Repetitive-Sequence-Based Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR) gibi çeşitli genotiplendirme stratejileri kullanılmıştır. RAPD PCR, ERIC PCR ve Rep-PCR metodu son yıllarda bakteriyel balık patojenleri arasındaki genetik ilişkilerin belirlenmesinde yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (Romalde vd., 1999; Magarinos vd., 2000; Ravelo vd., 2003; Mancuso vd., 2007; Beaz-Hidalgo vd., 2008; Onuk vd., 2011).

Bu çalışmada PCR ile doğrulanan 17 adet *F. psychrophilum* suşların M13 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi yapılmış ve izolatların beş farklı RAPD bant paterni verdiği saptanmıştır (F1-F5). İzolatlar % 85 benzerlik katsayısına göre bir

“unique” tip (F1 nolu genotip) ve bir küme içerisinde gruplanmıştır. Bu kümenin dört genotip (F2, F3, F4 ve F5 no’lu genotip) içerdiği belirlenmiştir. M13 primeri ile arka arkaya yapılan 3 RAPD-PCR analizi sonunda aynı bant paternleri belirlenmiş ve tekrarlanabilirlik %100 olarak bulunmuştur.

Valdebenito ve Avendaño-Herrera (2009), gökkuşuğu alabalığı ve Atlantik salmonlarından izole etikleri 20 *F. psychrophilum* suşlarının karakterizasyonu moleküler olarak belirledikleri çalışmalarında, RAPD ve REP-PCR ile *F. psychrophilum*’un ana genetik grubunun çiftliklerdeki hastalık salgınlarında dominant olabileceği gösterilmiştir. Özcan ve Sarıeyyüpoğlu (2013), PFGE tekniği ile gen tiplendirmesi yaptıkları 160 adet suşun referans *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T ile yakın akraba olduğu tespit etmişlerdir.

Hastalığın kontrolünde etkin bir aşı uygulamasının olmaması ve bakteriyel bir enfeksiyon olması nedeniyle, RTFS’nin sağaltımında en etkili ve en çok kullanılan ilaçlar antibiyotiklerdir. Çalışmamızda izole edilen *F. psychrophilum* suşlarının, trimetoprim/sulfametazol, klindamisin, kloramfenikol, florfenikol, oksitetrasiklin ve enrofloksasine karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Balta, (1997) *F. psychrophilum*’un nitrofuranlara duyarlı; flumekuın, sulfanomidler ve oksolinik asite dirençli olduğunu; İspir vd. (2004) gentamisin, oksitetrasiklin, nitrofuran, amoksisillin /klavulanik asit ve eritromisine duyarlı; kloramfenikol ve penisile dirençli, Diler vd. (2003), amoksisillin klavulonik asit, oksitetrasiklin ve gentamisine duyarlı, trimetoprime dirençli, Boyacıoğlu (2007) amoksisillin/klavulanik asit, ampisilin, gentamisin, penisilin ve sülfametoksazol-trimetoprime direnç gösterdiği, oksitetrasiklin, enrofloksasin, siprofloksasin ve florfenikole duyarlı olduğu, Didinen vd. (2005), *F. psychrophilum* izolatının tamamının doksisisikline; % 92,3’nun gentamisin ve spektinomisin’e; % 84,6’sının tetrasiklin, flumekuın, amoksisillin/klavulanik asit ve gentamisin’e duyarlı, Durmaz vd. (2011) suşların tamamının oksitetrasiklin ve enrofloksasine karşı duyarlı olduğu ve suşların antibiyotik duyarlılık profillerinin değişken olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda suşların kloramfenikol ve trimetoprim/sulfametazol’e karşı diğer araştırmacılardan farklı olarak duyarlı olduğu belirlenmiştir. Diğer araştırmacılar ile karşılaştırıldığında görülen farklılıkların bölgesel olarak farklı antibiyotikleri kullanımı ve suşlar arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

F. psychrophilum’un kültürünün zor olması ve teşhiste kullanılan fenotipik ve serolojik metotların yavaş ve güvenilir sonuçlar vermemesi nedeniyle *F. psychrophilum* belirlenmesinde moleküler yöntemlerin tercih edilmesinin daha yararlı olacağı belirlenmiştir. Özellikle hastalığın izlenmesi ve teşhisinde PCR metodunun tercih edilmesinin daha güvenilir olduğu düşünülmektedir. Moleküler tiplendirme metotları ile farklı konakçı veya çevreden elde edilen suşların ilişkisi ve etkenlerin ortak bulaşma veya enfeksiyon yolları hakkında kanıt sağlamaktadırlar. İlerideki yapılacak çalışmalarda PCR tabanlı DNA fingerprinting metotları ile suşların genotiplendirilmesinin yapılması ve farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş suşlar arasındaki genetik ilişkinin ortaya konması ile *F. psychrophilum*’un dağılımı hakkında bilgi verecektir.

KAYNAKLAR

- Austin, B., & Austin, D.A. (2007). Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. 4th ed., Springer-Praxis publishing, Chichester, p. 594, UK.
- Balta, F. (1997). Kültürü yapılan alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) görülen *Flexibacter psychrophila* enfeksiyonu. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 19 Eylül 1997, Cilt II Eğirdir-İSPARTA, 621-648.

- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45 (4), 493-496.
- Beaz-Hidalgo, R., Lopez-Romalde, S., Toranzo, A.E., & Romalde, J.L. (2008). Polymerase chain reaction amplification of repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic sequences for molecular typing of *Pseudomonas anguilliseptica* and *Aeromonas salmonicida*. *Journal of aquatic animal health*, 20(2),75–85.
- Boyacıoğlu, M. (2007). Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) RTFS'ye (Rainbow Trout Fry Syndrome) neden olan *Flavobacterium psychrophilum* etkeninin izolasyonu ve antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi. T.C. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, AYDIN.
- Boyacıoğlu, M., Kum, C., Kırkan, Ş., Sekkin, S., Parın, U., Karademir, Ü., & Akar, F. (2015). Comparison of in vitro and in vivo antibacterial efficacy for the control of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry: the first genotypical evidence in West Aegean region of Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 39(3), 314-321.
- Bruun, M. S., Madsen, L., & Dalsgaard, I. (2003). Efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different in vitro antibiotic susceptibilities. *Aquaculture*, 215(1-4), 11-20.
- Chen, Y. C., Davis, M. A., Lapatra, S. E., Cain, K. D., Snekvik, K. R., & Call, D. R. (2008). Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* recovered from commercially raised rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and spawning coho salmon, *O. kisutch* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 31(10), 765-773.
- Cipriano, R. C., & Holt, R. A. (2005). *Flavobacterium psychrophilum*, cause of bacterial cold-water disease and rainbow trout fry syndrome. US Department of the Interior, US Geological Survey, National Fish Health Research Laboratory.
- Çağırğan, H., Tanrıku, T. T., & Balta, F. (1997, September). Characteristics of yellow pigmented bacteria isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In *Eighth International Conference Diseases of Fish and Shell Fish* (pp. 73-81).
- Del Cerro, A., Márquez, I., & Prieto, J. M. (2010). Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Spain. *Journal of fish diseases*, 33(4), 285-291.
- Didinen, B. I., Diler, Ö., Ekici, S., & Altun, S. (2007). *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının teşhisinde API ZYM kullanımı ve ATB VET ile antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 1(2), 62-68.
- Diler, Ö., Altun, S., & Işıklı, B. I. (2003). Kültürü yapılan gökkuşluğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un fenotipik karakterleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(1), 1-8.
- Durmaz, Y., Onuk, E. E., & Ciftci, A. (2012). Investigation of the presence and antibiotic susceptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout farms (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) in The Middle and Eastern Black Sea Regions of Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 59, 141-146.
- Hesami, S., Allen, K. J., Metcalf, D., Ostland, V. E., MacInnes, J. I., & Lumsden, J.S. (2008). Phenotypic and genotypic analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from Ontario salmonids with bacterial coldwater disease. *Canadian journal of microbiology*, 54(8), 619-629.
- İspir, Ü., Şeker, E., Sağlam, N., & Dörücü, M. (2004). Doğu Anadolu bölgesinde bazı gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde görülen *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonunun araştırılması. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(4), 718-724.

- Korun, J., & Timur, G. (2001). Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 12, 15-30.
- Kubilay, A., Altun, S., Didinen, B. I., Ekici, S., & Diler, O. (2009). Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* izolasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(5), 709-715.
- Lorenzen, E., Dalsgaard, I., & Bernardet, J. F. (1997). Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I: phenotypic and genomic studies. *Diseases of aquatic organisms*, 31(3), 197-208.
- Lorenzen, E., & Karas, N. (1992). Detection of *Flexibacter psychrophilus* by immunofluorescence in fish suffering from fry mortality syndrome: a rapid diagnostic method. *Diseases aquatic organisms*, 13, 231-234.
- Madetoja, J., Hänninen, M. L., Hirvelä-Koski, V., Dalsgaard, I., & Wiklund, T. (2001). Phenotypic and genotypic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* from Finnish fish farms. *Journal of Fish Diseases*, 24(8), 469-479.
- Madetoja, J., & Wiklund, T. (2002). Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms. *Systematic and applied microbiology*, 25(2), 259-266.
- Magariños, B., Toranzo, A. E., Barja, J. L., & Romalde, J. L. (2000). Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiology & infection*, 125(1), 213-219.
- Mancuso, M., Avendaño-Herrera, R., Zaccone, R., Toranzo, A. E., & Magariños, B. (2007). Evaluation of different DNA-based fingerprinting methods for typing *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Biological research*, 40(1), 85-92.
- Moreno, P., Molinari, L., Hualde, P., & Miyazaki, T. (2016). First report of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Argentina. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 36(2), 59.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, (1999). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania, Approved Standard M 31-A19 (11).
- Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F., & Haesebrouck, F. (2003). *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of fish diseases*, 26(10), 563-574.
- Onuk, E.E., Çiftçi, A., Fındık, A., Çiftçi, G., Altun, S., Balta, F., Özer, S., & Çoban, A.Y. (2011). Phenotypic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in Turkey. *Berliner und münchener tierärztliche wochenschrift*, 124 (7-8), 320-328.
- Ostland, V. E., McGrogan, D. G., & Ferguson, H. W. (1997). Cephalic osteochondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with *Flexibacter psychrophilus*. *Journal of fish diseases*, 20(6), 443-451.
- Özcan, M., Sarıyüpoğlu, M. (2013). Elazığ ilindeki bazı alabalık işletmelerinde izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un antibakteriyel duyarlılıklarının incelenmesi. *Yunus araştırma bülteni*, 2, 11-19
- Rangdale, R.E. & Way, K. (1995). Rapid identification of *C. psychrophila* from infected spleen tissue using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Bulletin european association of fish pathologists*, 15, 213-216.
- Ravelo, C., Magarinos, B., López-Romalde, S., Toranzo, A. E., & Romalde, J. L. (2003). Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of clinical microbiology*, 41(2), 751-756.
- Rochat, T., Fujiwara-Nagata, E., Calvez, S., Dalsgaard, I., Madsen, L., Calteau, A., Lunazzi, A., Nicolas, P., Wiklund, T., Bernarde, J.F., & Duchaud, E. (2017). Genomic

- characterization of *Flavobacterium psychrophilum* serotypes and development of a multiplex PCR-based serotyping scheme. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1752.
- Romalde, J. L., Magariños, B., Villar, C., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1999). Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA. *FEMS microbiology letters*, 179(2), 297-304.
- Valdebenito, S., & Avendaño-Herrera, R. (2009). Phenotypic, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. *Journal of fish diseases*, 32(4), 321-333.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 19(24), 6823-6831.
- Wiklund, T., Madsen, L., Bruun, M. S., & Dalsgaard, I. (2000). Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 299-307.