

Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Çiftliklerinde *Yersinia ruckeri*'nin Portörlük Yönünden Tetkiki ve Antimikrobiyal Direncin Tespiti

Fikri Balta^{1*} Zeynep Dengiz Balta¹ Osman Birol Özgümüş² Haşmet Çağırğan³

¹Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Rize, Türkiye

²Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Rize, Türkiye

³Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Bornova, İzmir, Türkiye

Öz: Bu çalışmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde kültürü yapılan gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde hastalıklı balıklardan izole edilen *Yersinia ruckeri*'nin varlığı araştırılmıştır. Hastalık semptomları gösteren balıkların dalak ve böbreklerinden sağlanan örneklerin çoğaltım besi yerlerine ekimleri yapılmıştır. Bu besiyerleri soğutmalı inkübatörde 20±1°C'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe edilen bakteri izolatlarda hareket muayenesi, katalaz, oksidaz ve OF besi yerinde oksidatif/fermentasyon testleri yapılmıştır. Bu test sonuçlarına göre API 20E test kiti kullanılarak suşlar biyokimyasal olarak tanımlanmıştır. Kaynatma DNA örnekleri kullanılarak *Y. ruckeri* izolatları polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile doğrulanmıştır. Ayrıca, *Y. ruckeri* Tip 1 antikoruna yapılan aglütinasyon testine göre serotip O1 olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik hassasiyet testleri yapılmıştır. *Y. ruckeri* izolatların %97.5'i ampisilin'e ve %62.8'i oksitetrasiklin'e karşı dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmayla bölgemizdeki kontamine balık çiftlikleri tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Gökkuşluğu alabalığı, *Yersinia ruckeri*, API 20E, PZR, Serotip 1, Antimikrobiyal direnç

The Antimicrobial resistance and investigation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in the Eastern Black Sea Region

Abstract: In this study, the presence of *Yersinia ruckeri* isolated from diseased rainbow trout in aquaculture in Eastern Black Sea region was investigated. Specimens from spleens and kidneys obtained from the fishes representing symptoms were inoculated in growth media. This media were incubated in the cooled incubator at 20±1°C for 48 hours. Motility, catalase, oxidase and oxidative/fermentative tests were performed to the bacterial isolates incubated. According to these test results, strains were biochemically identified by using API 20E Kit. *Y. ruckeri* strains were confirmed by polymerase chain reaction (PCR) applied to boiled DNA preparations. Moreover, Serotype 1 isolates were identified by agglutination test in which *Y. ruckeri* type O1 antiserum was used. Antibiotic sensitivity test was performed. *Y. ruckeri* isolates were showed high level resistance 97.5% to ampicillin and 62.8% to oxytetracycline. This study detected the contaminated fish farms in this region.

Keywords: Rainbow trout, *Yersinia ruckeri*, API 20E, PCR, Serotype 1, Antimicrobial resistance

GİRİŞ

Enterobacteriaceae familyasına bir üyesi olan, Gram negatif bir bakteri olan *Yersinia ruckeri*, özellikle salmonid balıklarda subakut, akut veya kronik septisemi ile seyreden bulaşıcı bir hastalığı olarak ilk kez 1955 bildirilmiştir. *Y. ruckeri* kültürü yapılan gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) ve Atlantik salmonlarda (*Salmo salar L.*) yüksek oranda mortaliteye ve önemli ekonomik kayıplara neden olan fırsatçı bir patojen olduğu rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Petrie ve ark., 1996). Hastalığa, ilk görüldüğü vadinin ismi olan "Hagerman Redmouth" adı verilmiş ise de 1975'te Amerikan Balıkçılar Birliği'nin Balık Sağlığı Bölümü tarafından hastalığın adı "Enteric Redmouth" (ERM) veya Yersiniozis olarak değiştirilmiştir. Yersiniozis etkeni olan *Y. ruckeri*, hem tatlı suda hem de tuzlu suda yetiştirilen yapılan alabalıklardan izole edildiği bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Furones ve ark., 1993; Austin ve Austin, 1999). Yersiniozis genelde alabalıkların bir hastalığı olarak kabul edilmesine rağmen kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*), mersin balığı (*Acipenser baeri*) ve sazan balıkları (*Carassius auratus*)'nda da hastalık meydana getirdiği bildirilmiştir (McArdle ve Dooley-Martin, 1985; Vuillaume ve ark., 1987; Danley ve ark., 1999). Hastalık ilk kez 1950'li yıllarda Amerika Bileşik Devletlerinin Idaho eyaletinin Hagerman Vadisinden rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Austin ve Austin, 1999). Hastalık etkeni bu güne kadar Avustralya (Bullock ve ark., 1978), Kanada (Stevenson ve Daly, 1982), İngiltere (Roberts, 1983), Fransa (Lesel ve ark., 1983), Danimarka (Dalsgaard ve ark., 1984), İtalya (Giorgetti ve ark., 1985), Yunanistan (Savvidis, 1990) ve İran (Roozbahani ve ark., 2009)

gibi bir çok ülkeye yayıldığı ve büyük ekonomik kayıplara neden olmasından dolayı önemli bir sorun haline geldiği bildirilmiştir.

Yersiniozis vakasına ülkemizde ilk kez 1991 yılında gökkuşluğu alabalıklarında rastlandığı rapor edilmiştir. Ege Bölgesindeki (Çağırğan ve Yürekli Türk, 1991) ve Marmara Bölgesindeki (Timur ve Timur, 1991) gökkuşluğu alabalığı çiftliklerinden etkenin hastalıklı balıklardan izole edildiği bildirilmiştir. Doğu Karadeniz Bölgesinde karasal havuzlarda ve kış aylarında ise denizde yüzer ağ kafeslerde kültürü yapılan gökkuşluğu alabalıklarında hastalık ilk kez 1996-2004 yılları arasında yapılan çalışmalarda tespit edildiği bildirilmiştir (Balta ve ark., 2005). Son yıllarda balık hastalıklarının hızlı tanısında geleneksel klasik yöntemler yerine lam aglütinasyon, geleneksel testler API 20E ve PZR gibi testler birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Maugeri ve ark., 1983; Balta ve ark., 2005; Popovic ve ark., 2007; Altun ve ark., 2010; Balta ve ark., 2010; Balta, 2016; Balta ve Dengiz Balta, 2016).

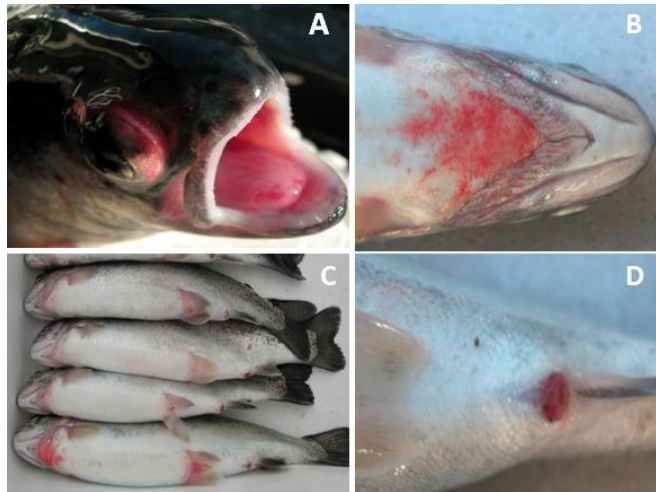
Bu çalışmada, 2004-2010 yılları arasında Doğu Karadeniz Bölgesindeki 7 farklı il, Erzurum, Gürcistan ve Ermenistan'dan tatlı ve acı suda kültürü yapılan gökkuşluğu alabalıklarında görülen yersiniozis vakalarından getirilen balık örneklerinden izole edilen bakteriler araştırılmıştır. Hastalığın teşhisinde, hastalık balıkların görülen klinik ve otopsi bulguların belirlenmesi, hastalık etkeninin adı besiyerinde üretilmesi ve differensiyel besi yerinde saflaştırılması, API 20E test kiti ile identifikasyonu gerçekleştirilmesi, PZR testiyle doğrulanması, ve lam aglütinasyon testi ile serotip 1 olan suşların belirlenmesi ile hastalığın tanısı konulmuş ve portör olan çiftliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca,

izole edilen etkenlere karşı antibiyogram testleri yapılarak hastalığın tedavisinde etkili antimikrobiyel ajanlarda belirlenmiştir.

METERYAL ve METOT

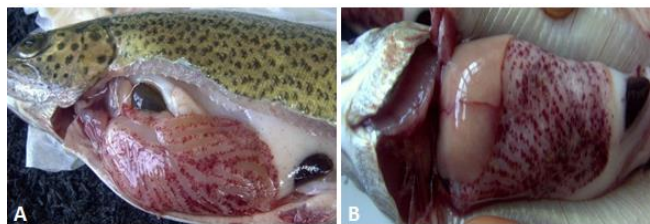
Balık Materyali: Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Anabilim Dalı Laboratuvarına 2009-2012 tarihleri arasında Rize, Trabzon, Artvin, Gümüşhane, Giresun, Ordu illerindeki, Doğu Karadeniz'e komşu illerden (Erzurum 4 ve Erzincan 1) ve komşu ülkelerden (Gürcistan 2 ve Ermenistan'dan 1) beton havuzlarda, baraj gölleri ve Doğu Karadeniz'deki yüzer ağ kafeslerde kültürü yapılan toplam 57 adet gökkuşluğu alabalık çiftliklerinden getirilen ve saha çalışmalarında her boy hastalıklı alabalıklardan yaklaşık 570 adet balık numunesi incelenmiştir.

Klinik Bulgular: Hastalıklı balıkların muayenesinde ağızda ve ağız çevresinde, boğazın alt kısmında kanama, özellikle pektoral ve pelvik yüzgeçlerin kaidesinde kanama, renkte kararma, gözlerde bilateral ekzoftalmus, bazen gözde kanama, anüste prolapsus ve karında asitese bağlı şişlik tespit edilmiştir. Hastalıklı balıklarda görülen tipik dış semptomlar Şekil 1'de verilmiştir. Doğu Karadeniz Bölgesindeki çiftliklerde görülen hastalık vakalarının saha çalışmalarında hastalığa yakalanmış balıkların iştahsızlık nedeni ile yem alımında güçlükle olduğu, havuzun kenarlarında, su çıkışına yakın yerlerde, suyun durgun olduğu yerlerde ve su yüzeyinde halsiz bir şekilde yüzdükleri görülmüştür. Bazı üreticilerin asemptomatik olarak seyreden subakut veya akut vakalarda şiddetli ölümlerden dolayı balıkların zehirlenmiş olduğu kanısı ile yapılan müracaatlarda ve 8°C'deki su sıcaklığın ölçüldüğü bir gökkuşluğu alabalığı çiftliğindeki 100-120 gr'lık balıklarda %30'luk bir mortalite ile seyreden bir hastalık vakasında herhangi bir dış belirti göstermeksizin öldüğü belirlenmiştir. Bu balıkların yapılan otopsilerinde ağız içinde kanamalar, karaciğerin solgun olduğu ve özellikle pilorik seka üzerinde peteşiyal (noktavari) kanamaların varlığı tespit edilmiş ve iç organlara ait otopsi bulguları Şekil 2'de gösterilmiştir. Balıkların midesinin odun, taş gibi yabancı maddeler çıkmasına karşın genelde boş olduğu, bağırsak sarı-sulu bir içerikle dolu olduğu ve anüse yakın olan son kısmının kızarıklık olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 1. Deride kararma, gözde ve ağızda kanama, gözde ekzoftalmus (A), boğazda kanama (B) Boğaz altında ve pelvik yüzgeç kaidesinde kanama (C), anüste prolapsus (D) (Orijinal).

Figure 1. Darkening on the skin, exophthalmos and bleeding in the eye, bleeding in the mouth (A), bleeding at the base of pelvic fin and under the throat (C), prolapsed anus (D) (Original).



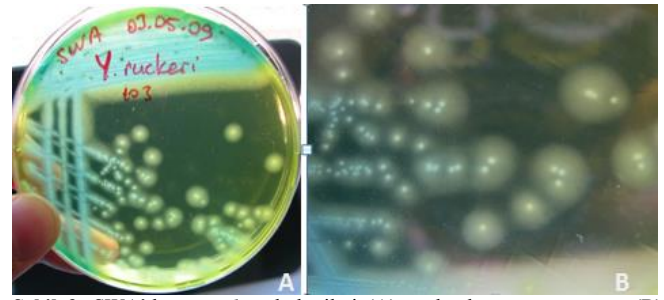
Şekil 2. Asemptomatik (A), karaciğer solgun (B), pilorik sekalarda peteşiyal kanama (A,B) (Orijinal)

Figure 2. Asymptomatic (A), pale liver (B), petechial hemorrhage in the pyloric caecae (A,B) (Original).

Etkenin İzolasyonu: Tipik hastalık semptomları gösteren balıkların böbrek ve dalaklarından Tryptone Soy Agar (TSA, Merck) ve Broth (TSB, Merck) ekimler yapılarak 20±1°C'deki soğutmalı inkübatörde 24-48 saatlik inkübasyondan sonra bakteri kolonilerin oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca sağlıklı balıkların özellikle bağırsak içeriğinden SWA'a

ekimler yapılmıştır. İzole edilen bakteriler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere steril % 20 gliserol içeren 1,5'lik ependorf tüplerde -20°C'de derin dondurucuda stoklanmıştır.

Etkenin İdentifikasyonu: Derin dondurucuda stoklanan 250 suş çıkarılıp normal TSA ve TSB'ye steril koşullar altında ekilmiş ve 20±1°C'de soğutmalı inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bazı suşların kontamine olduğu da tespit edilmiştir. Kontamine olan suşları saflaştırmak için Shotss-Waltman Agar (SWA) kullanılmıştır. Kısaca, SWA; % 0.2 tripton, % 0.2 yeast ekstrakt, % 1 tween 80, % 0.5 sodyum klorür, % 0.01 kalsiyum klorür hidrat, % 0.0003 brom timol mavisi, % 1.5 agar, pH 7.4 ayarlayıp 121°C'de otoklavda 15 dakika steril edilen ve 50°C'ye kadar soğutulan besiyerine 0.5 g/ml sukroz içeren 10 ml solüsyon 0,22 µm membran filter ile steril edilerek ilave edilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Austin ve Austin, 1989; Altun ve ark., 2010). Kontaminasyon kontrolü için besiyerleri 37°C'de 2 gün etüvde bekletilmiştir. Kontaminasyon riskine karşı her seferinde 100 ml SWA besiyeri hazırlanmıştır. SWA'da üreyen, 5 mm çapında ve buzlu cam manzarası görünümündeki tipik *Y. ruckeri* kolonileri seçilerek tekrar TSB'ye ekilmiştir. Kontamine suşlardan tamamen saf kültürler elde edilmiştir. Saf kültürler % 20 gliserol içeren 1,5'lik ependorf tüplere ilave edilip -20°C'deki derin dondurucuda stoklanmıştır. *Y. ruckeri*'nin SWA'daki oluşturduğu buz manzaralı görünümü Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 3. SWA'da *Y. ruckeri* kolonileri (A) ve buzlu cam manzarası (B) (Orijinal).

Figure 3. Colonies (A) and surrounded by a zone of hydrolysis (B) of *Y. ruckeri* in SWA (Original).

Klasik mikrobiyolojik test olarak hareket muayenesi, Gram boyama, katalaz, oksidaz testi, 20 ve 37°C üreme testleri yapılmıştır. Katalaz testi, TSA'da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden steril bir Pasteur pipeti ile alınıp lam üzerindeki bir damla % 3 H₂O₂ ile karıştırılmasıyla, oksidaz testi ise para-aminodimethylalanine monohydrochloride maddesi emdirilen filtre kağıdı üzerine saf kolonilerden Pasteur pipetiyle sürülmek suretiyle yapılmıştır. Hareketli, Gr (-), kokobasil şeklinde, katalaz (+), oksidaz (-) ve OF besi yerinde oksidatif/fermentatif test sonucu göre fermentatif olan tüm suşların biyokimyasal testleri API 20E (Biomerieux) test kiti kullanılarak yapılmıştır (Austin ve Austin, 1999; Santos ve ark., 1993; Balta ve ark., 2005; Altun ve ark., 2010; Balta ve ark., 2010). TSA besiyerinde üreyen 24 saatlik saf 3-5 bakteri kolonilerinden alınan örnekler steril % 0,9 NaCl içeren saf suda vorteks yardımıyla homojenize edilmiştir. Bu süspansiyon steril Pasteur pipeti ile API 20E test kitindeki kuyucuklara prosedüre uygun olarak doldurulmuş ve 25±1°C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra teste ait ayrılarak dökülerek sonuçlar değerlendirilmiştir. *Y. ruckeri* suşlarına ait API 20E test sonuçlarına ait fenotipik özelliklerin görünümü Şekil 4'de verilmiştir.

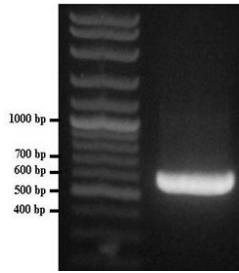


Şekil 4. API 20E test kiti ayrıları damlatılmadan önce (A) ve damlatıldıktan sonra (B) (Orijinal).

Figure 4. Before dropping into the API 20E test kit reagents(A), and after dropping (B) (Original).

Polimeraz zincir reaksiyonları için kullanılacak kalıp DNA izolasyonları için her bir bakteri suşları 3 mL Luria Bertani (LB, % 1 tripton, % 0,5 maya ekstraktı % 0,5 NaCl, pH 7,4) sıvı besi yerine inoküle edilmiş ve 24 saat 37°C'de sallayıcı inkübatörde üretilmiştir (Balta ve ark., 2010). Bu kültürden 1,5 ml'lik steril ependorf tüplere 1 ml alınmış ve 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjde çöktürülmüştür. Üstte kalan sıvı kısım dökülmüştür. Ependorf tüpün dip kısmında kalan bakteri üzerine steril 500 µL saf su ilave edilip, vorteks yardımıyla homojen dağılım sağlandıktan sonra kaynayan su içerisinde 10-12 dakika kadar tutularak bakteri DNA'sının çıkarmak için hücre duvarını patlatılmıştır. Tüpler 5 dakika soğutulup 13.000 rpm'de 10 dakika santrafütüj edildikten sonra üstteki sıvı

kısım (DNA) steril ependorf tüplere alınmıştır. Üst kısımları 1 µL'si PZR'da kalıp DNA kaynağı olarak kullanılmıştır. Çalışılmak üzere -20°C'de derin dondurucuda stoklanmıştır. *Y. ruckeri*'lerin tanımlanmasında 16S rRNA geninden yararlanılmıştır. Bu amaçla sadece *Y. ruckeri*'nin 16S rRNA geninin 573 baz çift kısmının PZR'da çoğaltılmasını sağlayan primerler (Yer3, F 5'-CGAGGAGGAAGGGTTAAGT-3' ve Yer4, R 5'-AAGGCACCAAGGCATCTCT-3') kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Balta ve ark., 2010). Bu primerler ile daha önce derin dondurucuda stoklanan bakteri suşlarına ait DNA'ları hızlı ve güvenilir bir şekilde taranıp *Y. ruckeri* olan suşlar belirlenmiştir. PZR reaksiyon 50 µl hacimde 1X polimeraz tamponu, 200 µl her bir dNTP, 3 mM MgCl₂, 1,5 U *Taq* DNA polimeraz, 1 µM her bir primer ve 100 ng bakteriyel genomik DNA kullanılmıştır. Reaksiyon toplam 35 döngü; 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyon ve sonrasında toplam 35 döngü, 94°C 40 saniye, 55°C 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Son sentez 72°C'de 5 dakika olarak yapılmıştır (Cerro ve ark., 2002). 10 µl PZR ürünü %1,5'lik agaroz jelde 100 baz çiftlik DNA marker ile yürütülerek görüntülenmiş ve 573 baz çifti PZR ürününün gözlemlendiği bakteri örnekleri pozitif olarak değerlendirilmiş ve *Y. ruckeri*'nin agaroz jelde yürütülen görüntüsü Şekil 5'de verilmiştir.



Şekil 5. *Yersinia ruckeri*'nin 16S rRNA'sını kodlayan genin ampliconu M, 100bp DNA Ladder (Promega, ABD) 573bp çift.

Figure 5. Coding gene amplification for 16S rRNA of *Yersinia ruckeri* (573bp), lambda DNA 100-bp molecular size marker (Promega, USA).

Ayrıca PZR testi sonucu pozitif olan suşlar, *Y. ruckeri* Tip I antikoruna ile lam aglütinasyon testine tabi tutulmuştur (Çağırman ve Tanrikul, 1998; Balta ve ark., 2010). Kısaca, temiz bir lam üzerine öze yardımıyla bir damla FTS (% 0,85 NaCl) konulup bakteri ile homojen hale getirildikten sonra kenarına bir damla tavşanda elde edilmiş *Y. ruckeri* Tip I antikoruna ilave edilerek karıştırılmıştır. Antijen-antikor reaksiyonu sonucunda kar taneleri gibi çökeltinin oluşması pozitif olarak değerlendirilmiş ve lam aglütinasyon pozitif test sonucu ışık mikroskopunun ışık kaynağı üzerine konularak dijital fotoğraf makinesi (Nikon E5000) ile görüntülenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. *Y. ruckeri* Tip I antikoruna kullanarak suşların lam aglütinasyon testi pozitif sonucu (Orijinal).

Figure 6. *Y. ruckeri* strains of type I antibody-positive result using the slide agglutination test (Original)

Antimikrobiyel Hassasiyet Testi: Antimikrobiyel hassasiyet deneyleri *Clinical and Laboratory Standards Institute* ölçütlerine uygun olarak standart disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır (CLSI, 2003). *Y. ruckeri* suşlarının 22°C'de TSA'da üretilen 24 saatlik kültürleri steril izotonik tuzlu suda McFarland No: 0,5 bulanıklığına ayarlanmıştır. Etüvde 37°C'de nemi alınmış Mueller Hinton Agar (MHA) üzerine vorteks yardımı ile homojenize edilen örnekler dökülmüştür. Antibiyotik diskleri (Oxoid, UK) sırasıyla, oksitetrasiklin, oksalinik asit, sulfametoksazol, ampisilin, florfenikol, streptomisin, enrofloksasin, trimetoprim+sulfametoksazol disk dağıtıcı yardımı ile besiyeri üzerine yerleştirilmiştir. MHA 20°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Antimikrobiyel hassasiyet testi için *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suş olarak kullanılmıştır. Antibiyotik disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları dijital kompas yardımıyla ölçülmüş ve sonuçlar *Clinical and Laboratory Standards Institute* tarafından tarif edilen Gram negatif ve *Enterobacteriaceae* familyası için akuakültürde kullanılan veteriner ilaç rehberindeki antibiyotik standart inhibisyon zon çapları ile oluşturulan verilere göre (Tablo1) değerlendirilip yorumlanmıştır (CLSI, 2003; CLSI, 2004).

Tablo 1. Bu çalışmada kullanılan antimikrobiyellerin disk konsantrasyonları ve inhibisyon zon çaplarına göre duyarlılık aralıkları.

Table 1. Antimicrobial susceptibility test disc content of antimicrobials and breakpoints used in the study.

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

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)

BULGULAR

Bu çalışmada hastalıklı balıklardan izole edilen bakteri suşlarının SWA'da üreyen kolonileri etrafında buzlu cam görünümünün oluşması tween 80'i hidrolize ettiğini, API 20E ve PZR reaksiyon sonuçlarına göre 75 adet suşun *Y. ruckeri* olduğu belirlenmiştir. Lam aglütinasyon test sonuçlarına göre de bütün izolatlarının *Y. ruckeri* Tip O1 olduğu belirlenmiştir. Test sonuçlarına göre Rize ilindeki 18, Trabzon ilindeki 16, Gümüşhane 8, Artvin 5, Erzurum 4, Giresun, Erzincan ve Ordu illerindeki 1'er, ayrıca Gürcistan'daki 2 ve Ermenistan'daki 1 olmak üzere 57 adet gökkuşağı alabalık üretim çiftliğinin kontamine olduğu tespit edilmiştir.

Y. ruckeri suşlarının 48 saat inkübasyondan sonra TSA besi yerinde meydana getirdiği saf kolonilerden yapılan hareket muayenesinde etkenin hareketli, Gram negatif ve koko-basil şeklinde olduğu, oksidaz negatif olmasına karşın katalaz pozitif olduğu ve OF besi yerinde yapılan oksitatif/fermantatif test sonucuna göre etkenin fermentatif olduğu tespit edilmiştir. API 20E test kitine inoküle edilen suşların 48 saatlik sonunda biyokimyasal test sonuçları referans testlere göre değerlendirilmiştir (Petrie ve ark., 1996; Austin ve Austin, 1999). Hastalıklı gökkuşağı alabalıklarının böbrek ve dalaklarından izole edilen *Y. ruckeri* suşlarının biyokimyasal, morfolojik özellikleri ve API 20E testine ait sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir.

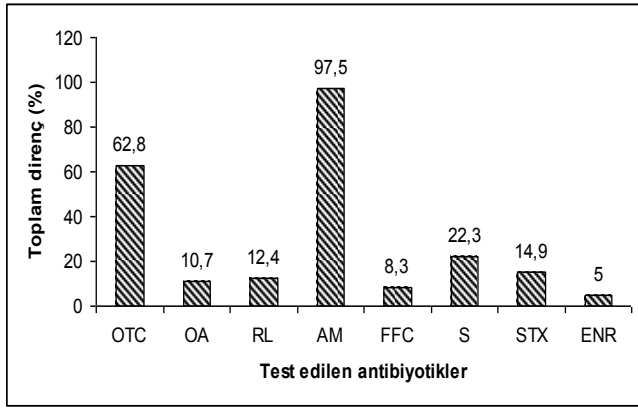
Tablo 2: Gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *Yersinia ruckeri* izolatlarının biyokimyasal, morfolojik özellikleri ve API 20E test sonuçları.

Table 2: Biochemical, morphological characteristics and API 20E results of *Yersinia ruckeri* isolated from rainbow trout.

Testler	<i>Y. ruckeri</i> suşları	Testler	<i>Y. ruckeri</i> suşları
H (20°C)	(+75)	URE	(-75)
H (37°C)	(-75)	TDA	(-75)
Gr	(-75)	IND	(-75)
O	(-75)	VP	(+75)
K	(+75)	GEL	(+75)
TSI	(+75)	GLU*	(+75)
OF	(F)75	MAN*	(+75)
SWA	(+75)	INO*	(-75)
ONPG	(+75)	SOR*	(-75)
ADH	(-75)	RHA*	(-75)
LDC	(+75)	SAC*	(-75)
ODC	(+75)	MEL*	(-75)
CIT	(+75)	AYM*	(-75)
H ₂ S	(-75)	ARA*	(-75)

H: Hareket, Gr: Gram boyama, O: oksidaz, K: Katalaz, TSI: Triple şeker iron agarda üreme, OF: Oksidasyon/Fermentatif, SWA: Shotts-Waltman agarda üreme, ONPG: β-Galaktosidaz, ADH: Arjinin dehidrolaz, LDC: Lizin dekarboksilaz, ODC: Ornitin dekarboksilaz, CIT: Sitrat kullanımı, H₂S: Hidrojen sülfür, URE: Üreaz, TDA: Triptofan deaminaz, IND: Indol, VP: Voges-Proskauer, *Karbonhidratlardan asit oluşum Testleri; GLU: Glukoz, MAN: Manitol, INO: İnositol, SOR: Sorbitol, RHA: Ramnoz, SAC: Sükröz, MEL: Melibiyoz, AYM: Amigdalın, ARA: Arabinol.

Disk difüzyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyel test sonuçlarına göre *Y. ruckeri* suşlarına ait en yüksek direnç %97,5 ile ampisiline karşı tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla, oksitetrasiklin %62,8, daha az oranda streptomisin %22,3, trimetoprim+sulfametoksazol %14,9, sulfametoksazol %12,4, oksolinik asit %10,7, florfenikol %8,3 ve enrofloksasin %5 olarak tespit edilmiştir. *Y. ruckeri* izolatlarına ait antibiyotiklere karşı oluşan toplam direnç miktarı Şekil 8'de grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 8. *Yersinia ruckeri* izolatlarının antibiyotik direnç sıklığı.

OTC: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik asit, RL: Sulfametoksazol, AM: Ampisilin, FFC: Florfenikol, S: Streptomisin, STX: Trimetoprim+Sulfametoksazol, ENR: Enrofloxasin.

Figure 8. The frequency of antibiotic resistance in isolates of *Y. ruckeri*. OTC: Oxytetracycline, OA: Oxolinic acid, RL: Sulfamethoxazole, AM: Ampicillin, FFC: Florfenicol, S: Streptomycin, STX: Trimethoprim+Sulfamethoxazole, ENR: Enrofloxacin.

TARTIŞMA ve SONUÇ

ERM hastalığı yaklaşık 7,5 cm uzunluğundaki gökkuşuğu alabalıklarını en çok etkilediği, 15-18°C'deki su sıcaklığında pik yaptığı ve 10°C'ye düştüğünde ise enfeksiyonun şiddetinin azaldığı bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987). Bu çalışmada ölçülen su sıcaklığı diğer çalışmalarla paralellik göstermesine karşın birkaç vakada 10°C'nin altında (8°C) hiçbir semptom göstermesizin balıklarda %30 ve hatta 3-4 gün içinde %90'lara varan ölümler tespit edilmiştir. Klinik olarak sağlıklı görünen balıklar *Y. ruckeri* taşıyıcısı olabileceği, sonradan stres durumunda çok sayıda bakteriyi dış ortama bıraktığı ve böylece diğer balıklara enfeksiyonun bulaştırdığı bildirilmiştir (LeJeune ve Rurangirwa, 2000).

API 20E test sonuçlarına göre *Y. ruckeri* suşlarının; β-galaktosidaz, lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksidaz, sitrat kullanımı, H₂S, üreaz, triptofan deamiraz, indol, voges-proskauer, jelatinaz, glukoz, manitol, inositol, sorbitol, rannoz, sükröz, melibiyoz, amigdalin, arabinoz test sonuçları Petrie ve ark., (1996) API 20E test sonuçları ile arjinin hidroliz testi hariç ile benzerlik gösterirken, Austin ve Austin (1999), tarafından bildirilen test sonuçları voges-proskauer testinin negatif olması hariç diğer API 20E test sonuçlarının aynı olması paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Y. ruckeri antiserumunun balıklardan izole edilen diğer bakteriler ile ilişkili antijenik çapraz reaksiyon gösterebileceği rapor edilmiştir (LeJeune ve Rurangirwa, 2000). Bu çalışmada izole edilen bakterilerle yapılan lam aglütinasyon test sonuçlarına göre suşların hepsinin serotip O1 olduğu tespit edilmiştir.

Balık patojenlerinin identifikasyonunda kullanılan API 20E kitleri hatalı sonuçlar verebildiği ve *Y. ruckeri* ile *Hafnia alvei*'nin karıştırdığı bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Popovic ve ark., 2007; Altun ve ark., 2010). *Y. ruckeri* suşlarının 37°C'de üretildiğinde hareketsiz, β-galaktosidaz ve jelatin hidroliz testleri pozitif, rannoz ve arabinoz testleri negatif sonuç vermesine karşın, *H. alvei* suşlarının ise 37°C'de üretildiğinde hareketli, β-galaktosidaz ve jelatin hidroliz testi negatif, rannoz ve arabinoz testi pozitif sonuç vermesi ile birbirinden ayırdığı bildirilmektedir (Santos ve ark., 1993; Austin ve Austin, 1999; Altun ve ark., 2010). *Y. ruckeri* selektif besi yerleri olan SWA oluşturdıkları özel buzlu cam koloni morfolojisi ile diğer bakterilerden kolayca ayırt edilebilmektedir (Altun ve ark., 2010). Bu çalışmada kullanılan bütün izolatlarının 20°C'de hareketli, 37°C'de hareketsiz olması ve SWA'da buzlu cam koloni morfolojisine sahip olması ile *Y. ruckeri* olduğu tespit edilmiş, fakat farklı araştırmacılar bazı *Y. ruckeri* suşlarının tween 80 hidrolize etmediği bildirilmiştir (Bullock ve ark., 1978; Çağırğan ve Yürekli, 1991; Austin ve Austin, 1999; Altun ve ark., 2010). Ayrıca, Lam aglütinasyon test sonuçlarına göre izolatların hepsi serotip O1 olduğu belirlenmiştir. PZR ürünlerinin %1,5'lik agaroz jelde 100 baz çiftlik DNA marker ile yürütülerek sonuçlar karşılaştırıldığında 573 baz çifti PZR ürününün gözlemlendiği bakteriler örnekleri *Yersinia ruckeri* olarak kabul edilmiştir.

Bu çalışmada antimikrobiyel hassasiyet test sonuçlarına göre izole edilen *Y. ruckeri* suşların en yüksek direnç %97,5 ile ampisilin'e, fakat yersiniozis vakalarında en sık kullanılan antibiyotiklerden oksitetrasiklin'e karşı %62,8 ve Trimetoprim+Sulfametoksazol kombinasyon'a karşı %14,9 direnç şekillendiği tespit edilmiştir. Ege bölgesinde görülen yersiniozis vakalarından izole edilen 20 farklı *Y. ruckeri*

suşunun %90'ı oksitetrasiklin'e, %80'i nitrofurantoin'e, %75'i streptomisin'e, %75'i eritromisin'e, %70'i ampisilin'e, %35'i norfloksasin'e, %30'u kloramfenikol'e dirençli bulunmuştur (Çağırğan, 1995). Başka bir çalışmada *Y. ruckeri* suşları ile yapılan antibiyogram rapet sonuçlarına göre sefalosporin, mezosillin, Trimetoprim+sulfametoksazol ve gentamisine duyarlı, linkomisin, eritromisin, streptomisin, rifamisin, nitrofurantoin'e karşı dirençli oldukları bildirilmiştir. Oksitetrasiklin'e ise bazı suşların duyarlı bazı suşların ise direnç geliştirmiş oldukları rapor edilmiştir (Diler ve Altun, 1997). Farklı bir çalışmada 12 adet *Y. ruckeri* suşu üzerine yapılan antimikrobiyel test sonuçlarına göre oksitetrasiklin'e, eritromisin'e ve ampisilin'e dirençli iken, kloramfenikol ve norfloksasin'e karşı duyarlı oldukları, trimetoprim+sulfametoksazol'e, nitrofurantoin ve gentamisin'e karşı ise bazı suşların direnç kazandıklarını bildirmişlerdir (Diler ve ark., 2000). Amerika'da yapılan bir çalışmada *Y. ruckeri* suşlarının oksalinik asit, oksitetrasiklin ve güçlendirilmiş sulfonamidlere karşı duyarlılığını azaldığı rapor edilmiştir (Rodgers, 2001). R plazmidlerinin varlığının *Y. ruckeri*'de belirlenmiş olması bazı antibiyotiklere karşı zamanla hassasiyetinin azalabileceğini ileri sürülmektedir (Austin ve Austin, 1999). Başka bir çalışmada 23 antimikrobiyel ajanın hassasiyet testi sonucuna göre 50 suştan ikisinin tetrasiklinler ve sulfonamidlere direnç belirlenmiş ve bu suşların 36 megadalton plazmid taşıdığı, *Escherichia coli* ve *Y. ruckeri* alıcılarının her ikisine de transfer olabildiği gösterilmiştir (De Grandis ve Stevenson, 1985).

Yersiniozis'e karşı korumada beslenmenin etkisinin önemli olduğu, özellikle yemlere vitamin C ve E ilave edilmesi immun sistemi güçlendirdiği, kontamine çiftliklerdeki 2-4 gr üzerindeki balıkların farklı yöntemler kullanılarak aşılınması ölümleri büyük ölçüde düşürdüğü yapılan çalışmalarla ortaya konulduğu bildirilmiştir (Çağırğan, 1995). Bölgemizde kontamine çiftliklerde üretilen 4-5 gr ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıkların yerli otovaksin aşılar ile aşılınması sonucu elde edilen başarı, üreticilerin her yıl periyodik olarak balıkların aşılatma isteği korumada kullanılan aşıların etkili olduğunu ve aşılamanın önemini anlaşıldığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmanın sonucunda Doğu Karadeniz Bölgesindeki alabalık çiftliklerinin *Y. ruckeri* ile kontamine olduğu ve etkenin antimikrobiyel maddelere karşı farklı düzeylerde direnç geliştirdiği gösterilmiştir. Bu durum, hastalık görülen işletmelerde karantina tedbirlerinin uygulanmadığını, balık nakilleri esnasında düzenlenen balık sağlık şartnamesinin balıkların portülük yönünden kontrolü yapılmadan düzenlenmesinden dolayı portör balıklarla etkenin tüm bölgeye yayıldığı düşünülmektedir. Yersiniozis'in sağaltımında antibiyotik kullanımı rezidü ve bakteriyel direnç problemlerine neden olduğundan, insan ve çevre sağlığı açısından aşı kullanımı faydalı olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bölgemizdeki 8 farklı ilde gökkuşuğu alabalık işletmelerinden izole edilmiş olan *Y. ruckeri* suşlarının fenotipik ve lam aglütinasyon test sonuçlarına göre çalışılan 75 adet *Y. ruckeri* suşlarının hepsinin benzer olduğu tespit edilmiştir. API 20E test kitiyle yapılan test sonuçlarının api web sisteminde olmaması nedeni ile teşhiste hatalı sonuçlarının önüne geçmek için klasik metotlarla mukayesenin yanı sıra, PZR testi ile doğrulanmasının yararlı olacağı tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Altun S., Kubilay A. ve Diler Ö., (2010). *Yersinia ruckeri* suşlarının fenotipik ve serolojik özelliklerinin incelenmesi. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **16** (Suppl-B), 223-229.
- Austin B. and Austin DA., (1987). *Bacterial Fish Pathogens: Disease in farmed and wild fish*. First Edition, Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, pp 364.
- Austin B. and Austin DA., (1989). *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, pp 317.
- Austin B. and Austin DA., (1999). *Bacterial fish pathogens. Diseases in farmed and wild fish*. 3rd (Revised), Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, pp 457.
- Balta F. and Dengiz Balta Z., (2016). *Vibrio* infection and treatment on the juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) transferred seawater. *Journal of Anatolian Environmental & Animal Sciences*, **1** (1), 14-20.
- 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., Çağırğan H. ve Kayış Ş., (2005). Kültürü yapılan gökkuşuğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) izole edilen *Yersinia ruckeri*'nin identifikasyonunda API 20E testinin kullanılabilirliği. *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, **3** (4), 434-437.

- Balta F., Sandalli C., Kayis S. and Ozgumus OB., (2010).** Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **30** (6), 211-219.
- Bullock GL., Stuckey HM. and Shotts EB., (1978)** Enteric redmouth bacterium: Comparison of isolates from different geographical areas. *J. Fish Dis.*, **1**, 351-354.
- Çağırğan H. and Tanrikul TT., (1998).** Testing the effectiveness of a yersinia vaccine in infected and chemically treated juvenile rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*), *J. Applied. Ichtyol.*, **14**, 239-243.
- Çağırğan H. and Yüreklitürk O., (1991).** First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout farm in Turkey. In: The fifth conference of EAFB, Disease of Fish and Shellfish. 24-29 August 1991, Book of Abstract, p 131.
- Çağırğan H., (1995).** Ege bölgesinde görülen Yersiniosis vakaları ve tedavisi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Doğu Anadolu Bölgesi II. Su Ürünleri Sempozyumu, Erzurum, 316-329.
- Cerro A., Marquez I. and Guijarro JA., (2002).** Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5177-5180.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2003).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; 8th ed., Approved standard M2-A8., CLSI, Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2004).** Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; Proposed guideline, M42-P. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Dalsgaard I., From J. and Hørlyck V., (1984).** First observation of *Yersinia ruckeri* in Denmark. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **4** (1), 10.
- Danley ML., Goodwin AE. and Killian HS., (1999).** Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*. *J. Fish Dis.*, **22**, 451-457.
- De Grandis SA. and Stevenson RMW., (1985).** Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Antimicrob Agents Chemother.*, **27** (6), 938-942.
- Diler Ö. ve Altun S., (1997).** Enterik Kızıl Ağız Hastalığının Kontrolü İçin Çeşitli *Yersinia ruckeri* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Tespiti Üzerinde Bir Araştırma. *Etlik Vet. Mik. Derg.*, **9** (1), 175-183.
- Diler Ö., Altun S., Diler A., Işıklı BI. ve Gürcan Ö., (2000).** Bazı balık çiftliklerindeki gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) mikroflorasının tespiti ve kontrolü üzerine bir araştırma. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst. Derg.*, **4** (1), 58-69.
- Furones MD., Rodgers CJ. and Munn CB., (1993).** *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, **3**, 105-125.
- Giorgetti G., Ceschia G. and Bovo G., (1985).** First isolation of *Yersinia ruckeri* in farmed rainbow trout in Italy. In: Ellis AE., (ed). Fish and Shellfish Pathology, Academic Press., London, pp 161-166.
- LeJeune JT. and Rurangirwa FR., (2000).** Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 558-561.
- Lesel R., Lesel M., Gavini F. and Vuillaume A., (1983).** Outbreak of enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in France. *J. Fish Dis.*, **6**, 385-387.
- Maugeri TL., Crisafi E., Genovese L. and Scoglio MER., (1983).** Identification of *Vibrio anguillarum* with the API 20 E system. *Microbiologica*, **1**, 73-79.
- McArdle JF. and Dooley-Martin C., (1985).** Isolation of *Y. ruckeri* tipe (*Hagerman strain*) from goldfish (*Carassius auratus*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **5**, 10-11.
- Petrie J., Bronu DW. and Hastings TS., (1996).** Isolation of *Yersinia ruckeri* from wild Atlantik salmon, *Salmo salar* L., in northern Finland. *J. Fish Dis.*, **14**, 137-140.
- 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.
- Roberts MS., (1983).** A raport of an epizootic in hatchery rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at an English trout farm, caused by *Yersinia ruckeri*. *J. Fish Dis.*, **6**, 551-552.
- Rodgers CJ., (2001).** Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents in vitro. *Aquaculture*, **196** (3), 325-345.
- Roobahani MR., Bandehpour M., Haghghi-Khiabani-Asl A., Abdollahi H. and Kazemi B., (2009).** PCR-Based detection of *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout fish. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, **4** (5), 258-262.
- Santos Y., Romalde JL., Bandmn I., Magarinos B., Nunez S., Barja JL. and Toranzo AE., (1993).** Usefulness of the API 20E system for the identification of bacterial fish pathogens, *Aquaculture*, **116**, 111-120.
- Savvidis GK., (1990).** First isolation of *Yersinia ruckeri* in farmed rainbow, *Onchorhynchus mykiss*, in Grace. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **10** (5), 131-132.
- Stevenson RMW. and Daly JG., (1982).** Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **39**, 870-876.
- Timur G. and Timur M., (1991).** An outbreak of enteric redmouth diseases rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **11** (5), 181-182.
- Vuillaume A., Brun R., Chene P., Sochon E. and Lesel R., (1987).** First isolation of *Yersinia ruckeri* from sturgeon *Acipenser baeri* Brandt, in southwest of France. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **7** (1), 18-19.

Geliş tarihi: 17.11.2016

Kabul tarihi: 01.12.2016

***Başlıca Yazar Yazışma adresi:**

Doç. Dr. Fikri BALTA

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Ana Bilim Dalı, Zihni Derin Yerleşkesi, Rize, Turkey.

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