

# Doğu Karadeniz’de yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)’ndan izole edilen *Vibrio anguillarum* suşlarının serotiplendirilmesi, genetik karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi

Fikri BALTA, Zeynep DENGİZ BALTA

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Anabilim Dalı, Rize, Türkiye.

**Özet:** Bu çalışmada, Türkiye’nin Doğu Karadeniz Bölgesi’nde kafeslerde yetiştirilen gökkuşağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)’larından izole edilen *Vibrio anguillarum* suşlarının identifikasyonu ve serotiplendirilmesi yapıldı ve antimikrobiyal direnç profilleri belirlendi. *V. anguillarum* suşlarının tanımlanmasında biyokimyasal, serolojik ve moleküler teknikler kullanıldı. Dizi analizine gönderilen suşlar GenBank veri tabanında farklı kabul numarasıyla kayıtlı olan *V. anguillarum* ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma yapılan suşlar arasında %97-99 oranında benzerlik olduğu tespit edildi. Lam aglütinasyon test sonuçlarına göre, tüm izolatların serotip O1 olduğu belirlendi. Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarına göre, izolatların sulphamethoxazole (%100), ampicilline (%90,6), eritromisine (%71,9), oksitetrasiklin (%62,5), streptomisin’e (% 46,9) ve trimetoprim+sulfametoksazol (%31,3) dirençli olduğu, fakat oksolinik asit, enrofloksasin ve florfenikole duyarlı olduğu tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Antimikrobiyal duyarlılık, gökkuşağı alabalığı, PZR, tanı, *Vibrio anguillarum*.

## Serotyping, genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *Vibrio anguillarum* strains isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the eastern Black Sea

**Summary:** Antibiotic resistance profile, serotyping and identification of *Vibrio anguillarum* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in cages in the Eastern Black Sea Region of Turkey, were performed in the study. The biochemical, serological and molecular techniques were used in identification of *V. anguillarum* isolates. The sequenced isolates were confirmed to be similar to *V. anguillarum* which stored under different accession numbers in GenBank database. The rate of 97-99% similarity were found among the compared isolates. All isolates were identified to be serotype O1 by slide agglutination test results. The antibiotic susceptibility test results showed that *V. anguillarum* isolates were resistant 100% to sulphamethoxazole, 90.6% to ampicillin, 71.9% to erythromycin, 62.5% to oxytetracycline, 46.9% to streptomycin and 31.3% to trimethoprim-sulfamethoxazole, but susceptible to oxolinic acid, enrofloxacin and florphenicol.

Keywords: Antimicrobial sensitivity, diagnostic, PCR, rainbow trout, *Vibrio anguillarum*.

### Giriş

Deniz balıklarında ilk tanımlanan ve en yaygın olarak görülen balık patojenlerinden birinin *Vibrio anguillarum* olduğu bildirilmiştir. Etken, yılan balıklarından ilk kez izole edildiğinde *Bacterium anguillarum*, Baltık denizindeki yılan balıklarından izole edildiğinde *Vibrio anguillarum* (*V. anguillarum*) olarak isimlendirilmiştir (1). *Vibrio* türleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek için 5S rRNA gen dizileri kullanarak yapılan son çalışmalar ile *Vibrio* cinsinin *Listonella* cinsine transfer edilmesi uygun görülmüştür (18). Bugün *V. anguillarum* (*L. anguillarum*) *Vibrionaceae* familyası, *Proteobacteria* grubu, *Gamma* altbölümü altında sınıflandırılan bir bakteri olarak kabul edilmektedir (2).

Vibrioları tanımlamada en güvenilir alternatif yöntemlerden birinin serotiplendirme olduğu, deniz suyundan ve hastalıklı balıklardan izole edilen *V. anguillarum*’a ait toplam 23 O-serotipi olduğu bildirilmiştir (14, 15, 21, 24). Dünyada, O1, O2 ve O3 serotiplerinin balık ölümlerinden sorumlu olduğu, en virulent serotipin O1 ve O2’nin olduğu (21), levreklerde serotip O1, alabalıklarda ise serotip O1 ve O2’nin ölümlere neden olduğu bildirilmiştir (28, 30). Ülkemizde ise balık ölümlerinden serotip O1’in sorumlu olduğu bildirilmiştir (9, 10, 25, 26, 27). API 20E sistemi, farklı ortamlarda yetiştirilen somon (*Salmo salar*), morina (*Huso huso*), pisi balığı (*Platichthys flesus*), Japon yılan balığı (*Conger myriaster*), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), ayu balığı (*Plecoglossus*

*altivelis*), levreklerde (*Dicentrarchus labrax*), çipuralarda (*Sparus aurata*), karides ve çift kabuklu hastalıklarından izole edilen bakteriyel etkenlerin tanımlanmasında birçok araştırmacı tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır (13, 19, 20, 26), fakat API Web sisteminde kayıtlı *V. anguillarum*'un olmaması nedeniyle kullanımı tartışmalıdır (22). Bu sistemin balık patojenlerinde kullanımının uygunluğu ve eksik kalan bazı konular Popovic ve ark. (22) tarafından rapor edilmiştir.

Bu araştırmada, Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki deniz kafeslerinde yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarından izole edilen 32 adet *V. anguillarum* suşlarının konvansiyel testler, API 20E test kiti ve PZR yöntemi ile identifikasyonu, lam aglütinasyon ile serotiplendirilmesi ve antibiyotik direnç profillerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

**Balık örnekleri:** Ordu, Rize ve Trabzon illerinde Karadeniz açıklarında yer alan 12 farklı gökkuşağı alabalığı deniz işletmesine ait kafes tesislerinde kış döneminde (Aralık 1999-Haziran 2014) yetiştirilmek üzere denize transfer edilen gökkuşağı alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*)'ında farklı dönemlerde hastalık olgularına rastlandı. Tipik hastalık belirtisi gösteren 100-3000 gr ağırlığındaki toplam 760 balık mikrobiyolojik yönden laboratuvarında muayene edildi. Örneklemeye dönemlerinde deniz suyuna ait su sıcaklığı, pH'sı, oksijen ve tuzluluk değerleri ölçüldü ve izole edilen bakteri suşlarına ait bilgiler Tablo 1'de verildi.

**Bakterilerin izolasyonu:** Hastalıklı balıkların dalak ve böbreklerinden tuzlu triptik soy agar (T-TSA, % 2 NaCl içeren), tuzlu triptik soy broth (T-TSB)'a, ve thiosulphate citrate bile salts sucrose agar (TCBS) besiyerlerine ekimler yapıldı ve 20±1°C'de 48 saat soğutmalı etüvde inkübasyona bırakıldı (1, 4, 10, 25). T-TSB'de üretilen saf bakteriler % 15 gliserol içeren 1 ml ependorf tüplerde -80°C'de stoklandı (10).

**Bakterilerin identifikasyonu:** Biyokimyasal testleri yapılmak üzere -80°C'den çıkarılan suşlar steril T-TSB'lere ekildi ve 20±1°C'de üretildi. Bu kültür TCBS agara ekilerek saflık kontrolü yapıldı (25, 26). TCBS agarda üreyen saf kolonilerden T-TSA'ya ekim yapılarak ekim hattı üzerine O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl-teridine phosphate salt, Sigma) vibriostatik ajan diski (10 µg ve 150 µg) yerleştirildi. Vibrio izolatların identifikasyonu için T-TSA'da üretilen saf kolonilerden sırasıyla, hareket muayenesi, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri, OF testi, kanlı agarda (% 5 koyun kanı ilaveli) hemoliz testi yapıldı. Tuza tolerans testi peptonlu besi yerlerinde (% 0 ve % 7 NaCl) yapıldı. API 20E testi (bioMerieux) steril 5 ml % 1,5 tuzlu suda McFarland 4 (bioMerieux) bulanıklığına ayarlanarak otomatik pipet yardımıyla prosedüre uygun olarak kuyucuklara ilave

edildi. API 20E test kitleri 25±1°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldı (2, 13, 22, 26).

**Lam aglütinasyon testi:** Toranzo ve ark. (29)'na göre *V. anguillarum* serotip O1'e (ATTC 43305) karşı tavşandan elde edilen poliklonal antikor kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, temiz bir lam üzerine 10 µl izotonik tuzlu su (%0,85 NaCl) otomatik pipet yardımı ile konuldu ve üzerine T-TSA'da 25±1°C'de 24 saatte üretilen saf kolonilerden öze yardımı alınarak yoğun bir süspansiyon hazırlandı. Daha sonra, bu süspansiyonun yan tarafına 10 µl *V. anguillarum* ait serotip O1 serumu ilave edildi ve öze yardımıyla karıştırıldı. Pozitif kontrol için *V. anguillarum* ATTC 43305 referans suş ve negatif kontrol için ise *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suşu kullanıldı.

**DNA eldesi ve PZR testi:** Genomik DNA izolasyonu için 2 ml T-TSB'e ekilen izolatlar 25±1°C'deki soğutmalı etüvde 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu kültürlerden 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktararak mikrosantrifüj ile bakteri hücreleri elde edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp 500 µl steril deiyonize su ilave edilerek vortex yardımıyla çözüldü ve thermo shaker'da 100°C'de 13 dk ısıtılarak hücre duvarının patlatılması sağlandı. Mikrosantrifüj yardımıyla çöktürüldü ve üst kısımdan 1-3 µl'si PZR'de kalıp DNA olarak kullanıldı (6, 11, 31, 33). Standart PZR karışımları için, 1,5 ünite *Taq* DNA polimeraz, 5 µl DNA, 10 µl 5x reaksiyon tamponu, 3 µl 1,5 mM MgCl, 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 tamamlandı (6). Amplifikasyon koşulları; 94°C'de 3 dk 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 dk ve takiben son zincir uzaması 72°C'de 5 dk olacak şekilde gerçekleştirildi (11, 31, 33). Amplifikasyon ürünleri 0,5 µg/ml ethidium bromid içeren %1,5 agaroz jelde 90 V'da 30 dk yürütüldü ve UV ışığı altında görüldü. Çalışmadaki izolatları tanımlamak için bakterilerde 16S rRNA için spesifik olan (27 F 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 1492 R 5' GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') universal primerler kullanıldı (11, 33). PZR ürünlerinin saflaştırılıp MacroGen Inc. (Amsterdam, Hollanda)'de sekansa gönderildi. Sonuçlar GenBank veri tabanındaki BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) opsiyonu kullanılarak karşılaştırıldı.

**Antimikrobiyal duyarlılık testi:** Antibiyogram hassasiyet testi CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapıldı (8). T-TSA'da 25±1°C'de 18 saatte üretilen vibrio izolatlarına ait kültürler steril FTS'de McFarland No: 0,5 bulanıklığına ayarlandı ve Tuzlu Mueller Hinton Agar (T-MHA, % 2 NaCl) üzerine yayıldı ve üzerine dispenser (Bioanalyse) yardımı ile antibiyotik diskler sırasıyla; ampicilin, enrofloksasin, eritromisin, florfenikol, oksolinik asit, oksitetrasiklin, trimetoprim+sulfametoksazol, sulfametoksazol ve streptomisin

(Bioanalize, Türkiye) dağıtıldı (6). Petriler 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve antibiyotik disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları dijital kumpas yardımıyla ölçüldü. Antimikrobiyal hassasiyet testi için *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suşu kullanılarak antibiyotik zon zapı standartları oluşturuldu (6).

### Bulgular

Kafes işletmelerinde farklı su sıcaklıkları (8°C, 13°C ve 20°C)'nda vibriosis olgularına rastlanıldı ve bu işletmelerdeki hastalıklı balıkların iç organlarında bakterilerin varlığına rastlanıldı. Suyun kimyasal değerleri sırasıyla; pH 6,96-7,80, oksijen 7,35-10,50 mg/l ve tuzluluk 17,8±0,3 ppt olarak ölçüldü. Hastalıklı balıklarda renkte kararma, ekzoftalmus, pul dökülmesi, vücut yüzeyinde

dejenerasyon ve ülser, boğaz altında, operkulum üzerinde, pektoral ve pelvik yüzgeç kaidesinde kanamaların varlığı tespit edildi. Bu balıkların otopsisinde; karaciğer solgun, dalakta büyüme ve normal görünümünü kaybetmiş, mide boş, plorik sekumların gergin, bağırsağın şişkin ve sarı bir içerikle dolu olduğu belirlendi.

İzolatlara ait API 20E test sonuçları, apiweb™ veri tabanında *V. anguillarum* olmadığı için sisteme girilen kodların *V. fluvialis* ve/veya motil *Aeromonas* türlerinden biri olarak yanlış tanımlandığı belirlendi. Universal 16S rRNA primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizine gönderilen sekans sonuçları GenBank veri tabanındaki farklı kabul numarasıyla kayıtlı olan *V. anguillarum* ile % 97-99 oranında benzerlik gösterdikleri belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *V. anguillarum* izolatları ve PZR sonuçlarına göre benzerlik oranları.  
Table 1. Sources of *V. anguillarum* strains used in this study and likelihood ratios according to the PCR results.

Suş No	İzolasyon	Coğrafi Bölge	Tarih	GenBank Giriş No	Benzerlik Oranı (%)
V001	Böbrek	Rize/Ardeşen	22.12.1999	KC814182	% 97
V002	Böbrek	Rize/Ardeşen	31.11.2000	KC210822	% 99
V003	Dalak	Trabzon/Yomra	03.04.2005	KP792697	% 98
V040	Böbrek	Trabzon/Yomra	31.05.2006	KC210822	% 98
V041	Dalak	Rize/Pazar	24.05.2007	KP792697	% 99
V045	Böbrek	Trabzon/Arsin	15.03.2007	KC814182	% 97
V094	Böbrek	Trabzon/Yomra	22.05.2008	CP006699	% 99
V095	Dalak	Trabzon/Yomra	10.01.2010	LK021130	% 99
V389	Böbrek	Trabzon/Arsin	10.03.2011	CP006699	% 99
V390	Böbrek	Rize/Merkez	15.03.2011	CP006699	% 99
V402	Böbrek	Rize/Merkez	21.02.2012	LK021130	% 99
V403	Dalak	Rize/Merkez	25.03.2012	KF150786	% 99
V404	Böbrek	Trabzon/Yomra	31.05.2012	KF150786	% 98
V427	Böbrek	Trabzon/Arsin	20.06.2012	CP006699	% 97
V428	Dalak	Rize/Merkez	10.04.2013	KF150786	% 98
V429	Böbrek	Rize/Merkez	16.04.2013	CP006699	% 98
V472	Böbrek	Trabzon/Yomra	09.05.2013	LK021130	% 98
V474	Böbrek	Rize/Merkez	09.05.2013	KF150786	% 98
V475	Böbrek	Trabzon/Arsin	09.05.2013	KF150786	% 98
V756	Böbrek	Ordu/Perşembe	12.11.2013	CP006699	% 98
V757	Böbrek	Ordu/Perşembe	07.01.2013	KF150786	% 98
V831	Böbrek	Rize/Merkez	16.04.2013	CP006699	% 98
V876	Dalak	Trabzon/Darıca	30.04.2013	LK021130	% 97
V877	Böbrek	Ordu/Perşembe	17.01.2014	LK021130	% 99
V878	Dalak	Trabzon/Darıca	20.04.2014	LK021130	% 97
V879	Böbrek	Ordu/Perşembe	25.04.2014	KF150786	% 98
V880	Böbrek	Trabzon/Yomra	30.04.2014	CP006699	% 99
V881	Dalak	Trabzon/Yomra	30.04.2014	KF150786	% 97
V882	Böbrek	Trabzon/Arsin	08.06.2014	CP006699	% 98
V974	Böbrek	Trabzon/Yomra	13.02.2014	KF150786	% 98
V975	Böbrek	Trabzon/Yomra	23.04.2014	LK021130	% 99

Tablo 2. *V. anguillarum* izolatlarının morfolojik, biyokimyasal ve API 20E test sonuçları.  
Table 2. The morphologic, biochemical and API 20E test results of *V. anguillarum* isolates.

Morfolojik ve Biyokimyasal Testler	<i>Vibrio anguillarum</i> suşlarına ait stok no																																						
	V001	V002	V003	V040	V041	V044	V045	V094	V095	V389	V390	V402	V403	V404	V427	V428	V429	V472	V474	V475	V756	V757	V831	V876	V877	V878	V879	V880	V881	V882	V974	V975	Ref.-1	Ref.-2	Ref.-3				
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Şekil	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B			
TCBS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S			
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Aglütinasyon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
OF Üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
O/129 (10µg)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H			
O/129 (150µg)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H		
% 0 NaCl	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N	-		
% 7 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
Hemoliz (KA)	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	N	N	N		
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
IND	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-		
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
GLU*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
MAN*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
INO*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	+		
SOR*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
RHA*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
SAC*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
MEL*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
AYM*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V	-	
ARA*	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+

B: basil, S: TBCS agarda sarı koloniler, H: hassas, +: pozitif reaksiyon, -: negatif reaksiyon, β: beta hemoliz, V: değişken, N: belirtilmedi, \*Karbonhidratlardan asit oluşumu.

B: basil, S: yellow colonies on TCBS agar, H: susceptibility, +: positive reaction, -: negative reaction, β: beta hemolysis, V: variable, N: not stated, \*Acid formation from carbohydrates.

Ref.: Referanslar, Ref.-1: Austin ve Austin (2), Ref.-2: Demircan ve Candan (10), Ref.-3: Tanrıkul (25).

Ref.: References, Ref.-1: Austin and Austin (2), Ref.-2: Demircan and Candan (10), Ref.-3: Tanrıkul (25).

Bu izolatların API 20E test sonucunda; indol 2 suşda ve arabinoz 23 suşda pozitif iken diğer suşların negatif olmasına karşın, bütün suşların hepsinde diğer test sonuçları aynı olduğu belirlendi. Bu suşların 32 izolata ait morfolojik, biyokimyasal ve API 20E test sonuçları referans çalışmalarla karşılaştırıldığında *V. anguillarum* olduğu

belirlendi. İzolatların, morfolojik, biyokimyasal ve API 20E test sonuçları Tablo 2’de verildi.

Antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları Tablo 3’de verilen antibiyotik inhibisyon zon çaplarına göre yorumlandı ve suşların antibiyotiklere direnç hassasiyetleri % olarak belirlendi. Tüm izolatların sulfamethoxazole,

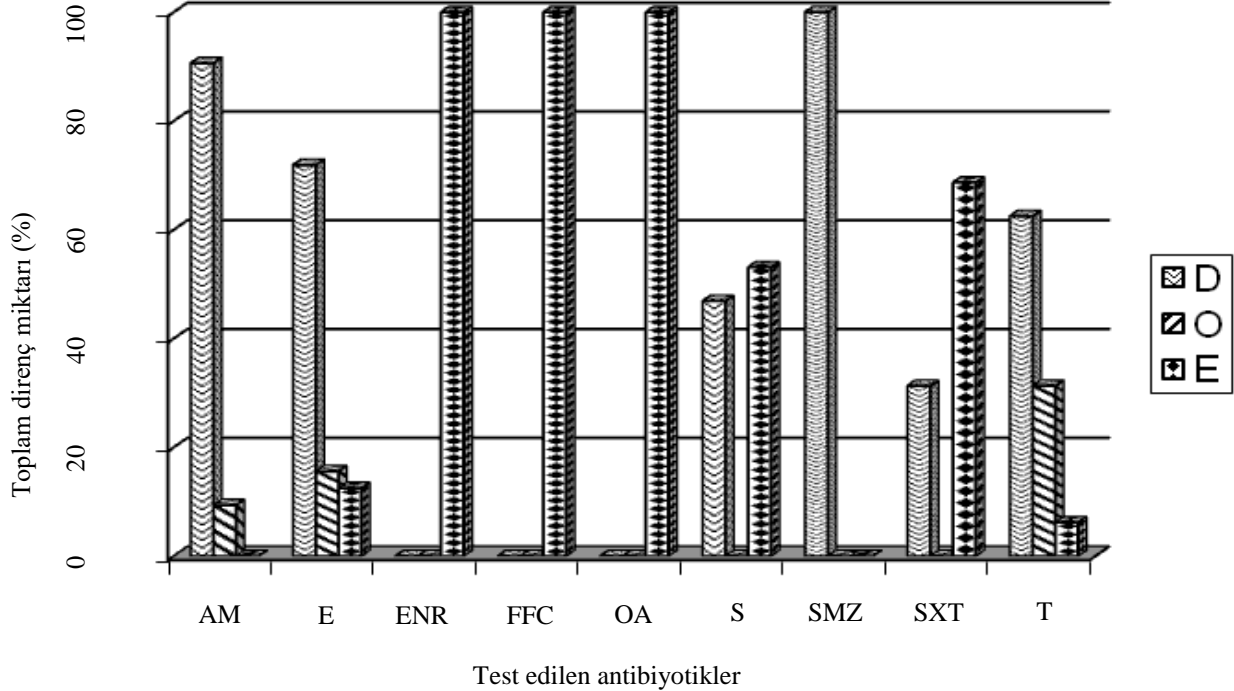
ampisilin, eritromisin, oksitetrasiklin, streptomisin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e farklı oranlarda dirençli olduğu, oksolinik asit, enrofloksasin ve florfenikol'e karşı

ise duyarlı olduğu tespit edildi ve antimikrobiyal duyarlılık profilleri Tablo 3'de ve grafik olarak Şekil 1'de verildi.

Tablo 3. Farklı antibiyotiklerin zon çapı standartları (8) ve suşların antimikrobiyal hassasiyet oranları.  
Table 3. Zone diameter standards of different antibiotics (8) and the antimicrobial sensitivity rate of isolates.

Antibiyotik diskleri ve konsantrasyonu	İnhibisyon zon çapı (mm)			Antimikrobiyal hassasiyet oranı (%)		
	D	O	E	D	O	E
T (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19	20 (% 62.5)	10 (% 31.3)	2 (% 6.2)
OA (2 µg)	≤ 10	11-12	≥ 13	0	0	32 (% 100)
SMZ (100 µg)	≤ 12	13-16	≥ 17	32 (% 100)	0	0
AM (10 µg)	≤ 13	14-16	≥ 17	29 (% 90.6)	3 (% 9.4)	0
FFC (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19	0	0	32 (% 100)
S (10 µg)	≤ 11	12-14	≥ 15	15 (% 46.9)	0	17 (% 53.1)
ENR (5 µg)	≤ 16	17-20	≥ 21	0	0	32 (% 100)
E (15 µg)	≤ 11	14-22	≥ 23	23 (% 71.9)	5 (% 15.6)	4 (% 12.5)
SXT (25 µg)	≤ 10	11-15	≥ 16	10 (% 31.3)	0	22 (% 68.7)

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), E: etkili (effective).



Şekil 1. Gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen *V. anguillarum* türlerinin antimikrobiyal direnç profilleri.  
Figure 1. Antimicrobial resistance profiles of the *V. anguillarum* species isolated from rainbow trout.

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), E: etkili (effective).

### Tartışma ve Sonuç

Su ürünleri yetiştiriciliğinde maliyeti düşürmek için yem, iş gücü, su kalitesi ve pazarlama gibi farklı sorunlarla mücadele edilmektedir. Hastalıklar ise bu problemler ile yakın ilişki fakat daha önemli bir sorundur. Su kalite kriterleri, uygun olmayan rasyonlar ile besleme ve yanlış uygulamalar (stok yoğunluğu, boylama, gereksiz ve hatalı ilaçlama, taşıma, hasat) stres ile farklı hastalıklara sebep olmaktadır. Tüm bu bileşenler içerisinde hastalıkların doğru teşhisi oldukça önem arz etmektedir. Hastalık etkenlerinin yanlış teşhisi alınacak önleyici tedbirleri ve tedaviyi engelleyici faktörlerdir. Bu çalışma, Karadenizde yüzer ağ kafeslerde yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında ölümlere neden olan hastalık vakalarından izole edilen bakterilerin identifikasyonu farklı yöntemlerle gerçekleştirilmiş ve hastalık etkeninin *V. anguillarum* olduğu açıkça ortaya konulmuştur. Bölgedeki çalışmalara bakıldığında, *V. anguillarum*'un izole edildiği sınırlı sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür (7, 23). Savaş ve Türe'nin çalışmasında, Ordu ili'nde yüzer ağ kafeslerde yetiştiriciliği yapılan levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) *V. anguillarum* izolasyonu gerçekleştirilmiştir (23). Bu çalışmada, konvensiyonel testler ve API 20E test kitleri kullanılmış, fakat tanımlamaya ait bulgular net olarak verilmiştir. Bu bölgede *V. anguillarum* üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise, Karadeniz'de kısa süreli yetiştiricilik denemesi yapılan Atlantik somonu (*Salmo salar*)'ndan izole edilen bakterinin sadece biyokimyasal testler ile identifikasyon gerçekleştirilerek *V. anguillarum* olduğu bildirilmiştir (7). Ülkemizdeki diğer araştırmalar ise, Ege ve Akdeniz kıyılarını kapsamaktadır (5, 9, 16, 17, 25, 26). Bu çalışma, ülkemizin Doğu Karadeniz kıyılarında yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *V. anguillarum* izolasyonu ile ilgili gerek örneklenen balık sayıları ve gerekse zaman aralığı olarak en kapsamlı çalışma olma niteliğindedir. Hastalığın epizootiyolojisine ilişkin, su sıcaklığının 10°C üzerine çıktığı yaz aylarında, tatlı suda ve düşük su sıcaklığında (1-4°C) sporadik olarak salgınlar meydana geldiği bildirilmiştir (1). Ülkemizde ise gökkuşağı alabalıklarında 13 ve 15°C'de (25), *Lactococcus garvieae* ile miks enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (27). Başka bir araştırmada, Karadeniz'de kültürü yapılan somon (*Salmo salar*) balıklarında 1991 Temmuz ve 1992 Haziran aylarında su sıcaklığı 23-24°C'nin üzerine çıktığında yoğun ölümlerin gözlemlendiği bildirilmiştir (7). Karadeniz'de gökkuşağı alabalıklarının denize transferlerinden sonra adaptasyon esnasında 8°C gibi düşük su sıcaklığında vibriosis vakaları ilk kez bu çalışmada tespit edilmiştir. Bunun nedeni, balıkların deniz suyuna adaptasyonları esnasında karşılaştıkları yüksek ortam tuzluluğunun (17,8±0,3 ppt) oluşturduğu fizyolojik baskının immün sistem üzerine bir etkisi olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca,

nakil öncesi balıkların uzun süre aç bırakılması, nakil esnasında oluşan taşıma stresi, nakil mesafesinin uzunluğu, elle muamele, yüksek stok yoğunluğu ve deniz suyunda ilk kez karşılaşılan farklı mikrobiyal patojenlerin de önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

API test kitleri insan patojenlerinin hızlı identifikasyonu için tasarlanmıştır. Özellikle inkübasyon sıcaklıklarının balık patojenlerinin inkübasyon sıcaklıklarına uygun olmayışı, bu kitlerin balık patojenleri için kullanıldığında hatalı sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella ictaluri*, *Vibrio anguillarum* gibi balık patojenleri için sistemin adaptasyonu üzerinde çalışmalar yapılması gerekliliği vurgulanmaktadır (22). Bu çalışmada, izolatlara uygulanan API 20E test sonuçları değerlendirildiğinde *V. anguillarum* bakterisi ile ilgili detaylı bir bilgi sunulmuş ve diğer çalışmalar ile bu bulgular arasındaki sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, API 20E testine ait biyokimyasal test sonuçları farklı araştırmacılar tarafından bildirilen test sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (2, 9, 10, 26). Bahsi geçen çalışmalarda farklı suşların arjinin dihidrolaz (13), sitrat (20, 26) ve indol üretimi (13, 20), voges proskauer reaksiyonu (13, 20), jelatin hidroliz (20), inositol (26), sorbitol (13, 20, 26), sukroz (13), amigdalin (13, 26) ve arabinozdan (13, 20) asit üretimi değişken, fakat inositol (25) ve amigdalinden asit üretimi pozitif (2, 20) diğer çalışmalarda negatif, arabinozdan asit üretimi negatif (10, 13) iken diğer çalışmalarda ise pozitif olduğu ve çalışmalar arasındaki farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (2, 10, 25). Ayrıca tuza tolerans testlerinde tuzsuz (% 0 NaCl) ortamda 32 suştan 21 suşu ve tuzlu (% 7 NaCl) ortama 32 suşun hepsinin pozitif olması ile Demircan ve Candan'ın (20), çalışması ile paralellik gösterirken, Austin ve Austin (7, 9) ve Tanrikul (25)'un çalışmaları ile ise negatif olması ile farklılık göstermiştir.

Son yıllarda birçok bilimsel çalışmada, tür teşhisinin konvensiyonel yöntemlerini destekleyici olarak moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bilimsel çalışmalarda tür teşhisinin doğruluğunu güçlendirmek ve bazı yanlışların önüne geçmede moleküler metod önemli bir kriter olarak kabul görmektedir. Balıklardan izole edilen *V. anguillarum* bakterisinin moleküler teşhisi sadece birkaç çalışmada ve bu çalışmaya konu olan alabalık türü dışındaki türler üzerinde gerçekleştirilmiştir (5, 10).

Bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde antibiyotik kullanımı oldukça yaygın bir uygulamadır. Vibriosisin 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 mg/kg) 10 gün, güçlendirilmiş sulfonamidler (30 mg/kg) 10 gün,

sulfonamidler (sülfisoksazol, sülfamerazin, sülfametazin; 100-200 mg/kg) 10-20 gün ve florfenikol (10 mg/kg) 10 gün (3) doz ve süresince kullanılmaları önerilmektedir (1, 2, 3, 12). *V. anguillarum* suşlarının R-factor taşıdığı ve plazmidler aracılığı ile özellikle streptomisin, sülfonamidler ve tetrasiklin'e direnç geliştirdiği farklı araştırmalarda bildirilmiştir (1, 2, 3, 12). Ayrıca, *V. anguillarum* suşlarına karşı ampisilin (17, 20), amoksisilin (17), kanamisin (4, 17), eritromisin (8, 27, 32), sülfametaksozol (17); bazı suşların enrofloksasin (25), trimetoprim+sulfametoksazol (27) ve oksitetrasikline (25, 27, 32) dirençli olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada; antibiyogram hassasiyet test sonuçlarına göre hastalığın tedavisinde enrofloksasin, oksalınik asit ve florfenikolden birinin kullanılmasının uygun olacağı belirlenmiştir.

### Kaynaklar

1. **Austin B, Austin DA** (1987): *Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK.
2. **Austin B, Austin DA** (1999): *Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish*. Springer-Praxis Publishing, Chichester, UK.
3. **Austin B, Austin DA** (2007): *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of farmed and wild fish*. Praxis Publishing Chichester, UK.
4. **Austin B, Austin DA** (2012): *Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish*. Springer, New York.
5. **Avsever ML, Ün C** (2015): *Distribution of hemolysin genes in Turkish Vibrio anguillarum isolates*. Bull Eur Ass Fish Pathol, **35**, 75-84.
6. **Balta F, Sandalli C, Kayis S ve ark.** (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.
7. **Candan A** (2000): *Türkiye'de üretilen Atlantik salmonu (Salmo salar L.)'nda tespit edilen ilk vibriosis olgusu*. Türk Mikrobiyol Cem Derg, **30**, 107-108.
8. **CLSI** (2014): *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth Informational Supplement*. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, M100-S24, 230s.
9. **Çağırğan H** (2004): *Vaccine development in sea bass fry (Dicentrarchus labrax L., 1758) against vibriosis*. EU Su Ürünleri Dergisi, **21**, 271-274.
10. **Demircan D, 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.
11. **Drancourt M, Bollet C, Carlouz A ve ark.** (2000): *16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates*. J Clin Microbiol, **38**, 3623-3630.
12. **Frans I, Michiels CW, Bossier P ve ark.** (2011): *Vibrio anguillarum as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention*. J Fish Dis, **34**, 643-661.
13. **Grisez L, Ceusters R, Oliever F** (1991): *The use of API 20E for the identification of Vibrio anguillarum and V. ordalii*. J Fish Dis, **14**, 359-365.
14. **Grisez L, Oliever F** (1995): *Comparative serology of the marine fish pathogen Vibrio anguillarum*. Appl Environ Microbiol, **61**, 4367-4373.
15. **Kitao T, Aoki T, Fukudome M ve ark.** (1983): *Serotyping of Vibrio anguillarum isolated from diseased fresh water fish in Japan*. J Fish Dis, **6**, 175-181.
16. **Korun J** (2006): *Kültürü yapılan çipuralarda (Sparus aurata L.) görülen Listonella anguillarum enfeksiyonu üzerine bir çalışma*. EU Su Ürünleri Dergisi, **23**, 259-263.
17. **Korun J, Gokoglu M** (2007): *Listonella anguillarum isolated from hatchery cultured red porgy Pagrus pagrus in Turkey*. J Anim Vet Adv, **6**, 823-827.
18. **MacDonell MT, Colwell RR** (1985): *Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, Listonella and Shewanella*. Syst Appl Microbiol, **6**, 171-182.
19. **Maugeri TL, Caccamo D, Gugliandolo C** (2000): *Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels*. J Appl Microbiol, **89**, 261-266.
20. **Maugeri TL, Crisafi E, Genovese L ve ark.** (1983): *Identification of Vibrio anguillarum with the API 20 E system*. Microbiologica, **1**, 73-79.
21. **Pedersen K, Grisez L, van Houdt R ve ark.** (1999): *Extended serotyping scheme for Vibrio anguillarum with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups*. Curr Microbiol, **38**, 183-189.
22. **Popovic NT, Coz-Rakovac R, Strunjak-Petrovic I** (2007): *Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: A review*. Veterinarni Medicina, **52**, 49-53.
23. **Savaş H, Türe M** (2007): *Bölgemizde doğal ve kültürü yapılan balıklarda görülen hastalıklar*. SUMAE Yunus Araştırma Bülteni, **7**, 10-13.
24. **Sørensen UBS, Larsen JL** (1986): *Serotyping of Vibrio anguillarum*. Appl Environ Microbiol, **51**, 593-597.
25. **Tanrikul TT** (2007): *Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in Turkey*. Pak J Biol Sci, **10**, 1733-1737.
26. **Tanrikul TT, Cagırgan H, Toksen E** (2004): *Levreklerden (Dicentrarchus labrax L., 1758) izole edilen vibrio türlerinin API 20E yöntemiyle identifikasyonu*. EÜ Su Ürünleri Dergisi, **21**, 243-247.
27. **Tanrikul TT, Gultepe N** (2011): *Mix infections in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) Lactococcus garvieae and Vibrio anguillarum O1*. J Anim Vet Adv, **10**, 1019-1023.
28. **Toranzo AE, Barja JL** (1990): *A review of the taxonomy and sero epizootiology of Vibrio anguillarum, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain*. Dis Aquat Org, **9**, 73-82.
29. **Toranzo AE, Baya AM, Roberson BS ve ark.** (1987): *Specificity of slide agglutination test for detection bacterial fish pathogens*. Aquaculture, **61**, 81-97.
30. **Toranzo AE, Santos Y, Barja JL** (1997): *Immunization with bacterial antigens: Vibrio infections*. Dev Biol Stand, **90**, 93-105.

31. **Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Ohwada K** (1997): *16s rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae*. FEMS Microbiol Lett, **152**, 125-132.
32. **Vaseeharan B, Ramasamy P, Murugan T ve ark.** (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.
33. **Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA ve ark.** (1991): *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. J Bacteriol, **173**, 697-703.

Geliş tarihi: 04.05.2016 / Kabul tarihi: 09.11.2016

**Yazışma Adresi:**

Doç. Dr. Fikri BALTA

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi,

Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Anabilim Dalı

Zihniderin Yerleşkesi, Fener Mah. 53100, Rize, Turkey.

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