



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI



**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM  
1792) KULUÇKAHANELERİNDE HASTALIK OLUŞTURAN  
FLAVOBACTERIUM TÜRLERİNİN GENOTİPİK  
KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ  
GELİŞİMİNDE ROL OYNAYAN GENLERİN VARLIĞI-  
YAYGINLIĞININ BELİRLENMESİ**

İZZET BURÇİN SATICIOĞLU

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2018



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI



**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM  
1792) KULUÇKAHANELERİNDE HASTALIK OLUŞTURAN  
FLAVOBACTERIUM TÜRLERİNİN GENOTİPİK  
KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ  
GELİŞİMİNDE ROL OYNAYAN GENLERİN VARLIĞI-  
YAYGINLIĞININ BELİRLENMESİ**

**İZZET BURÇİN SATICIOĞLU**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:  
Prof. Dr. Soner ALTUN**


**1160626-TÜBİTAK**

**BURSA-2018**

**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**






**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum ‘‘Gökkuşuğı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) kuluçkahanelerinde hastalık oluşturan *Flavobacterium* türlerinin genotipik karakterizasyonu ve antimikrobiyal direnç gelişiminde rol oynayan genlerin varlığı-yaygınlığının belirlenmesi’’ adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

  
İzzet Burçin SATICIOĞLU  
11.09.2018

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Veteriner-Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı Doktora öğrencisi İzzet Burçin SATICIOĞLU tarafından hazırlanan Gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) kuluçkahanelerinde hastalık oluşturan Flavobacterium türlerinin genotipik karakterizasyonu ve antimikrobiyal direnç gelişiminde rol oynayan genlerin varlığı-yaygınlığının belirlenmesi konulu Doktora tezi 11/09/2018 günü, 10.00-12.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Soner ALTUN	
Üye	Prof. Dr. Hasan Hüseyin HADİMLİ	
Üye	Doç. Dr. Ertan Emek ONUK	
Üye	Doç. Dr. Murat CENGİZ	
Üye	Doç. Dr. Esra KOCAKAYA BÜYÜKCANGAZ	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali AYDOĞDU  
Enstitü Müdürü



## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

11/09/2018

**Adı Soyadı:** İzzet Burçin SATICIOĞLU

**Anabilim Dalı:** Veteriner-Su Ürünleri Hastalıkları

**Tez Konusu:** Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) kuluçkahanelerinde hastalık oluşturan flavobacterium türlerinin genotipik karakterizasyonu ve antimikrobiyal direnç gelişiminde rol oynayan genlerin varlığı-yaygınlığının belirlenmesi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

### DANIŞMAN ONAYI

**Unvanı Adı Soyadı:** Prof. Dr. Soner ALTUN

**İmza:** 

## İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYANI .....	II
KABUL ONAYI .....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
TÜRKÇE ÖZET .....	VIII
İNGİLİZCE ÖZET .....	IX
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Gökkuşuğu alabalığı üretimi .....	3
2.2. Alabalık kuluçkahanelerinde görülen önemli bakteriyel hastalıklar.....	4
2.3. <i>Flavobacteriaciae</i> ailesi .....	5
2.3.1. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	6
2.3.1.1. Tarihçe.....	6
2.3.1.2. Etiyoloji.....	7
2.3.1.3. Epidemiyoloji.....	7
2.3.1.4. Klinik bulgular .....	9
2.3.2. <i>Flavobacterium columnare</i> .....	9
2.3.2.1. Tarihçe.....	9
2.3.2.2. Etiyoloji.....	10
2.3.2.3. Epidemiyoloji.....	10
2.3.2.4. Klinik bulgular .....	12
2.3.3. <i>Flavobacterium branchiophilum</i> .....	12
2.3.3.1. Tarihçe.....	12
2.3.3.2. Etiyoloji.....	12
2.3.3.3. Epidemiyoloji.....	13
2.3.3.4. Klinik bulgular .....	14
2.3.4. Diğer <i>Flavobacterium</i> türleri.....	14
2.3.5. <i>Flavobacterium</i> spp. enfeksiyonlarında teşhis.....	15
2.3.6. <i>Flavobacterium</i> enfeksiyonlarında koruma-kontrol.....	22
2.3.6.1. İşletme yönetimi.....	22

2.3.6.2. Probiyotikler ve immunstimulanlar.....	23
2.3.6.3. Dirençli balıkların yetiştirilmesi .....	23
2.3.6.4. Bakteriyofaj.....	24
2.3.6.5. Aşılama .....	24
2.3.6.6. Tedavi.....	26
2.4. Antimikrobiyal direnç .....	27
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>33</b>
3.1. Bakteri izolatları.....	33
3.2. Moleküler identifikasyon .....	37
3.2.1. DNA ekstraksiyonu.....	37
3.2.2. PCR ile identifikasyon .....	37
3.2.2.1. <i>F. psychrophilum</i> 'un dubleks PCR ile identifikasyonu .....	37
3.2.2.2. <i>Flavobacterium</i> spp. türlerinin 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu .....	38
3.2.3. <i>Flavobacterium</i> spp.'nin dizi analizi .....	38
3.3. Moleküler karakterizasyon.....	39
3.3.1. <i>F. psychrophilum</i> 'un restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi PCR-RFLP analizi .....	39
3.3.2. <i>Flavobacterium</i> spp. türlerinin restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) .....	41
3.4. RFLP verilerinin değerlendirilmesi.....	41
3.5. Antimikrobiyal duyarlılık konsantrasyonlarının belirlenmesi .....	42
3.5.1. Disk difüzyon .....	42
3.5.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi (MİK).....	42
3.6. Antimikrobiyal direnç genleri .....	43
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>46</b>
4.1. Bakteri izolatları.....	46
4.2. <i>Flavobacterium</i> izolatlarının moleküler identifikasyonu .....	48
4.2.1. PCR ile identifikasyon .....	48
4.2.1.1. <i>F. psychrophilum</i> 'un dubleks PCR ile identifikasyonu .....	48
4.2.1.2. <i>Flavobacterium</i> spp. türlerinin PCR ile amplifikasyonu .....	48
4.2.2. <i>Flavobacterium</i> spp.'nin dizi analizi .....	49
4.3. Moleküler karakterizasyon.....	51
4.3.1. <i>F. psychrophilum</i> 'un restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi PCR-RFLP analizi .....	51
4.3.2. <i>Flavobacterium</i> spp.'nin restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi PCR-RFLP analizi .....	58

4.4. Antimikrobiyal duyarlılık konsantrasyonlarının belirlenmesi .....	70
4.4.1. Disk difüzyon .....	70
4.4.2 Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi (MIK).....	78
4.5. Antimikrobiyal direnç genleri .....	81
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>85</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>103</b>
<b>7. SİMGELER ve KISALTMALAR.....</b>	<b>117</b>
<b>8. TEŞEKKÜR .....</b>	<b>118</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>119</b>





## TÜRKÇE ÖZET

Flavobacterium genusuna ait türlerin balıklarda oluşturduğu salgınlar önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu türlerden en fazla bilinenleri *Flavobacterium psychrophilum*, *F. columnare* ve *F. branchiophilum*'dur. Son yıllarda birçok yeni Flavobacterium türünün de balıklardan izole edildiği bildirilmiştir. Bu araştırmada gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Anadolu/dağ alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*), Çoruh alabalığı (*Salmo coruhensis*), kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve Karadeniz alabalığından (*Salmo trutta labrax*) izole edilmiş 109 *Flavobacterium* spp. izolatının dizi analizi ile identifikasyonu, PCR-RFLP profiline göre genotiplendirilmesi, antimikrobiyal direnç durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Flavobacterium türlerinin identifikasyonu 16S rRNA bölgesinin dizi analiziyle, PCR-RFLP analizi ise 16S rRNA, *gyrA*, *gyrB* gen bölgeleri kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca Flavobacterium türlerinin amoksisilin, oksitetrasiklin, oksalinik asit, sulfamethoksazol/trimetoprim, enrofloksasin, eritromisin ve florfenikol antimikrobiallerine karşı dirençliliği fenotipik (disk difüzyon, minimum inhibitör konsantrasyonları) ve genotipik (*floR*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE*, *tetH*, *tetM*, *tetL*, *sul1*, *sul2* *sul3*, *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS*) olarak belirlenmiştir.

Dizi analizi sonucunda 27 farklı Flavobacterium türü identifiye edilmiştir. Bu türlerden 26'sı ülkemizde ilk kez izole edilmiştir. *F. antarticum*, *F. terrigena*, *F. granuli*, *F. frigoris*, *F. saccharophilum*, *F. xueshanense* ve *F. cutihirudinis* türleri ise balıklarda ilk defa tespit edilmiştir. *F. psychrophilum* izolatları genotipik olarak homojen bir yapı göstermiş ve amoksisilin, florfenikole karşı duyarlı, enrofloksasin ile oksalinik asite ise duyarlılığının azalmış olduğu belirlenmiştir. *F. branchiarum*, *F. branchiicola*, *F. collinsii*, *F. frigoris* ve *F. psychrophilum* türlerinde *floR* ve *F. branchiarum*, *F. branchiicola*, *F. collinsii*, *F. oncorhynchi*, *F. plurextorum*, *F. psychrophilum*, *F. spartansii*, *F. terrigena* ve *F. tiangeerense* türlerinde ise *sul2* direnç geni bu çalışmada ilk defa tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler;** *Flavobacterium* spp., Antimikrobiyal Direnç, RFLP

## İNGİLİZCE ÖZET

### **Genotypic characterisation, detection and prevalence of antimicrobial resistance genes on *Flavobacterium* species cause of disease in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) hatcheries.**

Outbreaks in fish species due to the *Flavobacterium* genus cause significant economic losses. The best known of these species are *Flavobacterium psychrophilum*, *F. columnare* and *F. branchiophilum*, but in recent years, it has been reported that many new *Flavobacterium* species have also been isolated from fishes. The present study focused on three main goals: 1) to identify the isolate by sequence analysis, 2) to detect genotypes by their PCR-RFLP profiles and 3) to determine the antimicrobial resistance status of 109 *Flavobacterium* spp. that were isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Anatolian/mountain trout (*Salmo trutta macrostigma*), çoruh trout (*Salmo coruhensis*), brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and black sea trout (*Salmo trutta labrax*).

Each *Flavobacterium* species was identified by sequence analysis of the 16S rRNA region and by PCR-RFLP analysis using the 16S rRNA, *gyrA* and *gyrB* gene regions. Resistance of the *Flavobacterium* species to amoxicillin, oxytetracycline, oxalinic acid, sulfamethoxazole/trimethoprim, enrofloxacin, erythromycin and florfenicol antimicrobials was determined phenotypically (disk diffusion, minimum inhibitor concentrations) and genotypically (*floR*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *sul1*, *sul2* *sul3*, *qnrA*, *qnrB* and *qnrS*).

As a result of the sequence analysis, 27 different *Flavobacterium* species were identified. Twenty-six of these species were isolated for the first time in Turkey. *F. antarcticum*, *F. terrigena*, *F. granuli*, *F. frigoris*, *F. saccharophilum*, *F. xueshanense* and *F. cutihirudinis* species were the first *Flavobacterium* species detected in fish. *F. psychrophilum* isolates showed a genotypically homogeneous structure, and it was determined that the isolates were susceptible to amoxicillin and florfenicol, while enrofloxacin and oxalinic acid susceptibility was decreased in this species. Also in this study, the *floR* antimicrobial resistance gene in the *F. branchiarum*, *F. branchiicola*, *F. collinsii*, *F. frigoris* and *F. psychrophilum* species as well as the *sul2* resistance gene in the *F. branchiarum*, *F. branchiicola*, *F. collinsii*, *F. oncorhynchi*, *F. plurextorum*, *F. psychrophilum*, *F. spartansii* *F. terrigena* and *F. tiangeerense* species were detected for the first time.

**Keywords;** *Flavobacterium* spp., Antimicrobial Resistance, RFLP

## 1. GİRİŞ

Ülkemizde son otuz yıl içerisinde gökkuşuğu alabalığı üretimi hızlı bir gelişim göstermiş ve 2016 yılında toplam üretim miktarı 107.000 tonu ve toplam su ürünleri ihracatı ise 854 milyon doları bulmuştur (TUİK, 2018). Kültür balıkçılığında ekonomik kayıplara neden olan faktörlerin başında hastalıklara bağlı sorunlar gelmektedir. Balıkçılığın ve balık yetiştiriciliğinin sürdürülebilirliğinin sağlanması, balıkların uygun koşullarda yetiştirilmesi ve başarılı koruyucu hekimlik uygulamalarının geliştirilmesine bağlıdır (Peeler ve Taylor, 2011). Alabalık kuluçkahanelerinde ekonomik kayıplara neden olan faktörlerin başında hastalıklara bağlı sorunlar gelmektedir (Yılmaz ve ark., 2011). Yumurta ve frylarda bağışıklık sistemi tam olarak gelişmediğinden dolayı yetişkin balıklara göre hastalıklara karşı çok daha duyarlıdır. Bu yüzden alabalık kuluçkahanelerinde yavru balıkların sağlık durumlarının korunması büyük önem taşımaktadır. Kuluçkahanelerde bakteriyel, fungal ve paraziter enfeksiyonlar, genetik bozukluklar, besinsel ve çevresel faktörler önemli ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (Faruk ve Anka, 2017).

Özellikle *Flavobacterium* genusunun en fazla tanınan türleri olan *Flavobacterium psychrophilum*, *F. columnare* ve *F. branchiophilum* etkenlerinin neden olduğu enfeksiyonlar gökkuşuğu alabalıkları yetiştiriciliğinin ilk basamağı olan kuluçkahanelerde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Loch ve Faisal, 2015). Balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve mikro kirletici olarak kabul edilen antimikrobiyaller, organizmalar üzerindeki toksik etkilerinin yanı sıra akuatik florada yer alan bakterilerde de direnç gelişimine neden olmaktadır. Bu durumda hastalıkların tedavisi için de yüksek dozda antibiyotik kullanılması gerekebilir. Yüksek dozda antimikrobiyal kullanılması, akuatik çevrede aktif kalıntı miktarının artmasına, antimikrobiyallere dirençli bakterilerin çoğalmasına ve yaygınlaşmasına neden olmaktadır (De Liguoro ve ark., 2003; Yang ve Carlson, 2004).

Ülkemizde balık hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 6 farklı etken maddeye ait 46 farmasötik ürün ruhsatlandırılmıştır. Bu ürünlerden kültür balıklarında en yaygın kullanılan

antimikrobiyaller sırasıyla florfenikol, oksitetrasiklin ve sulfamethoksazol/trimetoprim olarak sıralanabilir. Gökkuşuğu alabalığı, doğal alabalık ve yetiştiricilik ortamlarından izole edilen bakterilerden antimikrobiyal direnç gelişimi konusunda çok sayıda rapor bulunmaktadır (Akinbowale ve ark., 2007; Alcaide ve ark., 2005; Balta, 1997; Duman ve ark., 2017a; Duman ve ark., 2017b; Ture ve Boran, 2015).

Bu doktora tez çalışmasında

- Ülkemizde moleküler yöntemler kullanılarak doğrulaması yapılan *Flavobacterium* türlerinden kaynaklanan hastalıkların belirlenmesi,
- Ülke genelinde *Flavobacterium* türlerinin genetik yakınlığı, çeşitliliği ve epidemiyolojik özelliklerinin saptanması
- Akuakültürde sık kullanılan antimikrobiyallere karşı (florfenikol, oksitetrasiklin, sulfamethoksazol/trimetoprim, enrofloksasin ve oksalinik asit) gelişen aktarılabılır ve/veya kromozomal direnç genlerinin varlığı, yaygınlığının belirlenmesi
- Alabalık yetiştiriciliğinde hedefe yönelik etkili antimikrobiyal kullanımının sağlanması ve gereksiz antimikrobiyal kullanımının azaltılarak direnç yayılımı ve ekonomik kaybın önlenmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Gökkuşığı alabalığı üretimi

Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliğinin geçmişi çok eski olmamasına rağmen hızlı bir gelişme göstermiştir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde üretim miktarı 2016 yılında 253 bin tona ulaşarak toplam su ürünleri üretiminin % 43'ünü oluşturmuştur (TÜİK, 2018). Nitekim FEAP (Avrupa akuakültür yetiştiricilik federasyonu) verilerine göre Türkiye Avrupa'da, 100 bin ton porsiyonluk gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretimi ile açık ara lider konumundadır (FEAP, 2018). Ülkemizde kültür balığı yetiştiriciliğinde gökkuşığı alabalığı üretimi yetiştiricilik sektöründe öncü konumuna gelmiştir. Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü (BSGM) verilerine göre 2016 yılında iç sularda gerçekleştirilen gökkuşığı alabalığı üretimi toplam yetiştiricilik üretiminin yaklaşık %42'sini oluşturmuştur (TÜİK, 2018). Ülkemizde gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliği tüm coğrafi bölgelere yayılmış ve halen 74 ilde aktif olarak üretim yapılmaktadır. Gökkuşığı alabalığı üretiminin en fazla yapıldığı il Elazığ'dır (14,286 ton). İkinci sırada ise Muğla ili yer almakta olup bu ilin üretim miktarı 13,900 ton olarak gerçekleşmiştir. Orta Anadolu'da yer alan Kayseri, 11.227 ton üretim ile üçüncü, Batı Anadolu'da yer alan Burdur 9,724 ton üretim ile dördüncü sıradadır. Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da yer alan Malatya ve Şanlıurfa'nın üretim miktarları sırasıyla 4,350 ve 4,297 ton olduğu bildirilmiştir (TÜİK, 2013). Son yıllarda, iç sularda onaylı gökkuşığı alabalığı işletmelerinin sayı ve kapasiteleri her geçen gün önemli artışlar göstermektedir. 1994 yılında 284 adet gökkuşığı alabalığı işletmesi bulunurken 2005 yılında bu sayı 1,273'e 2014 yılında 1,945'e yükselmiştir. Kapasite dağılımında da 90'lı yıllara nazaran önemli farklılıklar göze çarpmaktadır. 90'lı yıllarda genelde küçük ölçekli işletmeler oransal olarak yaygın iken özellikle 2005 yılından sonra orta ve büyük ölçekli işletmelerin sayısında artış gözlenmektedir (Şen ve Rad, 2016).

## 2.2. Alabalık kuluçkahanelerinde görülen önemli bakteriyel hastalıklar

Gökkuşığı alabalığı işletmelerinin en önemli ünitesi olan kuluçkahanelerde oluşacak ekonomik kayıpların engellenmesinde veya azaltılmasında, hastalıklara karşı koruyucu önlemlerin alınması ve sürdürülebilir yetiştiriciliğin sağlanması büyük önem taşımaktadır. Yumurta ve frylar hastalıklara karşı yetişkin balıklara göre çok daha duyarlıdır. Bu yüzden kuluçkahane yönetimine balık çiftliklerinde ayrı bir önem verilmektedir. Kuluçkahanelerde mikroorganizma kaynaklı enfeksiyonların yanı sıra, genetik bozukluklar, beslenme ve çevresel faktörler önemli ölçüde ekonomik kayba yol açmaktadır (Faruk ve Anka, 2017).

Alabalıklardaki bağışıklık sistemi 2 gram ve daha büyük balıklarda geliştiği için bu ağırlıktan küçük balıklarda aşılama yeterli koruma sağlayamamaktadır. Bundan dolayı hastalıkların kontrolünde yoğun antimikrobiyal kullanım kaçınılmaz olmaktadır (Nya ve Austin, 2011).

*F. psychrophilum* Avrupa ülkelerinin büyük bir bölümünde de gökkuşığı alabalığı kuluçkahanelerinin en önemli bakteriyel hastalığı olarak bildirilmiştir. Ülkemizde de gökkuşığı alabalığı kuluçkahanelerinde büyük ekonomik kayıplara yol açtığı bilinmektedir (Kubilay ve ark., 2009). Flavobakteriyozisde mortalite oranı, su sıcaklığı ve balık büyüklüğüne göre değişiklik gösterebilmektedir. Gökkuşığı alabalığı frylarında (RTFS), kuluçkahane su sıcaklığının 10°C'nin altında olduğu işletmelerde ilk beslenmeden başlayarak 4 ve 7 haftalık dönemde RTFS şiddetli bir seyir gösterir ve alabalık yetiştiriciliğinin ilk basamağında sektörde önemli ekonomik kayıplara yol açar (Madetoja ve ark., 2002; Wiklund ve ark., 1994). Kuluçkahanelerde de 0,1-2 g ağırlığındaki yavru alabalıklarda (RTFS) %70 ve daha yüksek oranda ölüm görülebilmektedir (Cipriano ve Holt, 2005).

Akuatik çevrede yaygın olarak bulunan *F. columnare*; genellikle su sıcaklığı 13°C'nin üzerine çıktığı zamanlarda balıkların yüzgeçlerinde dejenerasyon ve solungaçlarda nekroza yol açarak kolumnaris olarak isimlendirilen hastalığa neden olmaktadır. Kolumnaris hastalığına her yaş ve boydaki balıklar duyarlıdır ancak daha çok genç balıklar etkilenir. Salgınlar, genellikle su sıcaklığının 12-15°C ve üzerine çıktığı dönemlerde görülmektedir. Mortalite, su sıcaklığına bağlı olarak %10-100 arasında değişmekte, stres ve su kalitesinin bozulması durumunda ölüm miktarı artmaktadır (Bernardet ve Bowman, 2015; Decostere ve ark., 1997).

Bakteriyel Solungaç Hastalığı (BGD); farklı yaş ve ağırlıktaki balıkları etkileyebilmektedir. Fakat yavru balıkların daha çok etkilendiği bildirilmiştir. BGD; genellikle ilkbahar, yaz başında su sıcaklıklarında meydana gelen artışa bağlı olarak özellikle kültür yapılan balıklarda ortaya çıkmakta ve daha sık olarak yavru balıkları etkilemektedir (Bernardet ve Bowman, 2015; Loch ve Faisal, 2015).

### **2.3. *Flavobacteriaciae* ailesi**

**Şube;** Bacteroidetes

**Sınıf;** Flavobacteriales

**Takım;** Flavobacteriales

**Aile;** *Flavobacteriaceae*

*Flavobacteriaceae* olarak ilk isimlendirme Jooste tarafından 1985 yılında yapılmıştır (Jooste ve ark., 1985). 1989 yılında Bergey Manualde yer alan *Flavobacteriaceae* ailesi Reichenbach tarafından *Flavobacterium* cinsi temel alınarak kısa bir şekilde tanımlanmıştır. 1996 yılında ise Bernardet tarafından yapılan polifazik çalışmalarla *Flavobacteriaceae* ailesinin tanımlanması kapsamlı bir şekilde ilk defa yapılmıştır. Bernardet'in tanımlamasına göre *Flavobacteriaceae* ailesinde *Flavobacterium* cinsinin yanı sıra; *Chryseobacterium*, *Bergeyella*, *Capnocytophaga*, *Ornithobacterium*, *Weeksella*, *Riemerella*, *Myroides* ve *Tenacibaculum* cinsleri yer almaktadır (Bernardet ve Bowman, 2015; Loch ve Faisal, 2015). Daha sonra Bernardet tarafından hazırlanan ve 2015 yılında yayımlanan Bergey Manual'in sistematik bakteriyoloji kitabında ise bu aile 54 cinsin yer aldığı bildirilmiştir (Bernardet ve Bowman, 2015).

#### ***Flavobacteriaceae* ailesinin karakteristik özellikleri;**

- Gram negatif,
- Sporsuz-kapsülsüz,
- Basil (2- 20 µm),
- Aktif hareket yok fakat bazı türlerde kayma hareketi var,
- Koloni morfolojisi olarak sirküler/ rizoid/ düz veya konveks yapılarda olabilmekte,

- Birçok türde karotenoid ve/veya flexirubin pigmenti bulunurken bazılarında bulunmaz,
- Genellikle aerobik olup bazı türler mikroaerofilik veya anaerobik özellik gösterebilmekte,
- Oksidaz ve katalaz pozitif,
- Birçok tür, proteinler (ör. kazein, jelatin vb.), basit ve/veya kompleks karbonhidratlar (ör. nişasta, eskülin, pektin, kitin, karboksimetilseloz) ve lipitler (ör., tween) de dahil olmak üzere birçok organik substratı parçalayabilmekte,
- Birçok tür halofilik ve mezofilik özellikte, bazı türler psikrofilik olabilmekte,
- Yağ asitleri profilini genellikle C15 ve C17 yağ asitleri oluşturmaktadır.

Bu familyadaki bakterilerin büyük çoğunluğu tatlı su ve tuzlu su ortamında doğal olarak bulunur. Ayrıca, toprak, gıda, işleme tesisleri, beşeri ve hayvan hastaneleri gibi birçok yaşam alanından izole edildiği bildirilmiştir (Bernardet ve ark., 2002; Bernardet ve Bowman, 2015).

### **2.3.1. *Flavobacterium psychrophilum***

#### **2.3.1.1. Tarihçe**

Etken ilk olarak 1948 yılında Batı Virginia'daki hastalık semptomu gösteren yavru koho salmonların (*Oncorhynchus kisutch*) böbrek ve yüzgeç lezyonlarından izole edilmiştir. Bakteri ilk olarak biyokimyasal özelliklerine göre *Cytophaga psychrophila* olarak isimlendirilmiş olup, daha sonra DNA homolojisine göre yapılan sınıflandırmada *Flexibacter psychrophilus* olarak yeniden adlandırılmıştır (Bernardet ve Grimont, 1989). Son olarak ise 1996 yılında DNA-rRNA hibridizasyonu, DNA G+C içeriği, yağ asidi ve protein profili göz önünde bulundurularak *Flavobacteriaceae* ailesine dahil edilmiş ve *Flavobacterium psychrophilum* olarak adlandırılmıştır (Bernardet ve ark., 1996).



### 2.3.1.2. Etiyoloji

Etken, Gram negatif, ince, uzun (0,3-0.75 x 1,5-7,5µm) bir basil olup, boyutu ve morfolojisi üreme dönemine göre değişiklik gösterebilmektedir. Genç kültürleri genellikle ince, uzun çubuk şeklindeki, yaşlı olanlar nadirde olsa daha şişman segmentler halinde gözlemlenebilmektedir. Aktif hareket yapamaz, ancak genç kültürlerde kayma hareketi görülmektedir (Cipriano ve Holt, 2005; Holt ve ark., 2012).

*F. psychrophilum*, kollajen, fibrinojen, kazein, jelatin, elastin, chondroitin sülfat, tributyrin, tyrosin, haemoglobini parçalayabilen farklı tipte proteolitik enzimleri salgılayabilmektedir. Fakat glukoz, sükroz, laktoz gibi çok sayıda karbonhidratı kullanabilme aktivitesi zayıftır (Dalsgaard ve Madsen, 2000; Nematollahi ve ark., 2003).

*F. psychrophilum* izolatları, S tipi (düzgün kenarlı sirküler ve hafif kabarık) ve R tipi (kenarları düzgün olmayan, yüzeyi buruşuk ve granüler) karakterde sarı renkli koloniler oluşturabilir ve fleksirubin pigment üretebilmektedirler (Jooste ve Hugo, 1999). Pepton buyyon'da üretildiğinde S tipi koloniler, tüplerin tabanında çökelti oluşturur; R tipi kolonilerde ise çökelti görülmez (Bernardet ve Kerouault, 1989; Högfors-Rönholm ve Wiklund, 2010). Balıklardan izole edilen her iki koloni tipine sahip izolatların virüent özellik gösterebildiği, dış membran protein ve lipopolisakkarit profillerinin benzer olduğu ve S tipi fenotiplerin daha hidrofobik ve daha fazla yapışkan özellik gösterdiği bildirilmiştir (Högfors-Rönholm ve Wiklund, 2010).

*F. psychrophilum* tryptone yeast extract salts (TYES) agar veya Cytophaga agar gibi düşük nutrientli besiyerlerinde üreyebilmektedir. TYES agarda üreyen koloniler sahanda yumurta görünümünde parlak sarı görülmektedir. Kanlı agar ve nutrient agarda üreyemeyen etken, 5-23°C arasında ve %0-1 NaCl'de üreyebilmektedir. Etken optimal olarak 15°C'de üremekte ve koloniler 5-7 günde oluşmaktadır (Holt ve ark., 2012; Madsen ve ark., 2005)

### 2.3.1.3. Epidemiyoloji

Salgınların özellikle koho salmon ve gökkuşacağı alabalığı gibi salmonid balıklarda 10°C altındaki su sıcaklıklarında görülmesi nedeniyle 1960 yılında Borg, *F.*

*psychrophilum*'un neden olduğu hastalığa bakteriyel soğuk su hastalığı adını vermiştir (Holt ve ark., 1993).

1980'li yıllarda Avrupa'daki yavru gökkuşağı alabalıklarında yüksek mortalite ile seyreden ve gökkuşağı alabalığı yavru sendromu (RTFS) olarak adlandırılan hastalığın etkenin *F. psychrophilum* olduğu bildirilmiştir (Lorenzen ve ark., 1991; Madsen ve Dalsgaard, 1999). Daha büyük balıklarda kronik seyir gösteren ve kuyruk bölgesinde erozyonlara sebep olan hastalık, pedünkül hastalığı olarak adlandırılmıştır.

*F. psychrophilum*'un neden olduğu enfeksiyonlar tüm salmonid grubu balıkları etkilemekle beraber gökkuşağı alabalığı ve koho salmonların en duyarlı türler olduğu rapor edilmiş ve ayu, yılan balığı ve sazan gibi endemik balık türlerinin, baraj ve nehir sistemlerinde yaşayan salmonid türleri için rezervuar olabileceği bildirmiştir (Nematollahi ve ark., 2003). Etkenin klinik semptom göstermeyen endemik balıklardan da izole edilmesi doğal mikrobiyotada yer aldığını göstermektedir (Madetoja ve ark., 2002; Madsen ve ark., 2005).

Bulaşma; horizontal ve vertikal yolla olabilmekte, duyarlı balıkların etkenle teması ve anaç balıkların sperm ve yumurtaları aracılığı ile hastalık yayılmaktadır. (Kumagai ve Nawata, 2011). Etkenin kıtalararası yayılımında ise canlı balık ve yumurta ticareti önemli bir risk faktörüdür (Holt ve ark., 2012).

Laboratuvar çalışmalarında, *F. psychrophilum*'un 15°C su sıcaklığında 300 gün hayatta kalabilme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Madetoja ve ark., 2003).

Soğuk su hastalığında özellikle 15°C 'ye kadar su sıcaklıklarında %50'ye varan mortalite görülürken, gökkuşağı alabalığı yavru Sendromu (RTFS)'nda, su sıcaklığının 10°C'nin altında olduğu işletmelerde ortalama 0,1- 2 gram'lık balıklarda % 70'e varan mortalite oluşabilmektedir (Bernardet ve Bowman, 2015; Cipriano ve Holt, 2005).

Ülkemizde yetiştiricilik yapılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kuluçkahanelerinden *F. psychrophilum*'un etken olduğu salgınlar 1997 yılından itibaren sıklıkla rapor edilmiştir (Balta, 1997; Çağırgan ve ark., 1997; Didinen ve ark., 2007; Diler ve ark., 2003; İspir ve ark., 2004; Korun ve Timur, 2001; Kubilay ve ark., 2009; Ozcan ve Sarieyyupoglu, 2014; Timur ve ark., 2004).

#### 2.3.1.4. Klinik bulgular

*F. psychrophilum*; koho salmon ve gökkuşığı alabalığı gibi duyarlı türlerde yumurta kabuğunda yumuşama, erken çatlama ve yumurta kesesinde yırtılma gibi sorunlara neden olabilmektedir (Holt ve ark., 2012; Kubilay ve ark., 2009; Madetoja ve ark., 2002). Ayrıca gökkuşığı alabalığı frylarında iştahsızlık, deride hiperpigmentasyon (kararma), adipoz ve kaudal yüzgeç çevresinde omuriliğe kadar ulaşan ülseratif lezyonlar görülebilmektedir. Yavru ve genç balıklarda soğuk su hastalığında, alt çenede ülser, solungaç ve karaciğerde solgunluk, egzoftalmus, deride hiperpigmentasyon, pullarda dökülme, asites, spiral tarzda yüzme, dalakta büyüme ve özellikle kaudal pedünkülde erozyon sıklıkla bildirilen semptomlardır. Pedünkül hastalığı ise daha çok 100 g ve üzeri balıklarda görülebilmektedir. Deride hiperpigmentasyon, iştahsızlık gibi genel semptomların yanı sıra adipoz yüzgeç etrafından başlayarak kaudal pedünküle doğru ilerleyen erozyonlar görülmektedir (Austin ve Austin, 2016; Nilsen ve ark., 2011a ve Nilsen ve ark., 2011b).

#### 2.3.2. *Flavobacterium columnare*

##### 2.3.2.1. Tarihçe

Kolumnaris ilk olarak 1922 yılında Davis tarafından Mississippi Nehri'nde sazan balıklarından izole edilmiştir. Etken bu yıllarda kültüre edilememiş ancak doku lezyonlarından hazırlanan preparatlarda çok sayıda ince uzun basilin görüldüğü bildirilmiştir. Bu nedenle etken ilk olarak *Bacillus columnaris* olarak isimlendirilmiştir (Declercq ve ark., 2013). Daha sonra 1944 yılında Ordal ve Rucker tarafından sockeye salmonlarında (*Onchorhynchus nerka*) söz konusu etken kültüre edilerek izole edilmiştir. Morfolojik özellikler dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada etken Myxobacteria takımına dahil edilmiş ve yaşlı kültürlerde mikrokistik (fruiting bodies) yapılar oluşturmasından dolayı *Chondrococcus columnaris* olarak adlandırılmıştır (Ordal ve Rucker, 1944). 1945 yılında Garnjobst, morfolojik olarak *Chondrococcus columnaris*'e benzeyen fakat mikrokist yapısını oluşturmayan etkeni *Cytophagaceae* familyasına dahil etmiş ve *Cytophaga columnaris* olarak isimlendirilmiştir (Declercq ve ark., 2013; Garnjobst, 1945). 1980'li yılların sonuna doğru Bernardet ve Grimont

etkeni yeniden sınıflandırarak *Flexibacter* genusuna dahil etmiş ve *Flexibacter columnaris* olarak isimlendirmiştir (Bernardet ve Grimont, 1989). 1996 yılında DNA-rRNA hibridizasyon, protein ve yağ asit profillerine göre yapılan son sınıflandırmada ise etken *Flavobacteriaceae* ailesine aktarılarak *Flavobacterium columnare* olarak isimlendirilmiştir (Bernardet ve ark., 1996).

### 2.3.2.2. Etiyoloji

*F. columnare*; rizoid yapıda, düz, yaygın kenarlı sarı renkli koloni oluşturan, fleksirubin pigment üreten Gram negatif ince uzun (4–8×0,5–0,7 µm) bir basildir. Etken hareketsiz (flagella, fimbria ve pilus bulunmama) olup kayma hareketi yapmaktadır. Oksidaz, katalaz, H<sub>2</sub>S, kongo red absorpsiyonu pozitif özellik gösterirken metil red, voges proskauer indol, lizin ve ornithin dekarboksilaz negatif olup nitratı indirgeyebilir. Kazein, jelatin ve tributyrini hidrolize edebilirken eskülin, selüloz, kitin, nişasta ve tyrosini parçalayamamaktadır. *F. columnare* genellikle 4–30°C aralığında ve %0-0,5 NaCl'de üreyebilmektedir. Ayrıca arabinoz, sellobiyoz, glukoz, laktoz, mannitol, rafinoz, salisin, sukroz ve ksiloz fermente edememektedir (Austin ve Austin, 2016).

### 2.3.2.3. Epidemiyoloji

Akuatik çevrede yaygın olarak bulunan *F. columnare*'nin neden olduğu kolumnaris hastalığı; yavru alabalıklarda (1-3 g) genellikle su sıcaklığının 13°C'nin üzerine çıktığı dönemlerde görülmekte, yüzgeçlerde aşınma, vücut üzerinde yaygın eritemik odaklar ve solungaç filamentlerinde nekroza neden olmaktadır (Austin ve Austin, 2016; Bernardet ve Bowman, 2006).

Kolumnaris hastalığına; kanal kedi balığı (*Ictalurus punctatus*), sazan (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Cyprinus auratus*), yılan balığı (*Anguilla rostrata*, *A. japonica*, *A. anguilla*), tilapia (*Oreochromis* spp.), gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), kahverengi alabalık (*Salmo trutta*), kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) başta olmak üzere 36 farklı tatlı su balığının duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Declercq ve ark., 2013).



Kolumnaris hastalığına her yaş ve boydaki balıklar duyarlı olup daha çok yavru balıklar etkilenmektedir (LaFrentz ve ark., 2012). Su sıcaklığı, çözülmüş oksijen seviyesi, stok yoğunluğu gibi çevresel stres faktörleri hastalığın şiddetini etkileyebilmektedir (Bernardet ve Bowman, 2006; Wakabayashi, 1993).

*F. columnare* horizontal yolla bulaşma göstermektedir. Portör balıklar, alet ekipman ve balık nakilleri hastalığın yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Hastalığın vertikal olarak bulaşma göstermediği bilinmektedir. Ancak 2016 yılında Loch ve Faisal salmonid balıkların üreme sınırlarında etkeni izole ettiklerini bildirmişlerdir. (Loch ve Faisal, 2017).

Kolumnaris hastalığında mortalite, su sıcaklığına bağlı olarak %10-100 arasında değişmekte, stres ve düşük su kalitesi gibi durumlarda enfeksiyonun şiddeti artmaktadır. Salmonid balıklarda salgınlar genellikle su sıcaklığının 12°C'nin üzerinde olduğu dönemlerde görülmektedir (Austin ve Austin, 2016; Bowser, 1973). Hastalık özellikle durgun sularda yaşayan yılan balıklarında yüksek mortalitelere neden olmakta; böylece mortaliteler sudaki çözülmüş oksijen seviyesi ile ters orantılı seyir göstermektedir (Chen ve Kuo, 1982). Ayrıca, çözülmüş oksijen seviyesi yeterli iken, amonyak seviyesindeki artışla birlikte ölümlerinde arttığı bildirilmiştir. Collins (1970) göl suyundaki ötrifikasyonun artışına paralel olarak sudaki *F. columnare* etkenlerinin arttığını göstermiştir. *F. columnare* laboratuvar koşullarında distile suda konakçı dışında en az 5 ay, göl suyunda 2 yıldan fazla hayatta kalabilmektedir. *F. columnare* konakçı dışında hayatta kaldığında, enerji kullanımını azaltmak için, koloni morfolojisini değiştirerek virulens formdan daha az virulens forma dönüşür (Loch ve Faisal, 2017).

Ülkemizde *F. columnare* ilk defa 1998 yılında gökkuşuğu alabalığı işletmesinde ortaya çıkan salgından izole edilmiştir (Balta ve Cagırgan, 1998). Daha sonra Aydın, Denizli, Isparta, Kayseri, Manisa, Mersin, Muğla ve Ordu'dan de izole edildiği bildirilmiştir (Kubilay ve ark., 2008; Öztürk ve Altınok, 2014; Yıldırım ve Özer, 2010).

#### **2.3.2.4. Klinik bulgular**

Kolumnaris hastalığında yavru balıklarda, ölümden önce önemli bir patolojik bulgu dikkat çekmemekte, ancak solungaç dokusunda dejenerasyonlar görülebilmektedir (Austin ve Austin, 2016; Loch ve Faisal, 2017).

Fingerling ve büyük balıklarda; solungaçların çevresinde başlayan ve solungaç kemerinin tabanına doğru yayılan sarı turuncu renkte nekroz alanları görülür. Zamanla solungaç filamentlerinin tamamında nekroz alanları şekillenir. Dorsal ve pelvik yüzgeçlerde şekillenen erozyon ilerleyen dönemlerde kas tabakasına kadar uzanabilmekte ve bu lezyonlar toplam balık yüzeyinin %20-25'ini kaplayabilmektedir. Dorsal yüzgeçte eyer şeklinde deformasyonların oluşması sebebiyle hastalık sırtı eyerli anlamına gelen "saddle-back" isimi ile de bilinmektedir (Loch ve Faisal, 2017; Sarti ve Giorgetti, 1996; Wakabayashi, 1991).

#### **2.3.3. *Flavobacterium branchiophilum***

##### **2.3.3.1. Tarihçe**

Bakteriyel solungaç hastalığı ilk olarak Amerika'da 1926 yılında Davis tarafından kaynak alabalığı ve gökkuşuğu alabalığında meydana gelen salgından rapor edilmiştir. Fakat etken 1978'e kadar konvansiyonel besiyerlerinde üretilenmemiştir (Kimura ve ark., 1978). İlk olarak Kimura ve ark. (1978) Amerika, Japonya ve Macaristan'daki hasta balıklardan izole edilen etkenin fenotipik karakterizasyonunu yaparak *Flavobacterium branchiophila* olarak isimlendirilmiştir (Farkas, 1985; Wakabayashi ve ark., 1989). Von Graevenitz tarafından 1990 yılında yapılan son sınıflandırmada ise etken *Flavobacterium branchiophilum* olarak isimlendirilmiştir (Starliper, 2012; Von Graevenitz, 1990).

##### **2.3.3.2. Etiyoloji**

*F. branchiophilum*, Gram negatif, aerobik, genellikle ikili üçlü zincirler halinde bulunan ince uzun ( $5-8 \times 0.5 \mu\text{m}$ ) bir basildir. Etken sirküler, kenarları düzgün S tipi karakterde karotenoid pigmenti bulunmasından dolayı sarı renkte koloniler vermekte

ve fleksirubin pigmenti üretmemektedir. Flagellasız olduğu için aktif hareket yapmamakta ve kayma hareketi görülmemektedir.

Oksidaz ve katalaz pozitif özellik gösterirken H<sub>2</sub>S ve indol negatif olup nitratı indirgeyemez. Kazein, jelatin, lesitin, nişasta, tween, ve tirozini hidrolize edebilirken selüloz ve kitini parçalayamazlar (Bernardet ve Nakagawa, 2006). *F. branchiophilum* 5-30°C 'de ve 0- 0,1 % NaCl'de üreyebilmektedir. Sellobioz, fruktoz, glukoz, inulin, maltoz, melibiose, rafinoz, sukroz ve trehaloz gibi karbonhidratları fermente edebilirken, adonitol, arabinoz, dulcitol, galaktoz, inositol, laktoz, mannitol, salisin, sorbitol ya da ksilozu fermente edemezler (Austin ve Austin, 2016; Ko ve Heo, 1997; Starliper, 2012).

### 2.3.3.3. Epidemiyoloji

Bakteriyel Solungaç Hastalığı (BGD) etkeni *F. branchiophilum* akuatik çevrede yaygın olarak bulunabilmektedir. Hastalık Amerika, Kanada, Japonya, Kore, Macaristan, Hindistan ve Hollanda gibi birçok ülkede rapor edilmiştir (Farkas, 1985; Heo ve ark.,1990; Ko ve Heo, 1997; Ostland ve ark., 1994; Swain ve ark., 2007; Wakabayashi ve ark., 1989). Ülkemizde Bakteriyel solungaç hastalığının bildirimini henüz yapılmamıştır (Öztürk ve Altınok, 2014).

Etken gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) başta olmak üzere birçok salmonid (*Salvelinus fontinalis*, *Salv. fontinalis timagamensis*, *Salv. namaycush*, *Salv. fontinalis X Salv. namaycush*, *O. tshawytscha*, *O. masou*, *O. nerka*, *Salmo salar*, *Salm. trutta*) ve salmonid olmayan balıklardaki [yayın (*Silurus glanis*), turna (*Stizostedion vitreum*), sazangillerden (*Labeo rohita*, *Catla catla*, *Hypophthalmichthys molitrix*)] hastalık salgınlarından rapor edilmiştir (Starliper, 2012).

BGD; genellikle ilkbahar, yaz başında su sıcaklıklarında meydana gelen artışa bağlı olarak özellikle kültür yapılan balıklarda ortaya çıkmakta ve daha sık olarak yavru balıkları etkilemektedir (Bernardet ve Bowman, 2006).

*F. branchiophilum*; su sıcaklığının 5-19°C arasında olduğu dönemlerde hastalık vakalarından izole edilebilmekte ve su-sedimentte uzun süre canlı kalabilmektedir (Bullock ve ark.,1991; Bullock ve ark., 1994; Farkas, 1985). Hastalığın şiddetlenmesinde stok yoğunluğu artması, su kalitesinin düşmesi (amonyak

konsantrasyonun artması, türbidite ve düşük oksijen seviyesi) gibi çevresel ve stres faktörleri önemli rol oynamaktadır (Austin ve Austin, 2016; Starliper, 2012).

*F. branchiophilum* balıklarda çok bulaşıcı olup, horizontal yol ile yayılmaktadır. Etkenin solungaç dokusuna kolonize olması 1 saatten kısa bir sürede gerçekleşebilmektedir (Ferguson ve ark., 1991). Virü lent ve avirü lent *F. branchiophilum* suşları solungaçlara tutunabilmekte fakat sadece virü lent olan suşlar kolonize olabilmektedir (Ostland ve ark., 1995). Ortamdan ölü balıklar uzaklaştırılmadığı ve hızlı bir şekilde tedaviye başlanılmadığı durumlarda morbidite %80, mortalite ise % 50'ye ulaşabilmektedir (Austin ve Austin, 2016).

#### **2.3.3.4. Klinik bulgular**

Bakteriyel solungaç hastalığı etkeni non-invazif bir özellikte olup genel olarak solungaç dokusunu etkilemektedir. Hastalık durumunda solungaçlar etkilediğinden solunum fonksiyonunda azalmaya bağlı olarak su yüzeyinde yüzme, hızlı bir şekilde soluk alıp verme, iştahsızlık, letarji, operkulumda bilateral şişme ve aşırı mukus artışı en yaygın görülen semptomlardır (Austin ve Austin, 2016).

#### **2.3.4. Diğer Flavobacterium türleri**

*Flavobacteriaceae* ailesi oldukça geniş bir ekolojik yaşam alanına sahiptir. Bu ailedeki türler; omurgasızlar, amfibianlar, reptiller, kuşlar ve hatta memelilerde de hastalıklara sebep olabilmektedir. *Flavobacteriaceae* ailesinde balıklarda enfeksiyona sebep olan türler arasında *Flavobacterium* spp., *Tenacibaculum* spp., ve *Chryseobacterium* spp. gibi önemli türler de bulunmaktadır (Bernardet ve Bowman, 2015; Loch ve Faisal, 2015; Loch ve Faisal, 2017). *Flavobacterium* türlerinin son sınıflandırılması ve ilgili literatür incelemelerine göre 196 *Flavobacterium* türü bildirilmiştir (Anonim, 2018).

*Flavobacterium* spp. su ürünleri yetiştiriciliği ve doğada yaşayan balıklarda oluşturduğu salgınlar nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Loch ve Faisal, 2015).

Balıklardaki *Flavobacterium* türlerinin neden olduğu hastalık salgınları ve bunlarla mücadeleyi amaçlayan çalışmaların büyük çoğunluğu *Flavobacterium psychrophilum*, *F. columnare* ve *F. branchiophilum*'i konu alırken, son zamanlarda yeni *Flavobacterium* türlerinin de balıklarda hastalık salgınlarına yol açtığı rapor edilmiştir (Loch ve Faisal, 2015; Loch ve Faisal, 2017).

*F. johnsoniae*'nin; salmonid, yılan balığı (*Anguilla mossambica*), sazan (*Cyprinus carpio*) ve juvenil barramundi (*Lates calcarifer*) balıklarının deri, yüzgeç ve çenesinde ülseratif lezyonlara sebep olduğu (Carson ve ark., 1993; Rintamäki-Kinnunen ve ark., 1997) tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada ise gökkuşuğu alabalıklarında etkenin Koch postulatlarını sağladığı bildirilmiştir (Soltani ve ark., 1994). Türkiye'de ise etken ilk defa sağanak yağış sonrası Rus mersin balıklarında vücut yüzeyinde ülser alanları ile seyreden bir salgından izole edilmiştir (Karataş ve ark., 2010).

Amerika'da bakteriyel solungaç hastalığı semptomları gösteren salmonidlerden *F. hydati*s, chinook salmon fingerlinglerinin (*O. tshawytscha*) kaudal yüzgeçlerindeki erezyonlardan ise *F. succinicans* izole edilmiştir (Anderson ve Ordal, 1961).

Son yıllarda; yetiştiricilikte su kalitesinin bozulması ve strese bağlı olarak salmonidlerde görülen eksternal lezyonlardan *F. oncorhynchi*, *F. araucanum*, *F. chilense*, *F. plurextorum* ve *F. spartani* sp. gibi yeni türler rapor edilmiştir (Loch ve Faisal, 2015; Loch ve Faisal, 2017). Fakat izole edilen bu yeni *Flavobacterium* türlerinin ekolojisi, bulaşması ve patogenezi hakkında ayrıntılı bir bilgiye ulaşılamamıştır (Austin ve Austin, 2016; Loch ve Faisal, 2017).

### **2.3.5. *Flavobacterium* spp. enfeksiyonlarında teşhis**

Teşhis, su kalitesi parametreleri, balık davranışları, klinik bulgular, histopatoloji ve etken izolasyonu ile fenotipik karakterizasyonu dikkate alınarak yapılmalıdır. Teşhisin doğrulanmasında mutlaka moleküler ve serolojik testlerin yapılması önerilmektedir (Loch ve Faisal, 2017).

### 2.3.5.1. Klinik ve postmortem inceleme

Klinik olarak *Flavobacterium* enfeksiyonlarda genellikle solungaç ve deride lezyonlar gözlemlenmektedir. Lezyonlu bölgelerden hazırlanan tuşe preparatların ışık mikroskopunda incelenmesinde tek tek veya saman yığını şeklinde kümelenmiş uzun basillerin görülmesi teşhise yardımcı olabilmektedir (Loch ve Faisal, 2017).

### 2.3.5.2. Primer izolasyon ve ön teşhis

Etken, eksternal lezyonlar, karaciğer, böbrek dalak, beyin ve asites sıvısından izole edilebilir. İzolasyon için Tryptone-yeast Extract-salts agar (TYES agar) veya Anacker Ordal Agar kullanılmalı ve 18°C 5-7 güne kadar inkube edilmelidir (Austin ve Austin, 2016; Loch ve Faisal, 2017).

Saf olarak üretilen sarı renkli kolonilerden ön teşhis; Gram negatif uzun basil, oksidaz, katalaz pozitif, spor oluşturmeyen, fleksirubin ve/veya karatoneid pigment üreten, aktif hareket yapmayan, kayma hareketi görülme/görülme gibi özellikler dikkate alınarak yapılır. Bu özellikleri taşıyan bakterilerin *Flavobacteriaceae* üyesi (*Flavobacterium* spp., *Crysobacterium* spp. *Myroides* spp. vb) olarak ön teşhis yapılabilmektedir. Bazı *Flavobacterium* spp. etkenlerinin fenotipik özelliklerine ilişkin ayırıcı özellikleri Tablo 1’de verilmiştir (Austin ve Austin, 2016; Bernardet ve Bowman, 2015; Loch ve Faisal, 2017).

### 2.3.5.3. Serolojik teşhis

*F. psychrophilum* için poliklonal antikor kullanılarak geliştirilen ELISA (enzim ilintili immün test) ve floresan antikor testi (FAT) geliştirilmiştir. Fakat poliklonal antikorların, *Flavobacterium* genusundaki diğer bakterilerle çapraz reaksiyon verdikleri için kullanımı sınırlıdır. 2009 yılında Lindstorm ve ark. tarafından *F. psychrophilum*’un spesifik dış membran proteinleri kullanılarak oluşturulan monoklonal antikorlar serolojik teşhisde (ELISA ve FAT) kullanılabilir (Lindstrom ve ark., 2009).

*F. columnare* için monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan indirekt floresan antikor testiyle (IFAT) etken solungaç ve bağırsak dokusundan tespit edilebilmektedir. 2006 yılında Panangal ve arkadaşları monoklonal antikor kullanılarak IFAT yöntemi

ile de bakteri kültürlerinden çok kısa bir sürede serolojik teşhis yapılabildiğini bildirilmişlerdir (Panangala ve ark., 2006).

*F. branchiophilum*'un serolojik teşhisi ise poliklonal antiserum ve monoklonal antikor kullanılarak IFAT ile solungaç dokusundan yapılabilmektedir (Loch ve Faisal, 2017).

#### 2.3.5.4. Moleküler teşhis

*F. psychrophilum*'un; taze, donmuş ve formalinle fikse edilmiş doku ve çevresel örneklerden, PCR, nested PCR (nPCR), multiplex PCR, reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) ve quantitative PCR (qPCR) gibi moleküler yöntemler kullanılarak teşhisi yapılabilmektedir (Loch ve Faisal, 2017). Teşhiste genel olarak 16S rRNA bölgesi ve korunmuş gen bölgeleri kullanılır. Nested PCR metodu ile etken dokudan veya sudan 3 kob/mg konsantrasyonlarına kadar tespiti yapılabilmektedir (Madetoja ve Wiklund, 2002). Ayrıca *F. psychrophilum*'un PCR ile teşhisinde hem *gyrA* hemde *gyrB* bölgesi birlikte kullanılarak dubleks PCR yapılmaktadır (Siekoula-Nguedia ve ark., 2012).

Welker ve ark. (2005); *F. columnare*'nin konvansiyonel PCR analizinde 16S-23S rDNA ara bölgelerinin kullanmış ve bu bölgenin spesifite ve sensitivite açısından diğer gen bölgelerine oranla daha hassas sonuçlar verdiğini bildirmiştir (Welker ve ark., 2005). Ayrıca qPCR ile 3 kob/mg konsantrasyonlarına kadar etkenin tespiti yapılabilmektedir (Panangala ve ark., 2007).

*F. branchiophilum*'un moleküler teşhisinde konvansiyonel PCR ve daha pahalı bir metod olan yeni nesil dizi analizi kullanılmaktadır (Loch ve Faisal, 2017).

2011 yılında Lievens ve arkadaşları tarafından geliştirilen multiplex PCR ile aynı anda *F. psychrophilum*, *F. columnare* ve *F. branchiophilum*'un teşhisi PCR ile yapılabilmektedir (Lievens ve ark., 2011).

Diğer *Flavobacterium* türlerinin teşhisinde ise spesifik bir metod bulunmamaktadır. Son yıllarda *Flavobacterium* spp. türlerinin moleküler teşhisi için önce universal primerler kullanılarak 16S rRNA amplifiye edilmekte, sonrasında elde edilen PCR ürünleri çift yönlü dizi analizine tabi tutularak tür identifikasyonu yapılmaktadır (Loch ve Faisal, 2017).

**Tablo 1.** Flavobacterium genusundaki türlerin ayırıcı biyokimyasal ve morfolojik özellikleri.

	<i>F. aquatile</i>	<i>F. aquidurens</i>	<i>F. antarcticum</i>	<i>F. branchiarum</i>	<i>F. branchiicola</i>	<i>F. branchiophilum</i>	<i>F. collinsii</i>	<i>F. columnare</i>
<b>İzolasyon</b>	İlık tatlı su	İlık tatlı su	Kutuplarda toprak	Solungaç dokusunda	Solungaç dokusunda	İlık tatlı su, tatlı su balıkları	Tatlı su balık iç organ	İlık tatlı su, tatlı su balıkları
<b>Koloni Morfolojisi</b>	Konveks, sirküler ve düzgün kenarlı	Düz, yaygın ve düzensiz kenarlı	Konveks, sirküler, düzgün kenarlı	Sarı sirküler, düzgün kenarlı	Sarı sirküler, düzgün kenarlı	Sarı, sirküler, düzgün kenarlı	Sarı, sirküler, düzgün kenarlı	Düz, ağara yapışan ve rizoid
<b>Kongo Red absorpsiyonu</b>	-	Nd	-	-	-	-	-	+
<b>Kayma Hareketi</b>	D	-	D	-	-	-	-	+
<b>Fleksirubin Pigment üretimi</b>	-	+	-	+	+	-	+	+
<b>Marine Ağarda üreme</b>	-	Nd	+	-	-	-	-	-
<b>TSA'da Üreme</b>	(+)	+	+	+	+	-	+	-
<b>Üreyebildiği Sıcaklık Aralığı (°C)</b>	15-30	13-30	5-24	15-25	15-25	5-30	15-25	15-37
<b>Optimum Üreme Sıcaklığı (°C)</b>	Nd	19-28	21	20	20	18-25	22	25-30
<b>Tuz Toleransı (% NaCl)</b>	0	0-1	0-4	0-2	0-2	0-0.2	0-2	0-0,5
<b>Glukoz Kullanımı</b>	Nd	+	-	-	-	+	-	-
<b>Karbonhidratlardan asit üretimi</b>	+	Nd	+	-	-	+	-	-
<b>Jelatini hidrolizi</b>	+	-	+	-	-	+	-	+
<b>Kazein hidrolizi</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Nişasta hidrolizi</b>	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>Eskülin hidrolizi</b>	+	+	-	+	+	-	+	-
<b>Üreaz üretimi</b>	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>Oksidaz</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>β-Galactosidase</b>	+	+	-	-	-	+	-	-
<b>H<sub>2</sub>S üretimi</b>	-	Nd	-	-	-	-	-	+
<b>Nitrati indirgeme</b>	+	D	-	-	+	-	-	D
<b>DNA G+C oranı (mol%)</b>	32	34	38	35,4	33,6	29-31	35,5	30



Tablo 1'in devamı

	<i>F. cutihirudinis</i>	<i>F. frigidarium</i>	<i>F. frigidimaris</i>	<i>F. frigoris</i>	<i>F. glaciei</i>	<i>F. granuli</i>	<i>F. hercynium</i>	<i>F. hibernum</i>
<b>İzolasyon</b>	Sülük deri yüzeyi	Polar sediment	Polar sediment	Polar sediment	Donmuş Toprak	Atık su, bitki	Ilık tatlı su	Polar tatlı su göleti
<b>Koloni Morfolojisi</b>	Sarı, sirküler, düzgün kenarlı	Düz, Sirküler, düzgün kenarlı	Düz, sirküler filamentöz kenarlı	Düz, Sirküler, düzgün kenarlı	nd	Düz, sirküler ve düzgün kenarlı	Düz ve kenarları belirsiz	Düz, sirküler ve rizoid kenarlı
<b>Kongo Red absorpsiyonu</b>	-	D	-	-	-	-	nd	-
<b>Kayma Hareketi</b>	+	-	+	D	-	-	+	+
<b>Fleksirubin Pigment üretimi</b>	+	-	+	-	-	-	+	+
<b>Marine Ağarda üreme</b>	-	+	+	+	-	-	nd	-
<b>TSA'da Üreme</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Üreyebildiği Sıcaklık Aralığı (°C)</b>	10-30	0-24	2-26	5-25	4-25	15-37	12-29	(-7) - 30
<b>Optimum Üreme Sıcaklığı (°C)</b>	28	15	18	Nd	21	25	20	26
<b>Tuz Toleransı (% NaCl)</b>	0-3	0-9	0-3	0-5	0-1	0-2	0-1	0-2
<b>Glukoz Kullanımı</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Karbonhidratlardan asit üretimi</b>	+	-	+	-	-	-	nd	+
<b>Jelatini hidrolizi</b>	+	+	+	-	+	-	D	+
<b>Kazein hidrolizi</b>	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>Nişasta hidrolizi</b>	+	-	+	+	+	-	+	+
<b>Eskülin hidrolizi</b>	+	+	+	+	+	Nd	+	+
<b>Üreaz üretimi</b>	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>Oksidaz</b>	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>β-Galactosidase</b>	Nd	-	+	-	-	+	+	+
<b>H<sub>2</sub>S üretimi</b>	-	-	-	-	-	-	Nd	-
<b>Nitrati indirgeme</b>	Nd	-	-	D	+	-	+	+
<b>DNA G+C oranı (mol%)</b>	32	35	35	34-35	37	36	38	34

Tablo 1'in devamı

	<i>F. hydatis</i>	<i>F. oncorhynchi</i>	<i>F. pectinovorum</i>	<i>F. piscis</i>	<i>F. plurextorum</i>	<i>F. psychrophilum</i>	<i>F. reichenbachii</i>	<i>F. saccharophilum</i>
<b>İzolasyon</b>	Ilık tatlı su	Gökkuşluğu alabalığı	Toprak	Gökkuşluğu alabalığı böbrek	Gökkuşluğu alabalığı böbrek ve yumurta	Ilık tatlı su ve tatlı su balıklarının doku ve organları	Acı sulardan	Ilık tatlı su
<b>Koloni Morfolojisi</b>	Düz, yaygın ve filamentöz kenarlı	Sirküleri konveks ve düzgün kenarlı	Hafif konveks, sirküleri, düzgün kenarlı	Sirküleri, düzgün kenarlı	Sirküleri, düzgün kenarlı	Sirküleri, düzgün kenarlı veya sahanda yumurta şeklinde	Sirküleri, yaygın üreyen, kenarları düzgün olmayan	Düz, yaygın ağara gömülü tarzda üreme
<b>Kongo Red absorpsiyonu</b>	-	-	-	-	-	-	Nd	-
<b>Kayma Hareketi</b>	+	-	+	-	-	+	+	+
<b>Fleksirubin Pigment üretimi</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Marine Ağarda üreme</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>TSA'da Üreme</b>	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>Üreyebildiği Sıcaklık Aralığı (°C)</b>	5-35	15-30	?-30	15-30	15-30	5-23	6-30	4-30
<b>Optimum Üreme Sıcaklığı (°C)</b>	20-25	25	20-25	25	25	15-20	20-26	25
<b>Tuz Toleransı (% NaCl)</b>	0-2	0-3	?-1	0-3	0-3	0-1	0-2	0-2
<b>Glukoz Kullanımı</b>	+	-	+	+	+	-	-	+
<b>Karbonhidratlardan asit üretimi</b>	+	-	+	-	-	-	Nd	Nd
<b>Jelatini hidrolizi</b>	+	-	+	+	-	+	+	+
<b>Kazein hidrolizi</b>	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Nişasta hidrolizi</b>	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>Eskülin hidrolizi</b>	+	+	+	+	+	-	+	+
<b>Üreaz üretimi</b>	-	-	-	-	-	-	Nd	-
<b>Oksidaz</b>	D	+	V	+	+	+	+	D
<b>β-Galactosidase</b>	+	+	+	-	-	-	+	+
<b>H<sub>2</sub>S üretimi</b>	-	-	-	-	-	-	Zayıf	+
<b>Nitrati indirgeme</b>	+	+	+	+	+	-	-	+
<b>DNA G+C oranı (mol%)</b>	32-34	33	34 (36)	34	33.2	32 (33-34)	34,3	32-36

Tablo 1'in devamı

	<i>F. spartansü</i>	<i>F. succinicans</i>	<i>F. terrigena</i>	<i>F. tiangeerense</i>	<i>F. tractae</i>	<i>F. xueshanense</i>
<b>İzolasyon</b>	Chinook Salmon böbrek dokusu	Ilık tatlı su	Toprak	Buzul	Alabalık	Buzul
<b>Koloni Morfolojisi</b>	Düz, yaygın ve filamentöz kenarlı	Düz, yaygın ve filamentöz kenarlı	Sirküler, konveks ve düzgün kenarlı	Sirküler, konveks ve düzgün kenarlı	Sirküler, konveks ve düzgün kenarlı	Sirküler, konveks ve düzgün kenarlı
<b>Kongo Red absorpsiyonu</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Kayma Hareketi</b>	+	+	-	-	-	-
<b>Fleksirubin Pigment üretimi</b>	+	-	+	-	+	-
<b>Marine Ağarda üreme</b>	-	-	-	-	-	Nd
<b>TSA'da Üreme</b>	+	+	-	+	+	+
<b>Üreyebildiği Sıcaklık Aralığı (°C)</b>	Nd	2-37	10-30	4-26	15-30	2-18
<b>Optimum Üreme Sıcaklığı (°C)</b>	22	25	25	22-23	25	14
<b>Tuz Toleransı (% NaCl)</b>	0-2	Nd	Nd	0-0,5	0-3	0-0,5
<b>Glukoz Kullanımı</b>	-	+	Nd	-	+	+
<b>Karbonhidratlardan asit üretimi</b>	Nd	+	-	-	-	+
<b>Jelatini hidrolizi</b>	+	+	+	-	+	-
<b>Kazein hidrolizi</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Nişasta hidrolizi</b>	+	+	-	-	+	-
<b>Eskülin hidrolizi</b>	+	+	-	+	+	+
<b>Üreaz üretimi</b>	-	+	Nd	-	-	-
<b>Oksidaz</b>	+	D	+	+	+	+
<b>β-Galactosidase</b>	D	+	-	-	-	-
<b>H<sub>2</sub>S üretimi</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Nitrati indirgeme</b>	+	D	-	-	+	-
<b>DNA G+C oranı (mol%)</b>	35,6	38 (34-37)	38,2	34,8	36,2	37,2

Nd: Tespit edilmemiş, D: Değişken

### 2.3.6. Flavobacterium enfeksiyonlarında koruma-kontrol

#### 2.3.6.1. İşletme yönetimi

Balıkları olabildiğince stresten uzak tutma ve su kalitesinin devamlılığını sağlama gibi işletme yönetimi ilgili faktörler Flavobacteriumların türlerinin neden olduğu ölümlerin azaltılmasında koruyucu rol oynamaktadır (Loch ve Faisal, 2017).

Suda, nitrit ve organik madde miktarının artması, *F. columnare* ve *F. psychrophilum* etkenlerinin balıkların solungaçlara tutunması ve kolonizasyonunu artırmaktadır (Decostere ve ark., 1999; Nematollahi ve ark., 2003). Aynı şekilde sudaki çözülmüş oksijen konsantrasyonunun düşmesi ve amonyak miktarının artması da bakteriyel solungaç hastalığının ortaya çıkışını kolaylaştırmaktadır (Loch ve Faisal, 2017).

Kuluçkahaneye giren suyun ultraviyole (UV) ile dezenfekte edilmesi ile; sudaki *Flavobacterium* sp.'nin yükü azaltılabilmekte veya tamamen elemine edilebilmektedir. Hedrick ve arkadaşları (2000), birçok Gram negatif etkenin dezenfeksiyonunda santimetre kareye 42 miliwat ( $mWs/cm^2$ ) UV ışınların yeterli olabileceğini ancak *F. psychrophilum*'un elemine edilebilmesi için  $126mWs/cm^2$  UV'nin gerekli olduğunu bildirmişlerdir (Loch ve Faisal, 2017).

Benzalkonyum klorür çözeltisi (600 mg/l) *F. psychrophilum* 'u 10 dakikada inhibe ederken (Oplinger ve Wagner, 2010), virkon, halamid, glutaraldehid'in % 2'lik, 50 ppm iyot ve etenolün %70'lik çözeltileri *F.columnare* ve *F. psychrophilum*'u 1 dakikada inhibe edebilmektedir (Mainous ve Smith, 2012).

Salmonid balıklara, 1000 ppm dozunda formaldehit ile banyo uygulanması ile *F. columnare*'nin 1 dakikada elimine olduğu ancak *F. psychrophilum* 'u eliminasyonu için 10-20 dakika banyo uygulanmasının gerekli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca potasyum permanganat solüsyonu *F. columnare*'yi 1 dakikada inhibe ederken, *F. psychrophilum*'u 1 saat içerisinde bile tam olarak elimine etmediğini bildirmişlerdir (Loch ve Faisal, 2017; Mainous ve Smith, 2012). *F. psychrophilum*'un yüzeylere oluşturduğu biyofilm tabakası ile antimikrobiyallerin ve dezenfektanların etkisini azalttığı bildirilmektedir (Sundell ve Wiklund, 2011).

Gökkuşluğu alabalığı gibi salmonid balıkların gonad ve gonadal sıvılarına özel ilgisi olan *F. psychrophilum* (Brown ve ark., 1997), anaç balıklardan yumurtalara

vertikal olarak taşınabilmektedir. *F. psychrophilum*'un yayılımının önlenmesinde yumurta dezenfeksiyonu büyük önem göstermektedir (Avendafio-Herrera ve ark., 2014).

#### **Yumurta dezenfeksiyonunda;**

- Povidon-iyot 50 mg/l, 30 dakika veya 100 mg/l, 10 dakika,
- Hidrojen peroksit 100 mg/l, 10 dakika
- Glutaraldehitde 200mg/l, 20 dakika süreyle kullanımı etkilidir (Cipriano ve Holt, 2005).

#### **2.3.6.2. Probiyotikler ve immunstimulanlar**

Yem katkı maddesi olarak kullanılan alginik asit ekstraktının, *F. columnare*'a karşı etkili olduğu ve mortaliteyi önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (Suomalainen ve ark., 2009).

Bazı *Pseudomonas* türlerinin in vitro koşullarda *Flavobacterium* spp.'nin üremesini engellediği ve bu türlerin oluşturduğu enfeksiyonlara karşı balıklarda koruma sağladığı rapor edilmiştir. Yapılan in vitro çalışmalarda probiyotik olarak kullanılan *Pseudomonas* spp.'nin inhibisyon etkisinin *F. psychrophilum* serotipleri arasında değişkenlik gösterebileceği bildirilmiştir (Ström-Bestor ve Wiklund, 2011). Boutin ve ark. (2012), kaynak alabalığının deri ve mukusundan izole edilerek hazırladığı çok sayıda probiyotik bakterinin *F. columnare*'yi in vitro olarak inhibe etme yeteneğine sahip olabileceğini bildirmiştir. Aynı araştırmacıların yaptığı farklı bir çalışmada ise balıklarda kolonize olmayan fakat biyofilm oluşturma yeteneği olan *Rhodococcus* spp.'nin kahverengi alabalıkların doğal mikrobiyotasını bozmadan probiyotik etki sağladığı ve *F. psychrophilum* enfeksiyonlarında balıklarda mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir (Boutin ve ark., 2013).

#### **2.3.6.3. Dirençli balıkların yetiştirilmesi**

Batı Virjinya'da bakteriyel soğuk su hastalığına karşı direnç gösteren bir gökkuşağı alabalığı hattı geliştirilmiştir (Leeds ve ark., 2010; Silverstein ve ark., 2009;

Wiens ve ark., 2014). Bakteriyel soğuk su hastalığına karşı geliştirilen dirençli gökkuşağı alabalığı hatlarının aynı zamanda kolumnaris hastalığına karşı da dirençli olabildiği belirlenmiştir (Evenhuis ve ark., 2015).

#### **2.3.6.4. Bakteriyofaj**

Son zamanlarda Flavobacterium türlerinden kaynaklanan enfeksiyonların kontrol edilmesinde bakteriyofajların (litik aktivite) kullanılmasına yönelik çalışmalar oldukça önem kazanmıştır (Loch ve Faisal, 2017). Prasad ve ark., (2011); *F. columnare* izolatlarını lize eden *F. columnare*-spesifik fajlar izole ettiklerini ve bu fajların kullanımıyla enfekte yayın balıklarının (*Clarias batrachus*) tedavisinde % 100 başarı elde ettiklerini bildirmişlerdir (Prasad ve ark., 2011). *F. psychrophilum* ile deneysel olarak enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarında faj tedavisi ile mortalitenin azaltılabileceği bildirmiştir (Castillo ve ark., 2012). Fakat aynı araştırmada *F. psychrophilum*'un zamanla fajlara karşı direnç geliştirebileceği belirtilmiştir (Castillo ve ark., 2014).

#### **2.3.6.5. Aşılama**

*F. psychrophilum*'a karşı bugüne kadar geliştirilmiş bir lisanslı ticari aşı mevcut değildir. Bunun yapılmasını zorlaştıran bazı engeller bulunmaktadır. Bu engellerin başında; RTFS enfeksiyonlarında olduğu gibi henüz bağışıklık sistemi gelişmemiş olan fry'ların hastalıktan etkilenmesi ve 15 g'ın altındaki balıklara enjeksiyon yöntemiyle aşılamamanın yapılamaması gelmektedir (Sundell ve ark., 2014). Şimdiye kadar, ticari aşularla koruma yalnızca kolumnaris hastalığına karşı sağlanmışken, bakteriyel soğuk su hastalığına karşı sadece Norveç, İngiltere ve Şili gibi birkaç ülkede otojen aşular kullanılmaktadır (Sundell ve ark., 2014). Diğer bir engel ise doğal yol (kohabitasyon) veya immersiyon yöntemiyle tekrarlanabilir deneysel enfeksiyon modelinin oluşturulamamış olmamasıdır. Ayu balıklarında (*Plecoglossus altivelis*) immersiyon yöntemiyle deneysel enfeksiyon modeli geliştirilmişken (Kondo ve ark., 2003), salmonid balıklarda enjeksiyon yöntemi dışında deneysel enfeksiyon modeli oluşturulamamıştır (Lorenzen ve ark., 2010).

Adjuvanlı veya adjuvansız inaktif deneysel aşularla (bakterin) periton içi yolla aşılanması sonrasında, gkkuşıağı alabalığı ve ayu balıklarında spesifik antikor artışı ve iyi bir koruma elde edildiği bildirilmiştir (LaFrentz ve ark., 2002; Sundell ve ark., 2014).

*F. psychrophilum* zorunlu psikrofilik karakterde, yavaş üreyen (5-7 gün) bir bakteri olduğu için, tüm hücre aşıasının ticari olarak hazırlanması ekonomik değildir (Sundell ve ark., 2014). Bu nedenle son yıllarda, rekombinant subunit aşıların geliştirilebilmesi için antijen olarak kullanılabilen; immünojenik hücre yüzey molekülleri, proteinler veya fraksiyonlarının tanımlanması üzerinde durulmaktadır (Crump ve ark., 2005; Gliniewicz ve ark., 2012; LaFrentz ve ark., 2004). Subunit aşılar, yavru balıklara (fry) oral veya immersiyon yöntemiyle uygulanabilir. Fakat bu subunit aşıların yeterli koruma sağlayamadığı veya koruma sresinin yetersiz olduğu bildirilmiştir (Högfors ve ark., 2008; Rahman ve ark., 2000).

ATP sentaz $\beta$ , factor-Tu ve SufB Fe-S protein gibi proteinler kullanılarak üretilen rekombinant aşıların spesifik antikor miktarında artışa neden olduğu ancak balıklarda yeterli koruma sağlamadığı bildirilmiştir (Plant ve ark., 2011).

Dış membran proteinlerinin subunit aşı hazırlanması için önemli bir komponent olduğu, periton içi yolla verilen subunit aşıların koruyuculuğunun jüvenil gkkuşıağı alabalıklarında % 93–95 ve ayu balıklarında % 64–71 olduğu bildirilmiştir (Dumetz ve ark., 2006).

Son zamanlarda şili’de lisanslı *F. psychrophilum* aşısı (Flavomune<sup>®</sup>, Veterquimica) geliştirilmiştir. Ancak Avrupa lkelerinde otovaksin aşılar kullanılmaktadır (Fredriksen ve ark., 2013). *F. psychrophilum*’a karşı hazırlanan otovaksin aşılar; şili’de somon balığı (Bravo ve Midtlyng, 2007), Norveç’te gkkuşıağı alabalığı (Johansen ve ark., 2011) ve İngiltere’de hem somon hem de gkkuşıağı alabalıklarında kullanılmaktadır (Sundell ve ark., 2014).

*F. columnare* ile ilgili olarak birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen halen virülens mekanizması tam olarak belirlenememiş ve bilinen 4 ana serotipin virülens ile bağlantısının olmadığı bildirilmiştir (Loch ve Faisal, 2017).

Balıkların erken yaşam evrelerinde immun sistem tam olarak gelişmediği için aşılama yoluyla kolumnaris hastalığının kontrolü zordur. Ayrıca *F. columnare* enfeksiyonları, yavru balıkları daha fazla etkilediği için enjeksiyonla aşılamının

hastalığı kontrol etmek için uygun bir strateji olmadığı belirtilmiştir (Sundell ve ark., 2014).

ABD ve Kanada'da salmonidler için ruhsatlı inaktif *F. columnare* immersiyon aşısı (Fryvacc 1) bulunmaktadır. Şili'de salmonidlere yönelik Fryvacc 1'e ek olarak, *F. columnare* ve *Yersinia ruckeri* bivalent Fryvacc 2 aşısı da kullanılmaktadır. (Bravo ve Midtlyng, 2007).

Yayın balığı türlerinde kolumnaris hastalığının önlenmesi için 2005 yılında ABD'de canlı bir attenüe aşı olan Aquavac-Col® piyasaya sürülmüş ancak Aquavac-Col®'in salmonidlerdeki etkinliği bilinmemektedir (Sundell ve ark., 2014).

Kanal kedi balığı ve iri yayın balıklarında (*Micropterus salmoides*) kullanılmak üzere Amerika'da lisanslı atenüe canlı *F. columnare* aşısı (Aquavac-Col®; Merck Hayvan Sağlığı) geliştirilmiştir. Bu aşı immersiyon olarak kanal kedi balığı frylarında %57-97 oranında etkili olduğu bildirilmiştir. (Shoemaker ve ark., 2011).

Asetonla inaktive edilmiş *F. branchiophilum*'un gökkuşağı alabalıklarına immersiyon veya intraperitoneal (İP) enjeksiyon yoluyla vererek bağışıklıkları değerlendirmiş ve 6 hafta ara ile 3 kez banyo yolu ile verilen aşının periton içi uygulamadan daha yüksek bir koruma sağladığı rapor edilmiştir (Lumsden ve ark., 1994).

#### 2.3.6.6. Tedavi

*Flavobacterium* spp. etkenlerinden kaynaklanan hastalıklara yönelik olarak çok sayıda tedavi seçeneği önerilmiştir. Fakat tedavide kullanılacak kimyasalların ruhsatlandırılması ülkelere göre farklılık göstermektedir. Örneğin Amerika'da salmonidlerde *F. columnare* ve *F. psychrophilum*'un tedavisinde florfenikol 10-15 mg/kg CA dozunda 10 gün veya oksitetrasiklin 80 mg/kg CA dozunda 10 gün süreyle kullanılmaktadır (Austin ve Austin, 2016; Loch ve Faisal, 2017).

Eksternal *F. columnare* enfeksiyonlarının tedavisi için; hidrojen peroksit genç ve yetişkin balıklarda gün aşırı kullanılarak 3 kez, 50-75 mg/l dozda 60 dakika banyo yaptırılması, aynı şekilde kloramin T'inde 10-20 mg/l dozda 60 dakika banyo yaptırılması önerilmektedir (Loch ve Faisal, 2017).



Gökkuşığı alabalığı fingerlinglerinde görülen *F. branchiophilum* enfeksiyonlarının tedavisinde; 5% NaCl çözeltilisinde 2 dakika veya %8 NaCl çözeltilisinde 30 saniye banyo yaptırılması önerilmektedir (Loch ve Faisal, 2017).

RTFS'yi tedavisinde sıklıkla kullanılan oksitetrasiklin ve florfenikole karşı antimikrobiyal direnç geliştiği bildirilmiştir (Henríquez-Núñez, ve ark., 2012; Smith ve ark., 2016).

Kültür balıkçılığının sürdürülebilirliği açısından, tedaviye başlamadan önce etkenin izolasyonun mutlaka yapılması ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinde elde edilen sonuçlara göre tedavi uygulanmasına dikkat edilmelidir.

#### **2.4. Antimikrobiyal direnç**

Balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan ve mikro kirletici olarak kabul edilen antimikrobiyaller, organizmalar üzerindeki toksik etkilerinin yanı sıra akuatik florada yer alan bakterilerde direnç gelişimine neden olmaktadır. Bu durumda hastalıkların tedavisi için ya daha yüksek dozda antibiyotik kullanılması ya da antibiyotik tedaviden sonuç alınamaması söz konusu olmaktadır. Yüksek dozda antimikrobiyal kullanılması, akuatik çevrede aktif kalıntı miktarının artmasına, antimikrobiyallere dirençli bakterilerin çoğalmasına ve yaygınlaşmasına neden olmaktadır (De Liguoro ve ark., 2003; Yang ve Carlson, 2004).

Balık, eklem bacaklı (kerevit, karides vd.) ve çift kabuklu yumuşakçalarda (midye, istiridye vd.) hastalık yapan yüzden fazla patojen bakteri bulunmaktadır. Ancak bu patojenlerin küçük bir bölümü kültür balıkçılığını önemli düzeyde etkiler. Akuakültürde patojenlerin eliminasyonu için antimikrobiyallerin kullanılması, direncin yaygınlığını artırabilir ve halk sağlığını tehdit edecek bir boyuta ulaşabilir. Akuakültürde gelişen direncin en riskli niteliği aktarılabilir karakterde olmasıdır (Alderman ve Hastings, 1998; WHO, 2006).

Küresel olarak kültür balığı yetiştiriciliğinde sık karşılaşılan bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılan antimikrobiyal bileşikler ve direnç mekanizmaları Tablo 2'de verilmiştir (Elliott ve Facklam, 1996; Goñi-Urriza ve ark., 2002; Miranda ve ark., 2013; Schmidt ve ark., 2000).

Ülkemizde balık hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 6 farklı etken maddeye ait 46 farmasötik ürün

ruhsatlandırılmıştır. Bu ürünlerden kültür balıklarında en yaygın kullanılan antimikrobiyaller; sırasıyla florfenikol, oksitetrasiklin ve sulfonamid-trimetoprim olarak sıralanabilir. Gökkuşığı alabalıkları, akuatik çevre ve yetiştiricilik ortamlarından izole edilen bakterilerde antimikrobiyal direnç gelişimine yönelik çok sayıda rapor bildirilmiştir. (Akinbowale ve ark., 2007;Alcaide ve ark., 2005;Buschmann ve ark., 2012;Duman ve ark., 2017a; Ho ve ark., 2000).

**Tablo 2.** Gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliğinde en sık izole edilen bakterilere karşı kullanılan antimikrobiyal bileşiklerin etki ve direnç gelişim mekanizmaları (Shah, 2012a).

Sınıf	Antibiyotik	Etki mekanizması	Antibiyotik direnç mekanizması
Aminoglikozidler	Amikasin, gentamisin, kanamisin, streptomisin	Primer hedef olarak 30S ribosomları ile protein sentezini inhibe eder	Dışa atım pompasının aktivasyonu, permeabilite azalması, ribosomların değişikliği, aminoglikozid modifikasyon enzimleri
B-Laktamlar	Penisillinler (amoksisillin), ampicillin, oksasillin	Primer hedef olarak penisillin bağlanan bölgelerle hücre duvarı sentezini inhibe eder	Beta-laktamazlar, penisillin bağlayıcı proteinlerin değişikliği
Florokinolonlar	Siprofloksasin, nalidiksik asit, okzolinik asit, Enrofloksasin	Topoizomerez II ve IV ile DNA sentezini inhibe eder	Porinlerin kaybı, dışa atım pompası, DNA giraz/topoizomerez IV mutasyonu
Glikopeptidler ve glikolipeptidler	Vankomisin	Hedef peptidoglikan ünitelerine bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe eder	Peptidoglikan başlatıcılarının modifikasyonu (düşük bağlanma aktivitesi)
Linkosamidler	Linkomisin	50S ribozomlar aracılığı ile protein sentezini inhibe eder	rRNA metilas, dışa atım pompası, genlerin inaktivasyonu
Makrolidler	Eritromisin	50S ribozomlar aracılığı ile protein sentezini inhibe eder	rRNA metilas, dışa atım pompası, genlerin inaktivasyonu
Fenikoller	Kloramfenikol, florfenikol	50S ribozomlar aracılığı ile protein sentezini inhibe eder	Asetiltransferaz ile asetilasyon, fosfotransferaz, hedef bölge mutasyonları, geçirgenlik bariyeri, dışa atım pompası
Tetrasiklinler	Doksisiklin, tetrasiklin, oksitetrasiklin	30S ribozomlar aracılığı ile protein sentezini inhibe eder	Dışa atım pompası, ribosomal koruma proteinleri ve enzimatik inaktivasyon
Trimetoprim sulfametoksazol	Trimetoprim sulfametoksazol	Folik asit sentezini inhibe eder	Geçirgenlik bariyeri ve/veya dışa atım pompası; doğal olarak hedef enzimlere duyarlı değil; hedef enzimlerde değişiklikler; hedef enzimlerde mutasyonlar; ilaç dirençli hedef enzimlerde kazanılmış direnç

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, herhangi bir antimikrobiyalın belli bir bakteri türüne karşı in vitro etkinliğini belirlemek amacıyla uygulanan testlerdir. İn vitro antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesinde; disk difüzyon, E-testi, agar dilüsyon, broth mikrodilüsyon ve broth makrodilüsyon gibi metotlar kullanılmaktadır. Bu metotların kullanımı ve sonuçlarının değerlendirilmesi sırasında CLSI veya EUCAST tarafından belirlenen standartlara uyulması önem arz etmektedir (Yıldırım, 2010.)

Veteriner hekimlik alanında karasal hayvanlardan izole edilmiş olan bakteriyel patojenler için geliştirilmiş standart protokoller bulunmaktadır. Su hayvanlarında hastalığa neden olan birçok bakteriyel etken, karasal hayvanlardaki bakteriyel

patojenlerden farklı olarak psikrofilik karakterde olmaları nedeniyle üreme koşullarında da farklılıklar göstermektedir. Bu durum su hayvanlarında hastalık oluşturan bakteriyel etkenlerin antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılmasında daha düşük inkübasyon sıcaklığı tercih edilmesine ve/veya besiyeri bileşenlerinde birtakım farklılıklar yapılmasına neden olabilmektedir. Yapılan literatür incelemelerinde; su hayvanlarından izole edilen patojenlerin antimikrobiyal duyarlılık testlerinin belirlenmesinde filogenetik olarak yakın ilişkili ve standartları belirlenmiş olan bir bakteriyi referans alınarak kullanıldığı görülmektedir (CLSI 2014a ve CLSI2014b).

CLSI'nın 2014 yılında yayınladığı standartta sadece *Aeromonas salmonicida* için antimikrobiyal duyarlılık sınır değerleri verilmektedir. Halen birçok balık patojeninin antimikrobiyal duyarlılık sınır değerleri tam olarak belirlenmemiştir. Antimikrobiyal duyarlılık sınırının belirlenebilmesi için; test edilen izolat sayısının en az 30 olması, MİK değerleri ile klinik sonuçlar arasında korelasyon bulunması, test edilen antimikrobiyalin farmakodinamik ve farmakokinetik özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir (CLSI 2014a ve CLSI2014b).

Ayrıca su hayvanlarından izole edilen bakterilerin MİK verilerinin yorumlanması sırasında klinik sınır değerlerin belirlenmesi ve uygulanmasını zorlaştıran birtakım faktörler bulunmaktadır. Kültür balığı yetiştiriciliğinde tuzluluk ve sıcaklık gibi çevresel parametrelerdeki değişimler ilaçların farmakodinamiğini etkileyebilmektedir. Bu nedenle, akuatik ortamda kullanılacak antimikrobiyallerin dozları, konakçının yaşam ortamına ve patojenin türüne göre farklılık gösterebilmektedir (CLSI 2014a ve CLSI2014b).

Fenotipik antimikrobiyal duyarlılık testlerinde, antimikrobiyallerin antibakteriyel etkinlikleri, “duyarlı”, “orta derece duyarlı” veya “dirençli” olarak belirlenmektedir. Ayrıca son zamanlarda bunların dışında epidemiyolojik eşik/duyarlılık değer (cut-off) olarak adlandırılan yeni bir yöntem kullanılmaya başlanmıştır. Birçok laboratuvarında antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarının yorumlanmasında CLSI'nın "ECV" ve EUCAST'in ise "ECOFF" olarak isimlendirdiği epidemiyolojik eşik değerler kullanılmaktadır. Bu yeni yöntemde test edilen izolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının duyarlı, orta derece duyarlı ve dirençli olarak sınıflandırılması doğru bir değerlendirme değildir. Epidemiyolojik eşik değer/duyarlılık sınırı yönteminde, duyarlı tip olarak isimlendirilen izolatlar “Wild

Tip, (WT)”; duyarlılığı azalmış olarak isimlendirilen izolatlar ise “Non-Wild Tip (N-WT)” olarak tanımlanmaktadır (CLSI 2014a ve CLSI2014b; Ngo ve ark., 2017; Smith ve ark., 2016)

Epidemiyolojik eşik değer; türe spesifik olup farklı coğrafi bölgelerdeki laboratuvar araştırmalarından elde edilen MİK verilerinin dağılımını temel almaktadır. CLSI’nin 2014 yılında yayınladığı VET03/04-S2 kodlu standardı revize edilen yeni standartta; 5 farklı laboratuvar, farklı bölgelerden izole edilmiş olan toplam 359 *F. psychrophilum* izolatının 6 farklı antimikrobiyale karşı belirlenen MİK değerleri normalize edilmiş yorumlama metodu (Normalized Resistance Interpretation, NRI) kullanılarak standardize edilen eşik değerler bulunmaktadır.

Smith ve Kronvall (2015) farklı kalite kontrol suşları kullanılarak (*E. coli* ATCC 25922, *A. salmonicida* ATCC 33658 ve *F. psychrophilum* NCIMB 1947) yaptığı araştırmada disk difüzyon testinde oluşan zon çapı değerlerinin inkubasyon sıcaklığı ve süresi ile bağlantılı olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte aynı araştırmacılar; 22°C’den daha düşük inkübasyon sıcaklığı ve normalden daha uzun süreli inkübasyonun hem laboratuvar içinde hem de farklı laboratuvarlar arasında test sonuçlarında farklılıklar oluşturduğunu bildirmiştir (Smith ve Kronvall, 2015). Bu durum *F. psychrophilum* izolatlarının disk difüzyon testi ile antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesinde her zaman doğru sonuçlar elde edilemeyeceğini göstermektedir.

Akuatik çevrede bulunan patojen ve saprofit bakterilerde antimikrobiyal direncin tespit edilmesi, antimikrobiyal direncin karasal ortama (insan ve hayvan) aktarılmasına yönelik önlemlerin alınması yönüyle önem taşımaktadır (Burridge ve ark., 2010; Buschmann ve ark., 2012; Depaola ve ark., 1995). Akuatik ve karasal sistemde yaşayan canlılardan izole edilen bakterilerdeki antimikrobiyal direnç genleri birbirleriyle benzerlik göstermektedir (Cattoir ve Nordmann, 2009; Pan ve ark., 2008; Rhodes ve ark., 2000). Balık patojeni olan *Yersinia ruckeri* ile insan patojeni olan *Yersinia pestis*’in benzer antimikrobiyal direnç genleri ve plazmid bulundurmaları buna örnek olarak gösterilebilir (Barton, 2000). Sonuç olarak Akuakültürde kullanılan antimikrobiyal bileşiklerin akuatik çevreyi kirletmesi, dirençli bakterilerin direnç geni rezervuarı olarak bu genleri yayması ve akuatik ortamda gelişen direncin çoğunlukla

aktarılabılır karakterde olması; sürdürülebilir balıkçılık ve insan sağlığı açısından büyük bir risk oluşturmaktadır (Alcaide ve ark., 2005).

Direnç genlerinin varlığı ve yayılımı üzerine birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen ülkemizde gerek karasal hayvan gerekse su hayvanlarında hastalık oluşturan bakterilerde direnç gelişimi veya mekanizmaları konusunda çalışmalar sınırlı düzeydedir.

Yapılan çalışmalarda; fenotipik olarak direnç tespit edilmiş (disk difüzyon, MİK) bakterilerde dirence neden olan genetik etmenlerin araştırılması önerilmektedir (Buschmann ve ark., 2012; Elliott ve Facklam, 1996).

Gram negatif bakterilerde florfenikol direncinden primer olarak ilacın hücre dışına çıkartılmasından sorumlu olan *floR* geninin etkili olduğu bildirilmiştir (Fernández-Alarcón ve ark., 2010). *floR*, salmonidlerde hastalık yapan *Hafnia alveai*, *Pseudomonas* spp., *Citrobacter freundii* gibi türlerde rastlanırken; *Flavobacterium* türlerinde henüz rapor edilmemiştir (Miranda ve ark., 2013).

Farklı bakteri türlerinde tespit edilen *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetK* ve *tetL*'nin dışa atım pompası aracılığı ile tetrasiklin bileşiklerinin hücre dışına çıkartılmasından, *tetM*, *tetO*, *tetS*'nin ribozomal korumadan ve *tet34*'ün ise enzimatik inaktivasyondan sorumlu olduğu bilinmektedir (Akinbowale ve ark., Barton, 2007). Çevresel (su ve sediment) örneklerden izole edilen *Flavobacterium* spp. türleri üzerine yapılan az sayıdaki çalışmada, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE*, *tetM*, *tetH* ve *tetL* genlerinin varlığı rapor edilmiştir (Akinbowale ve ark., 2007; Dolejska ve ark., 2009; Miranda ve ark., 2003).

Folat sentezini inhibe eden sulfonamidler ile trimetoprim, gram negatif bakterilerin etken olduğu hastalıkların sağaltımında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sulfonamidlere karşı oluşan aktarılabılır antimikrobiyal dirençten *sul* (*sul1*, *sul2* ve *sul3*) genlerinin sorumlu olduğu bilinmektedir. Akvatik çevrede yaygın olarak bulunan *Flavobacterium* türlerinin *sul* (*sul1*, *sul2* ve *sul3*) genlerini taşıdıkları rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2014).

Gram negatif bakterilerde kinolon direncinin yaygın olması, *gyrA* ve *parC* genlerindeki noktasal mutasyonlarla ilişkilendirilmektedir. Balıklarda patojen olduğu bilinen *F. psychrophilum*, *A. salmonicida*, *Edwardsiella tarda* ve *Photobacterium damsela*'da oksalilik asit direncinin *gyrA* bölgesindeki mutasyondan kaynaklandığı

bildirilmiştir (Gibello ve ark., 2004; Goñi-Urriza ve ark., 2002; Izumi ve ark., 2007; Kim ve ark., 2011; Miranda ve ark., 2013; Shah ve ark., 2014).

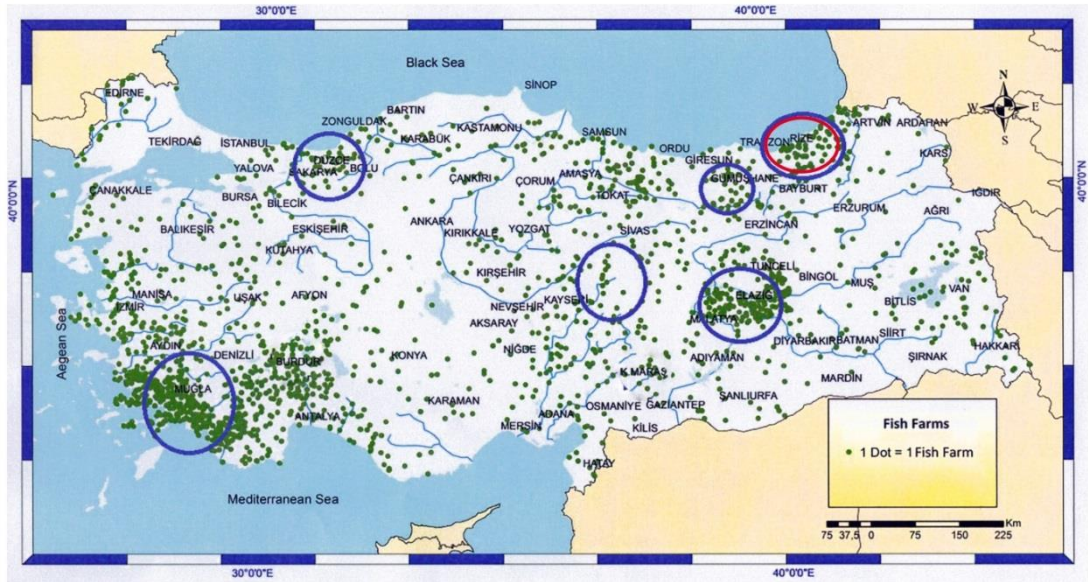
**Bu çalışmada;**

- Flavobacterium türlerinden kaynaklanan hastalıkların coğrafik dağılımlarının belirlenmesi,
- Flavobacterium türlerinin genetik yakınlığı ve epidemiyolojik ilişkilerinin saptanması,
- Akuakültürde sık kullanılan antimikrobiallere (florfenikol, oksitetrasiklin, sulfamethoksazol/trimetoprim, enrofloksasin ve oksalinik asit) karşı gelişen aktarılabılır ve/veya kromozomal direnç genlerinin varlığı/yaygınlığının belirlenmesi,
- Alabalık yetiştiricilerinin bilgilendirilmesi ile gereksiz antimikrobiyal kullanımının azaltılması ve ekonomik kaybın önlenmesi amaçlanmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Bakteri izolatları

Bu tez çalışmasında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan 109 adet *Flavobacterium* spp. izolatinın yanı sıra ve beş *F. psychrophilum* referans izolatu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan izolatların kökenleri ve izolasyon yılları Tablo 3'te, bölgesel dağılımları ise Şekil 1'de verilmiştir.



**Şekil 1.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının bölgesel dağılımları, Çalışmada kullanılan bakteriyel izolatların izole edildiği gökkuşuğu alabalığı işletmeleri Türkiye haritasında mavi halka ile Anadolu/dağ alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*), Çoruh Alabalığı (*Salmo coruhensis*), Kaynak Alabalığı (*Salvelinus fontinalis*), Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*) işletmeleri kırmızı halka ile gösterilmiştir. Türkiye haritasında gösterilen yeşil noktalar ülkemizdeki projeli gökkuşuğu alabalığı işletmelerinin dağılımını göstermektedir (Akova, 2015).

**Tablo 3.** Doktora Tez Çalışmasında kullanılan Flavobacterium izolatları

İzolat No	Balık Türü	Balık Ağırlığı (g)	İzolasyon Yılı	Bölge	İzolat No	Balık Türü	Balık Ağırlığı (g)	İzolasyon Yılı	Bölge
F-5	R.T.	2	Şubat 15	Ege	F-70	R.T.	10	Eylül 13	İç Anadolu
F-6	R.T.	1	Ocak 15	Ege	F-72	R.T.	0.3	Mart 14	İç Anadolu
F-10	R.T.	1	Ocak 15	Ege	FP-73	R.T.	5	Temmuz 14	İç Anadolu
F-16	R.T.	3	Mart 15	Ege	F-74	R.T.	20	Mayıs 14	Ege
F-18	R.T.	1	Ocak 15	Ege	F-75	R.T.	7-9	Eylül 13	Ege
F-19	R.T.	0.5	Mart 15	Doğu Anadolu	F-76	R.T.	0.3	Mart 14	İç Anadolu
F-23	R.T.	2	Şubat15	Ege	F-77	R.T.	0.3	Mayıs 14	İç Anadolu
FP-24	R.T.	2	Mart 14	İç Anadolu	F-81	R.T.	0.3	Mart 14	İç Anadolu
F-25	R.T.	2	Mart 14	İç Anadolu	FP-82	R.T.	5	Temmuz 14	İç Anadolu
F-27	R.T.	20	Mayıs 15	Akdeniz	F-83	R.T.	2	Haziran 14	Ege
F-29	R.T.	20	Mayıs 15	Akdeniz	F-84	R.T.	15	Mayıs 14	Ege
F-30	R.T.	20	Mayıs 15	Akdeniz	F-85	R.T.	0.5	Mart 14	İç Anadolu
FP-34	R.T.	0.6	Ocak 15	Marmara	FP-90	R.T.	0.3	Nisan 14	Ege
FP-37	R.T.	2-4	Şubat 15	Karadeniz	F-91	R.T.	0.6	Mart 14	İç Anadolu
F-47	R.T.	0.3	Şubat 14	İç Anadolu	F-92	R.T.	2	Mayıs 14	Ege
F-57	R.T.	0.4	Nisan 14	Ege	F-93	R.T.	0.6	Mart 14	İç Anadolu
F-58	R.T.	1	Eylül 13	Ege	FP-94	R.T.	0.6	Mart 14	İç Anadolu
F-59	R.T.	4	Eylül 13	Ege	FP-95	R.T.	1	Haziran 14	Ege
F-60	R.T.	1	Eylül 13	Ege	F-96	R.T.	2	Mart 14	İç Anadolu
F-64	R.T.	0.3	Mart 14	İç Anadolu	F-97	R.T.	2	Mart 14	İç Anadolu
F-65	R.T.	0.3	Mart 14	İç Anadolu	FP-100	R.T.	1	Mayıs 15	İç Anadolu
F-67	R.T.	0.3	Mart 14	İç Anadolu	F-101	R.T.	1	Mayıs 15	İç Anadolu
F-68	R.T.	5	Temmuz 14	İç Anadolu	FP-102	R.T.	1	Mayıs 15	İç Anadolu
F-69	R.T.	7-8	Eylül 13	Ege	F-106	R.T.	2	Nisan 14	Marmara



Tablo 3'ün Devamı

İzolot No	Balık Türü	Balık Ağırlığı (g)	İzolasyon Yılı	Bölge	İzolot No	Balık Türü	Balık Ağırlığı (g)	İzolasyon Yılı	Bölge
FP-108	R.T.	1	May.15	Ege	F-324	R.T.	Yumurta	Oca.17	Ege
FP-109	R.T.	1	Haz.14	Ege	F-325	R.T.	0.3	Oca.17	Ege
FP-116	R.T.	1	Haz.14	Ege	F-326	R.T.	0.2	Oca.17	Ege
FP-120	R.T.	1	Haz.15	Ege	F-327	S.T.M	4000	Oca.17	Ege
F-122	R.T.	2	Haz.15	Ege	F-328	R.T.	0.3	Oca.17	Ege
FP-123	R.T.	0.3	Mar.15	Doğu Anadolu	F-329	R.T.	0.3	Oca.17	Ege
F-126	R.T.	200	Tem.15	Marmara	F-331	R.T.	0.3	Oca.17	Ege
F-129	R.T.	3000	Tem.15	Marmara	F-333	S.T.M	4000	Oca.17	Ege
F-130	R.T.	0.2	May.15	Marmara	F-334	S.T.M	4000	Oca.17	Ege
F-131	R.T.	100	May.15	Marmara	FP-335	R.T.	Sperm	Oca.17	Ege
F-135	R.T.	0.2	May.15	Marmara	F-336	R.T.	Yumurta	Oca.17	Ege
F-310	R.T.	1	Oca.17	Ege	F-337	R.T.	0.3	Oca.17	Ege
FP-311	R.T.	0.3	Oca.17	Ege	F-338	R.T.	0.3	Oca.17	Ege
FP-312	R.T.	0.3	Oca.17	Ege	F-339	R.T.	0.3	Oca.17	Ege
FP-313	R.T.	0.3	Oca.17	Ege	F-340	S.T.M	4000	Oca.17	Ege
FP-314	R.T.	0.3	Oca.17	Ege	F-341	R.T.	0.3	Oca.17	Ege
FP-315	R.T.	2-4	Oca.17	Ege	F-342	R.T.	0.3	Oca.17	Ege
F-319	R.T.	1	Oca.17	Ege	F-343	R.T.	0.3	Oca.17	Ege
F-320	R.T.	1	Oca.17	Ege	F-345	R.T.	8-10	Oca.17	Karadeniz
F-321	R.T.	200	Oca.17	Ege	F-346	S.F.	4000	Oca.17	Karadeniz
F-322	R.T.	4000	Oca.17	Ege	F-347	S.L	0.2	Oca.17	Karadeniz
F-323	R.T.	Yumurta	Oca.17	Ege	F-348	R.T.	0.2	Oca.17	Karadeniz

Tablo 3'ün Devamı

İzolat No	Balık Türü	Balık Ağırlığı (g)	İzolasyon Yılı	Bölge	İzolat No	Balık Türü	Balık Ağırlığı (g)	İzolasyon Yılı	Bölge
F-349	S.T.M	0.2	Oca.17	Karadeniz	FP-368	R.T.	3-4	Oca.17	İç Anadolu
F-351	R.T.	30-35	Oca.17	Karadeniz	FP-369	S.C	0.1	Oca.17	Karadeniz
F-352	R.T.	Yumurta	Oca.17	Karadeniz	F-370	S.T.M	0.1	Oca.17	Karadeniz
F-353	S.T.M	Keseli fry	Oca.17	Karadeniz	F-371	R.T.	Yumurta	Oca.17	Karadeniz
F-355	R.T.	Yumurta	Oca.17	Doğu Anadolu	F-372	R.T.	1-2	Oca.17	Karadeniz
F-359	R.T.	0.1	Oca.17	Karadeniz	FP-374	S.F.	4000	Oca.17	Karadeniz
F-360	R.T.	1-2	Oca.17	Karadeniz	NCIMB 13383	R.T.	fry	1990	Danimarka
F-361	R.T.	130	Oca.17	İç Anadolu	NCIMB 13384	R.T.	fry	1991	Danimarka
F-362	R.T.	130	Oca.17	İç Anadolu	NCIMB 1947	C. S	---	1947	Amerika
F-363	Sazan	400	Oca.17	İç Anadolu	NCIMB 2282	C.S	---	1948	Amerika
FP-367	R.T.	3-4	Oca.17	İç Anadolu	ATCC 49511	R.T	----	1986	Fransa

R.T: Gökkuşuğu alabalığı, S.T.M: Anadolu/dağ alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*), S.F: Kaynak Alabalığı (*Salvelinus fontinalis*), S.L: Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*), S.C: Çoruh Alabalığı (*Salmo coruhensis*), C.S: Koho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)

## 3.2. Moleküler identifikasyon

### 3.2.1. DNA ekstraksiyonu

Fenotipik özellikleri belirlenen izolatların DNA ekstraksiyonu spin kolon filtrasyon (Qiagen, Almanya) yöntemine göre yapıldı. DNA ekstraksiyonu için; kit uygulama yönergesine uygun olarak bir öze dolusu bakteri kültürü DNAz, RNAz free ependorf tüplere alınarak 200 µl ATL buffer ve 20 µl Proteinaz K ile karıştırılmış ve 15 saniye vortekslenildikten sonra karışım 56°C'de 2-3 saat bekletilmiştir. Karışımın üzerine 200 µl buffer AL eklenerek 15sn vortekslenmiş ve elde edilen ürün 70°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra %96'lık etanol ilave edilerek vortekslenmiş ve kit içerisinde bulunan spin kolonlara aktarılmıştır. Takiben 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen bakteri süspansiyonuna 500µl buffer AW1 eklendikten sonra tekrar 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve filtreden geçen sıvı uzaklaştırılmıştır. Spin kolon üzerine 500 µl buffer AW2 eklenerek 14000 rpm'de 3 dakika santifüj edilmiştir. Spin kolon steril ependorf tüpüne alındıktan sonra 150 µl buffer AE eklenerek 8000 rpm devirde 1 dakika santifüj edilmiş ve daha sonra örneklerin DNA ekstraksiyonları yapılmıştır. Elde edilen DNA ekstraktlarının Thermo Multiscan Go cihazında 260nm ve 260/280nm dalga boyunda ölçümleri spektrofotometrik olarak yapılarak, DNA miktarları ve saflıkları kontrol edilmiştir.

### 3.2.2. PCR ile identifikasyon

#### 3.2.2.1. *F. psychrophilum*'un dubleks PCR ile identifikasyonu

*F. psychrophilum*'un dupleks PCR ile identifikasyonunu yapmak için bakterinin *gyrA* ve *gyrB* bölgesinin amplifikasyonunu sağlayan primerler kullanılmıştır. Bu amaçla; GYRA-FP1F (5'-GAA ACC GGT GCA CAT AAG G-3'), GYRA-FP1R(5'-CCT GTG GCT CCG TTT ATT AA-3') ve PSY-G1F (5'-TGC AGG AAA TCT TAC ACT CG-3') ve PSY-G1R (5'-GTT GCA ATT ACA ATG TTG T-3') primer setleri kullanılmıştır. PCR master miksi; 2,5 µl 10x PCR Buffer, 5µl 5x Q-Solution, 0,5 µl 0,2 mM dNTP mix (Her birinden 10 mM), her bir *gyrA* primerinden 25 pmol, her bir *gyrB* primerinden 37,5 pmol, 1 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,125

$\mu$ l HotStar*Taq* DNA Polymerase (Qiagen, USA), 10-ng template DNA ve DNase/RNase-Free Distile su içerecek şekilde 25  $\mu$ l hazırlanmıştır. Bu karışım 95°C'de 5 dakika ön denatürasyonu takiben 95°C'de 60 sn. denaturasyon, 56°C'de 60 sn. primer bağlanma, 72°C'de 90 sn. uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 5 dakika final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. PCR ürünleri ve DNA marker, ethidium bromid (2 $\mu$ g/ml) içeren %1'lik agaroz elektroforeze (100 V'da 60 dakika) tabi tutulmuş ve oluşan bantlar UV transilluminatörde görüntülenmiştir. *gyrA* için 396 bp, *gyrB* için ise 1017 bp uzunluğunda bantlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Siekoula-Nguedia ve ark., 2012).

### **3.2.2.2. *Flavobacterium* spp. türlerinin 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu**

*Flavobacterium* spp. olarak ön identifikasyonu yapılan izolatların moleküler identifikasyon için 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') ve 1387R 5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3 universal primerler kullanıldı. PCR master miksi; 5  $\mu$ l 10x PCR Buffer, 10  $\mu$ l 5x Q-Solution, 1  $\mu$ l 0,2 mM dNTP mix (Her bir bazdan 10 mM), her bir primerden 2 $\mu$ M, 2  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,250  $\mu$ l HotStar*Taq* DNA Polymerase (Qiagen, Almanya), 20-ng DNA template ve DNase/RNase-Free Distile su içerecek şekilde 50  $\mu$ l hazırlanmıştır. Oluşturulan karışım 95°C'de 5 dakika ön denatürasyonu takiben 95°C'de 30 sn denatürasyon, 58°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama olmak üzere 32 siklus ve 72°C'de 7 dakika final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu (Biorad T100). PCR ürünleri ve DNA marker, etidium bromid (2 $\mu$ g/ml) içeren % 1,5 agaroz jel elektroforezi (100 V'da 60 dakika) sonrasında UV transilluminatör ile görüntülenmiştir. Bu işlemler sonucunda elde edilen 1465 bp uzunluğundaki bantlar *Flavobacterium* spp. izolatlarının amplifikasyonu için pozitif olarak değerlendirilmiştir (Loch ve ark., 2013).

### **3.2.3. *Flavobacterium* spp.'nin dizi analizi**

PCR analizi sonucunda 1465 bp uzunluğunda bant veren PCR ürünlerine hizmet alımı yoluyla dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi 27F ve 1387R primerleri

kullanılarak Sanger metoduna göre çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nükleotid dizilerinin birleştirilmesi Bionumerics (Applied Maths-Belçika) programı ile yapılmıştır. İzolatların nükleotid dizileri gen bank (BLAST) veri tabanı ile karşılaştırılarak identifikasyonları yapılmıştır (Loch ve ark., 2013).

### **3.3. Moleküler karakterizasyon**

#### **3.3.1. *F. psychrophilum*'un restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi PCR-RFLP analizi**

*F. psychrophilum* izolatlarının RFLP ile analizinde 16S rRNA, *gyrA* ve *gyrB* gen bölgeleri kullanılmıştır. Amplifikasyonunda kullanılan primerler, PCR koşulları ve kesim yapılan enzimler Tablo 4'te verilmiştir. Amplifikasyon işleminden sonra amplifikasyon ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak ethidium bromidle (2µg/ml) boyanmış ve oluşan bantlar UV transilluminatorle görüntülenmiştir. PCR sonucu elde edilen ürünler tabloda 4'de belirtilen restriksiyon enzimler ile kesilmiştir. Enzim ile kesme işleminden sonra oluşan ürünler ethidium bromidle (2µg/ml) boyanan jelde agaroz jelde (%1,5-3) elektroforeze tabi tutulmuştur. Oluşan bantlar UV transilluminator ile görüntülenmiştir. Sonuçlar BioNumerics Gel compare II (Applied Maths, Belçika) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir izolatın sonuçları farklı zamanlarda 3 kez yapılarak testin tekrarlanabilirliği kontrol edilmiştir.

**Tablo 4.** *F. psychrophilum*'un PCR-RFLP analizinde kullanılan primerler, enzimler ve PCR koşulları

Hedef Bölge	Primer	Primer Seti	Amplikon Büyüklüğü	PCR koşulları	Enzim	Kaynak	
16S rRNA	FP1	GTTAGTTGGCATCAACAC	1092	95°C 5 dk	<i>Taq</i> I <i>Alu</i> I	Hesami ve ark., 2008	
	FP2	TCGATCCTACTTGCGTAG		95°C 30 sn.			
		52°C 1 dk	} X30				
		72°C 1 dk					
		72°C 10 dk					
16S rRNA	336F	AGACTCCTACGGGAGGCAGC	194	95°C 5 dk	<i>Mn</i> II	Soule ve ark., 2005	
	517R	ATTACCGCGGCTGCTGG		95°C 30 sn.			
		60°C 1 dk	} X30				
		72°C 1 dk					
		72°C 10 dk					
<i>gyrA</i>	GYRA- FPIF	GAAACCGGTGCACAGAAGG CCTGTGGCTCCGTTTATTAA	396	94°C 4 dk	<i>Mph</i> 11031	Izumi ve ark., 2007	
	GYRA- FP1R			95°C 60 sn			
				45°C 1 dk			} X30
				72°C 1 dk			
		72°C 10 dk					
<i>gyrB</i>	PSY-G1F	TGCAGGAAATCTTACTACTCG	1017	94°C 4 dk	<i>Rsa</i> I	Izumi ve ark., 2003	
	PSY-G1R	GTTGCAATTACAATGTTGT		95°C 60 sn.			
			45°C 1 dk	} X30			
			72°C 1 dk				
			72°C 10 dk				

### 3.3.2. *Flavobacterium* spp. türlerinin restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP)

*Flavobacterium* izolatlarının RFLP ile analizinde 16S rRNA bölgesi kullanılmıştır. Kullanılan gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan primerler, PCR koşulları ve kesim yapılan enzimler Tablo 5'te verilmiştir. Amplifikasyon işleminden sonra amplifikasyon ürünleri ethidium bromidle (2µg/ml) boyanan agaroz jelde (%1) elektroforeze tabi tutulmuş ve oluşan bantlar UV transilluminator ile görüntülenmiştir. PCR sonucu elde edilen ürünlerin her birinin enzimle ile ayrı ayrı kesimleri yapılmıştır. Enzim ile kesme işleminden sonra oluşan ürünler ethidium bromidle (2µg/ml) boyanarak agaroz jelde (%1,5-3) elektroforeze tabi tutulmuştur. Oluşan bantlar UV transilluminator ile görüntülenmiştir. Sonuçlar BioNumerics Gel compare II (Applied Maths, Belçika) kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir izolatın sonuçları farklı zamanlarda 3 kez yapılarak testin tekrarlanabilirliği kontrol edilmiştir.

**Tablo 5.** *Flavobacterium* spp.'nin PCR-RFLP analizinde kullanılan primerler, enzimler ve PCR koşulları

Primer	Primer Seti	Amplikon Büyüküğü	PCR koşulları	Enzim	Kaynak
FvpF1	GTTAGTTGGCATCAACAC	1193	95°C 5 dk	<i>TaqI</i>	Flemming ve
FvpR1	TGCGATTACTAGCGAATC C		95°C 30 sn.	<i>AluI</i>	ark., 2007
			50°C 1 dk	<i>CfoI</i>	
			72°C 1 dk	<i>HaeIII</i>	
			72°C 10 dk	<i>HinI</i>	
				<i>MspI</i>	

### 3.4. RFLP verilerinin değerlendirilmesi

RFLP verilerinin analizinde Gel-Compare II yazılımı (Applied Maths, Belçika) kullanılmıştır. İzolatların benzerlik oranlarının belirlenmesinde bantların varlığı ve yokluğunu temel alan Dice coefficient algoritması kullanılarak ağırlıksız çift grup yöntemi (UPGMA) ile filogenetik analiz yapılmıştır. Tüm RFLP profillerinin ağırlıksız çift grup yöntemi ile karşılaştırılmasında ortalama benzerlik katsayısı kullanılmıştır (Arias ve ark., 2007).

### 3.5. Antimikrobiyal duyarlılık konsantrasyonlarının belirlenmesi

#### 3.5.1. Disk difüzyon

*F. psychrophilum* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde %5 Fötal dana serumu (FDS) eklenmiş Dilue Müller Hinton Agar (DMHA 1:7); diğer Flavobacterium türlerinin antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde ise FDS eklenmemiş DMHA kullanılmıştır. Bakteriyel izolatlar Anacker Ordal Buyyon (AOB)'da 18°C'de 72 saat inkübe edildikten sonra hazırlanan bakteriyel süspansiyonların yoğunlukları (OD) McFarland 0,5'e (BioMerieux, Fransa) ayarlanmıştır. Yoğunlukları ayarlanmış olan süspansiyonlar DMHA'a 0,1 ml miktarda inokule edilerek homojen bir şekilde yayılmıştır. Daha sonra petrilere antimikrobiyal diskler (Oxoid) [amoksisilin (25µg), oksitetrasiklin (30µg), oksalinik asit (10 µg), sulfamethoksazol/trimetoprim (25µg), enrofloksasin (5µg), eritromisin (15µg), florfenikol (30µg)] yerleştirilerek *F. psychrophilum*, 18°C'de 72 saat ve diğer Flavobacterium türleri ise 22°C'de 24-48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur (CLSI, 2006).

Kronvall (2010) tarafından belirlenen Normalize edilmiş direnç yorumlama (NRI) yöntemi kullanılarak MİK dağılımları analiz edilmiştir. NRI analizlerin yapılmasında on-line olarak mevcut olan (<http://www.bioscand.se/nri/>) elektronik excel tablosu kullanılmıştır (Kronvall, 2010; Ngo ve ark., 2017)

#### 3.5.2. Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi (MİK)

Flavobacterium izolatlarının MİK değerlerinin belirlenmesi CLSI (2014) tarafından önerildiği şekilde; Katyon Düzeyi Ayarlanmış Dilüe Mueller-Hinton (4g/l) sıvı besi yeri kullanılarak mikro dilüsyon yöntemine göre belirlenmiştir. Çalışmada florfenikol (FFC; Sigma, F1427), oksitetrasiklin (OT; Sigma, PHR1537), oksalinik Asit (OA; Sigma, 67126), amoksisilin (AML; Sigma, A8523), eritromisin (ERM; Sigma, E5389), enrofloksasin (ENR; Sigma, 17849) ve sulfamethoksazol/Trimetoprim (19:1) (SUL; Sigma, S7507, TRI; Sigma, T7883) antimikrobialeri 0.008-256 konsantrasyon aralığında 2 katlı sulandırma yapılarak mikrolaklara dağıtılmıştır. *F. psychrophilum* izolatları 18°C'de 96 saat, diğer



Flavobacterium türlerine ait izolatlar ise 22°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra mikropalakalar spektrofotometrik olarak Multiskan™ GO Microplate Reader (Thermo) cihazında okutulmuştur. Çalışmalar 2 tekerrür olarak yürütülmüştür (CLSI, 2014).

Kronvall (2010) tarafından belirlenen Normalize edilmiş direnç yorumlama (NRI) yöntemi kullanılarak MİK dağılımları analiz edilmiştir. NRI analizlerin yapılmasında on-line olarak mevcut olan (<http://www.bioscand.se/nri/>) elektronik excel tablosu kullanılmıştır (Kronvall, 2010; Ngo ve ark., 2017).

### 3.6. Antimikrobiyal direnç genleri

Flavobacterium türlerinde antimikrobiyal direnç genlerinin belirlenmesinde *floR*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE*, *tetH*, *tetM*, *tetL*, *sul1*, *sul2* ve *sul3*, *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* gen bölgeleri incelenmiştir. İncelenen direnç genlerinin amplifikasyonunda Tablo 6'da verilen primerler ve PCR koşulları kullanılmıştır. PCR master miksi; 2,5 µl 10x PCR Buffer, 2,5 µl 5x Q-Solution, 0,5 µl 0,2 mM dNTP mix (Her bir bazdan 10 mM), her bir primerden 1µl, 1 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,125 µl HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Almanya), 20-ng DNA template ve DNase/RNase-Free Distile su içerecek şekilde 25 µl hazırlanmıştır. PCR ile amplifikasyon sonucunda herbir direnç geni için tablo 6'da uzunluğu verilen spesifik bantların görüntülenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Pozitif sonuç veren PCR ürünlerinin pürifikasyonu ve dizi analizleri (çift yönlü, sanger metodu) hizmet alımı ile yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda elde edilen nükleotid profilleri BLAST'a girilerek referans profillerle karşılaştırılmıştır.

**Tablo 6.** Hedef direnç gen bölgelerine ait primer dizileri ve PCR protokolleri

Primer ismi	Primer dizisi	Amplikon büyüklüğü	Per koşulları	Kaynak
<i>floR</i>	F. 5'-TATCTCCCTGTCGTTCCAG-3' R. 5'-AGAACTCGCCGATCAATG-3'	399 bp	94°C 4 dk 94°C 30 sn 55°C 30 sn 72°C 1 dk 72°C 7 dk	Van ve ark., 2008
<i>tetA</i>	F. 5'- GTAATCTGAGCACTGTCGC -3' R. 5'- CTGCCTGGACAACATTGCTT -3'	937 bp	94°C 3 dk 94°C 30 sn 53°C 40 sn 72°C 1 dk 72°C 10 dk	Akinbowale ve ark., 2007
<i>tetA</i>	F. 5'- GCGCGATCTGGTTCACCTCG -3' R. 5'- AGTCGACAGYRGC GCCGCGC -3'	164 bp	94°C 5 dk 94°C 1 dk 55°C 1 dk 72°C 1 dk 72°C 10 dk	Akinbowale ve ark., 2007
<i>tetB</i>	F. 5'- CGTTTGCTTTCAGGGATCA -3' R. 5'- ACCATCATGCTATTCCATCC -3'	437 bp	95°C 5 dk 95°C 30 sn 50°C 45 sn 72°C 1 dk 72°C 10 dk	Stine ve ark., 2008
<i>tetC</i>	F. 5'- GCGGGATATCGTCCATTCCG -3' R. 5'- GCGTAGAGGATCCACAGGACG -3'	207 bp	95°C 4dk 95°C 30sn 56°C 45sn 72°C 1 dk 72°C 10 dk	Aminov ve ark., 2002
<i>tetE</i>	F. 5'-GTGATGATGGCACTGGTCAT-3' R 5'-CTCTGCTGTACATCGTCTT-3'	1179 bp	95°C 4 dk 95°C 30 sn 53°C 50 sn 72°C 1 dk 72°C 10 dk	Akinbowale ve ark., 2007
<i>tetH</i>	F. 5'- ATACTGCTGATCACCG -3' R. 5' - TCCCAATAAGCGACGC -3'	1076 bp	94°C 4 dk 94°C 30 sn 45°C 40 sn 72°C 70 sn 72°C 10 dk	Akinbowale ve ark., 2007
<i>tetL</i>	F. 5'- GATTGGAGTTCTTTGTGGGG -3' R. 5' - CAATTGCAATACCTGTTCCC -3'	434 bp	94°C 4 dk 94°C 30 sn 52°C 30 sn 72°C 1 dk 72°C 7 dk	Stine ve ark., 2008
<i>tetM</i>	F. 5'- ACAGAAAGCTTATTATATAAC -3' R. 5'- TGGCGTGTCTATGATGTTCCAC -3'	171 bp	94°C 3 dk 94°C 30 sn 48°C 40 sn 72°C 1 dk 72°C 10 dk	Aminov ve ark., 2001
<i>tetM</i>	F. 5'-GTTAAATAGTGTCTTGGAG-3' R. 5'-CTAAGATATGGCTCTAACAA-3'	656 bp	95°C 5 dk 95°C 45 sn 46°C 45 sn 72°C 1 dk 72°C 7 dk	Akinbowale ve ark., 2007
<i>sulI</i>	F. 5'-CGGCGTGGGCTACCTGAACG-3' R 5'-GCCGATCGCGTGAAGTTCCG-3'	433 bp	94°C 4dk 94°C 30sn 55°C 30sn 72°C 1dk 72°C 7dk	Wang ve ark., 2014

**Tablo 6'nin devamı**

<i>sul2</i>	F. 5'-GCGCTCAAGGCAGATGGCATT-3' R 5'-GCGTTTGATACCGGCACCCGT-3'	293 bp	94°C 4 dk 94°C 30 sn 55°C 30 sn 72°C 1 dk 72°C 7 dk	X30	Wang ve ark., 2014
<i>sul3</i>	F. 5'-TCAAAGCAAAATGATATGAGC-3' R 5'-TTTCAAGGCATCTGATAAAGAC-3'	787 bp	94°C 5dk 94°C 30sn 52°C 30sn 72°C 1dk 72°C 7dk	X30	Wang ve ark., 2014
<i>gyrA</i>	F. 5'- GAAACCGGTGCACAGAAGG -3' R 5'- CCTGTGGCTCCGTTTATTAA -3'	395 bp	94°C 4 dk 94°C 30 sn 55°C 30 sn 72°C 1 dk 72°C 7 dk	X30	Shah ve ark., 2012b
<i>gyrB</i>	F. 5'- AGATAACGGACGTGGTATTCC -3' R 5'- TACGAGGCGGAACCTCATCTC -3'	1669 bp	95°C 3 dk 95°C 30 sn 58°C 45 sn 72°C 70 sn 72°C 10 dk	X30	Shah ve ark., 2012b
<i>ParC</i>	F. 5'- AACTATTAGGCGAGATATCA -3' R 5'- CCGCCACGCAAACCATCGT -3'	987 bp	95°C 3 dk 95°C 30 sn 58°C 45 sn 72°C 70 sn 72°C 10 dk	X30	Shah ve ark., 2012b
<i>ParE</i>	F. 5'- ATGTAAATACCCAAGCCGTGT -3' R 5'- CTGAGAAACCTCAAAGGCT -3'	740 bp	95°C 3 dk 95°C 30 sn 58°C 45 sn 72°C 70 sn 72°C 10 dk	X30	Shah ve ark., 2012b
<i>ParE1</i>	F. 5'- TGCAGGAAATCTTACTACTCG -3' R 5'- GTTGCAATTACAATGTTGT -3'	1014 bp	95°C 3 dk 95°C 30 sn 58°C 45 sn 72°C 70 sn 72°C 10 dk	X30	Shah ve ark., 2012b
<i>qnrA</i>	F. 5'- TCAGCAAGAGGATTCTCA -3' R 5'- GGCAGCACTATTACTCCCA -3'	627 bp	94°C 3 dk 94°C 30 sn 55°C 30 sn 72°C 1 dk 72°C 7 dk	X30	Shah ve ark., 2012b
<i>qnrB</i>	F. 5'- GATCGTGAAAGCCAGAAAGG-3' R 5'- ACGATGCCTGGTAGTTGTCC -3'	469 bp	94°C 4 dk 94°C 30 sn 53°C 30 sn 72°C 1 dk 72°C 7 dk	X30	Shah ve ark., 2012b
<i>qnrS</i>	F. 5'- ACGACATTCGTCAACTGCAA -3' R 5'- TAAATTGGCACCCCTGTAGGC -3'	417 bp	94°C 3 dk 94°C 30 sn 55°C 30 sn 72°C 1 dk 72°C 7 dk	X30	Shah ve ark., 2012b

## 4. BULGULAR

### 4.1. Bakteri izolatları

Tez çalışmasında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan 109 adet *Flavobacterium* spp. izolatlarının yanı sıra ve 5 adet *Flavobacterium psychrophilum* referans izolatu kullanılmıştır.

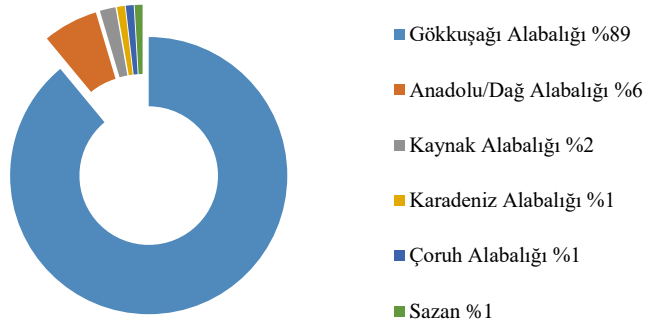
Çalışmada kullandığımız izolatların izole edildiği bölge, konakçı, konakçı ağırlığı ve yıllara göre dağılımları Şekil 2-6'de verilmiştir.



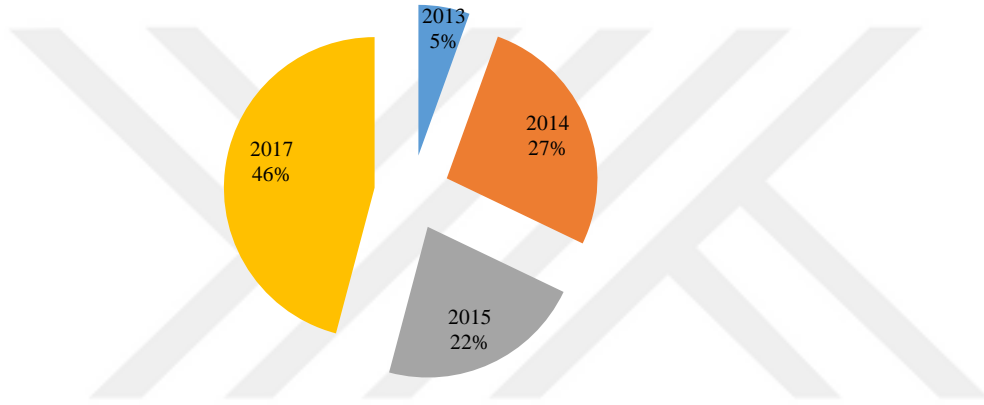
Şekil 2. Çalışmada kullanılan *Flavobacterium* spp. izolatlarının bölgesel dağılımları



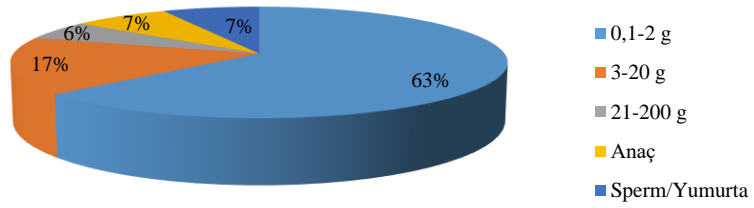
Şekil 3. Çalışmada kullanılan *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının bölgesel dağılımları



Şekil 4. Çalışmada kullanılan Flavobacterium izolatlarının izole edildiği konakçıya göre dağılımları



Şekil 5. Çalışmada kullanılan Flavobacterium izolatlarının izole edildiği yıllara göre dağılımları



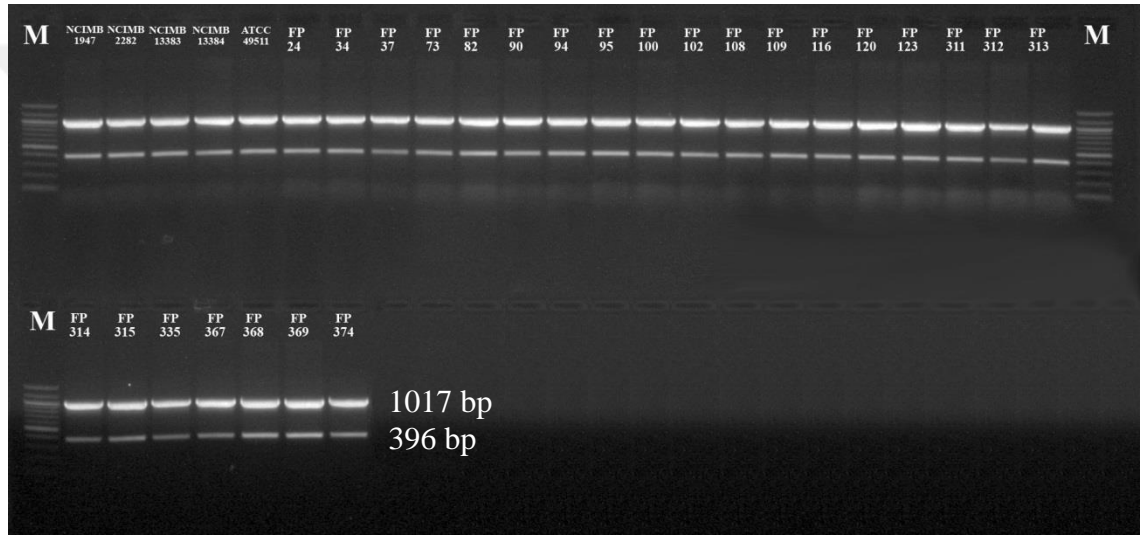
Şekil 6. Çalışmada kullanılan Flavobacterium izolatlarının izole edildikleri balık ağırlığına göre dağılımları

## 4.2. Flavobacterium izolatlarının moleküler identifikasyonu

### 4.2.1. PCR ile identifikasyon

#### 4.2.1.1. *F. psychrophilum*'un dubleks PCR ile identifikasyonu

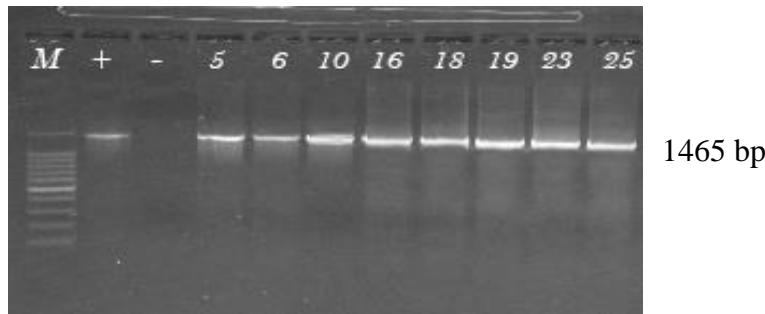
*F. psychrophilum*'un dubleks PCR ile identifikasyonunu; *gyrA* ve *gyrB* bölgesine spesifik primerler kullanılarak yapılmıştır. *gyrA* bölgesi için 396 bp, *gyrB* bölgesi için ise 1017 bp uzunluğunda bantlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. *Flavobacterium psychrophilum*'un dubleks PCR ile identifikasyonunu (M: Marker 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500).

#### 4.2.1.2. *Flavobacterium* spp. türlerinin PCR ile amplifikasyonu

Klasik testlerle *Flavobacterium* spp. olarak ön identifikasyonu yapılan izolatların PCR ile amplifikasyonunda 1465 bp uzunluğundaki bantların görülmesi izolatlarının amplifikasyonu için pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. *Flavobacterium* spp. Türlerinin PCR ile Amplifikasyonu (M: Marker 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500)

#### 4.2.2 *Flavobacterium* spp.'nin dizi analizi

PCR analizi sonucunda 1465 bp uzunluğunda bant veren PCR ürünlerinin saflaştırılması ve dizi analizi hizmet alımı vasıtasıyla yapılmıştır. İzolatlara ait identifikasyon bilgileri Tablo 7’de verilmiştir. Çalışmada kullanılan izolatların 16S rRNA bölgesinin dizi analizi ile identifikasyonlarına ait dağılımları Şekil 9’da verilmiştir.

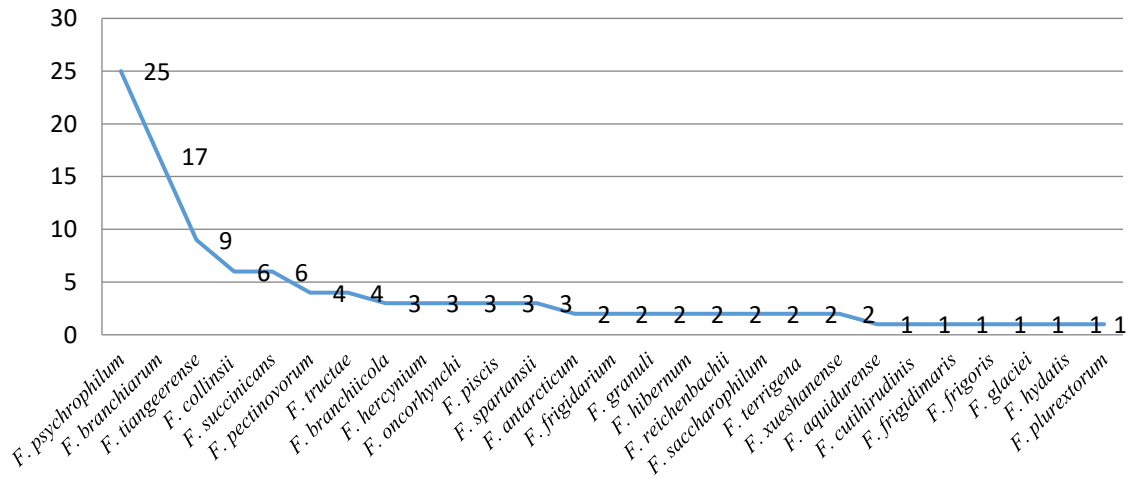
**Tablo 7.** *Flavobacterium* türlerinin dizi analizi

İzolat	İdent. oranı*	İdentifikasyon	İzolat	İdent. oranı*	İdentifikasyon
F-5	99	<i>F. branchiarum</i>	F-72	99	<i>F. branchiarum</i>
F-6	99	<i>F. branchiarum</i>	FP-73	99	<i>F. psychrophilum</i>
F-10	99	<i>F. branchiarum</i>	F-74	99	<i>F. tiangeerense</i>
F-16	99	<i>F. branchiicola</i>	F-75	98	<i>F. collinsii</i>
F-18	99	<i>F. branchiarum</i>	F-76	99	<i>F. branchiarum</i>
F-19	97	<i>F. spartansii</i>	F-77	99	<i>F. hibernum</i>
F-23	99	<i>F. branchiarum</i>	F-81	99	<i>F. branchiarum</i>
FP-24	99	<i>F. psychrophilum</i>	FP-82	99	<i>F. psychrophilum</i>
F-25	99	<i>F. succinicans</i>	F-83	99	<i>F. tiangeerense</i>
F-27	99	<i>F. hercynium</i>	F-84	99	<i>F. spartansii,</i>
F-29	98	<i>F. granuli</i>	F-85	99	<i>F. branchiarum</i>
F-30	98	<i>F. xueshanense</i>	FP-90	99	<i>F. psychrophilum</i>
FP-34	99	<i>F. psychrophilum</i>	F-91	99	<i>F. branchiarum</i>
FP-37	99	<i>F. psychrophilum</i>	F-92	99	<i>F. branchiarum</i>
F-47	98	<i>F. frigoris</i>	F-93	99	<i>F. branchiarum</i>
F-57	99	<i>F. oncorhynchi</i>	FP-94	99	<i>F. psychrophilum</i>
F-58	98	<i>F. frigidarium</i>	FP-95	99	<i>F. psychrophilum</i>
F-59	99	<i>F. succinicans</i>	F-96	99	<i>F. branchiarum</i>
F-60	97	<i>F. frigidarium</i>	F-97	99	<i>F. branchiarum</i>
F-64	99	<i>F. branchiarum</i>	FP-100	99	<i>F. psychrophilum</i>
F-65	98	<i>F. tiangeerense</i>	F-101	99	<i>F. piscis</i>
F-67	99	<i>F. branchiarum</i>	FP-102	99	<i>F. psychrophilum</i>
F-68	98	<i>F. tiangeerense</i>	F-106	94	<i>F. granuli</i>
F-69	100	<i>F. plurextorum</i>	FP-108	99	<i>F. psychrophilum</i>
F-70	99	<i>F. branchiicola</i>	FP-109	99	<i>F. psychrophilum</i>

Tablo 7'nin devamı

\*NCBI veritabanındaki en yakın referans sekans verisine oranı

izolat	İdent. oranı*	İdentifikasyon	İdent. oranı*	İdentifikasyon	
FP-116	99	<i>F. psychrophilum</i>	F-336	99	<i>F. collinsii</i>
FP-120	99	<i>F. psychrophilum</i>	F-337	99	<i>F. tiangeerense</i>
F-122	99	<i>F. terrigena</i>	F-338	98	<i>F. tructae</i>
FP-123	99	<i>F. psychrophilum</i>	F-339	97	<i>F. xueshanense</i>
F-126	99	<i>F. spartansii</i>	F-340	98	<i>F. pectinovorum</i>
F-129	99	<i>F. succinicans</i>	F-341	99	<i>F. succinicans</i>
F-130	99	<i>F. oncorhynchi</i>	F-342	97	<i>F. tructae</i>
F-131	97	<i>F. tructae</i>	F-343	99	<i>F. piscis</i>
F-135	99	<i>F. branchiicola</i>	F-345	98	<i>F. saccharophilum</i>
F-310	98	<i>F. frigidimaris</i>	F-346	99	<i>F. aquidureense</i>
FP-311	99	<i>F. psychrophilum</i>	F-347	99	<i>F. piscis</i>
FP-312	99	<i>F. psychrophilum</i>	F-348	99	<i>F. collinsii</i>
FP-313	99	<i>F. psychrophilum</i>	F-349	99	<i>F. hibernum</i>
FP-314	99	<i>F. psychrophilum</i>	F-351	99	<i>F. hercynium</i>
FP-315	99	<i>F. psychrophilum</i>	F-352	99	<i>F. hydatis</i>
F-319	99	<i>F. branchiarum</i>	F-353	97	<i>F. collinsii</i>
F-320	99	<i>F. pectinovorum</i>	F-355	100	<i>F. collinsii</i>
F-321	98	<i>F. tiangeerense</i>	F-359	98	<i>F. cutihirudinis</i>
F-322	95	<i>F. antarcticum</i>	F-360	99	<i>F. saccharophilum</i>
F-323	98	<i>F. oncorhynchi</i>	F-361	99	<i>F. collinsii</i>
F-324	97	<i>F. glaciei</i>	F-362	98	<i>F. succinicans</i>
F-325	99	<i>F. tiangeerense</i>	F-363	96	<i>F. antarcticum</i>
F-326	99	<i>F. succinicans</i>	FP-367	99	<i>F. psychrophilum</i>
F-327	98	<i>F. pectinovorum</i>	FP-368	99	<i>F. psychrophilum</i>
F-328	97	<i>F. tructae</i>	FP-369	99	<i>F. psychrophilum</i>
F-329	98	<i>F. tiangeerense</i>	F-370	99	<i>F. reichenbachii</i>
F-331	99	<i>F. tiangeerense</i>	F-371	99	<i>F. reichenbachii</i>
F-333	99	<i>F. hercynium</i>	F-372	98	<i>F. terrigena</i>
F-334	98	<i>F. pectinovorum</i>	FP-374	99	<i>F. psychrophilum</i>
FP-335	99	<i>F. psychrophilum</i>			



Şekil 9. 16S rRNA bölgesinin dizi analizi ile tanımlanan Flavobacterium izolatlarının dağılımları

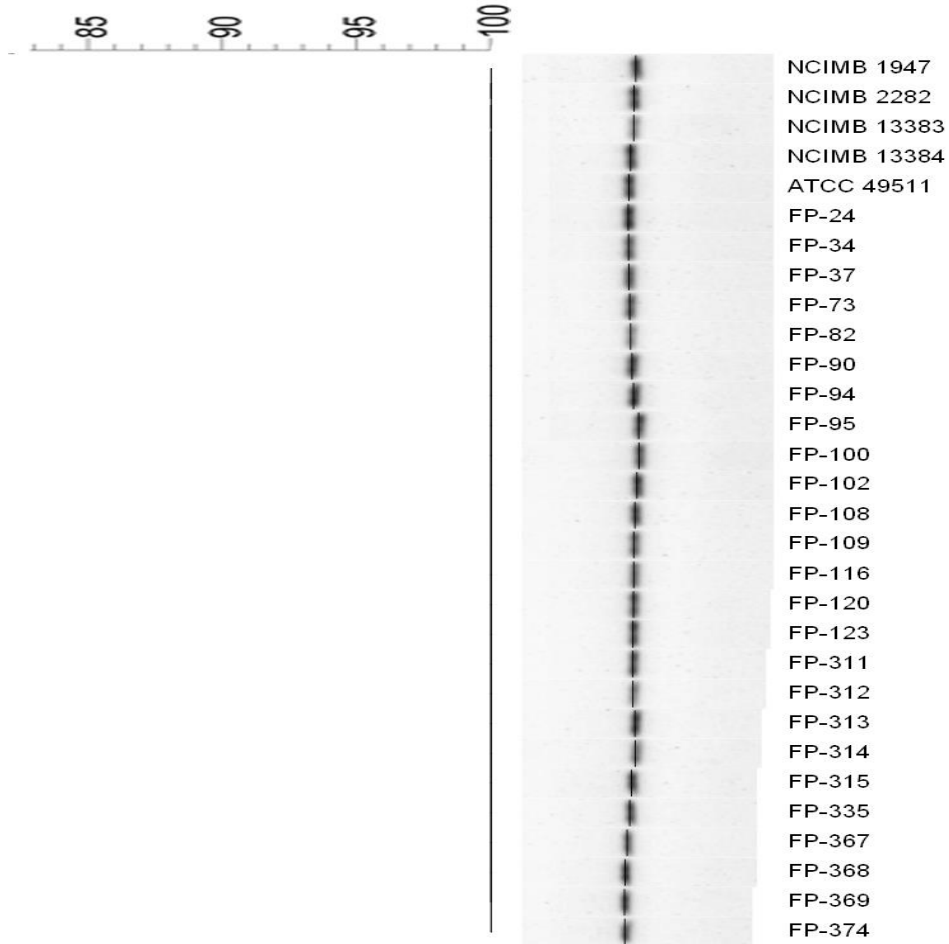


### 4.3. Moleküler karakterizasyon

#### 4.3.1. *F. psychrophilum*'un restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi PCR-RFLP analizi

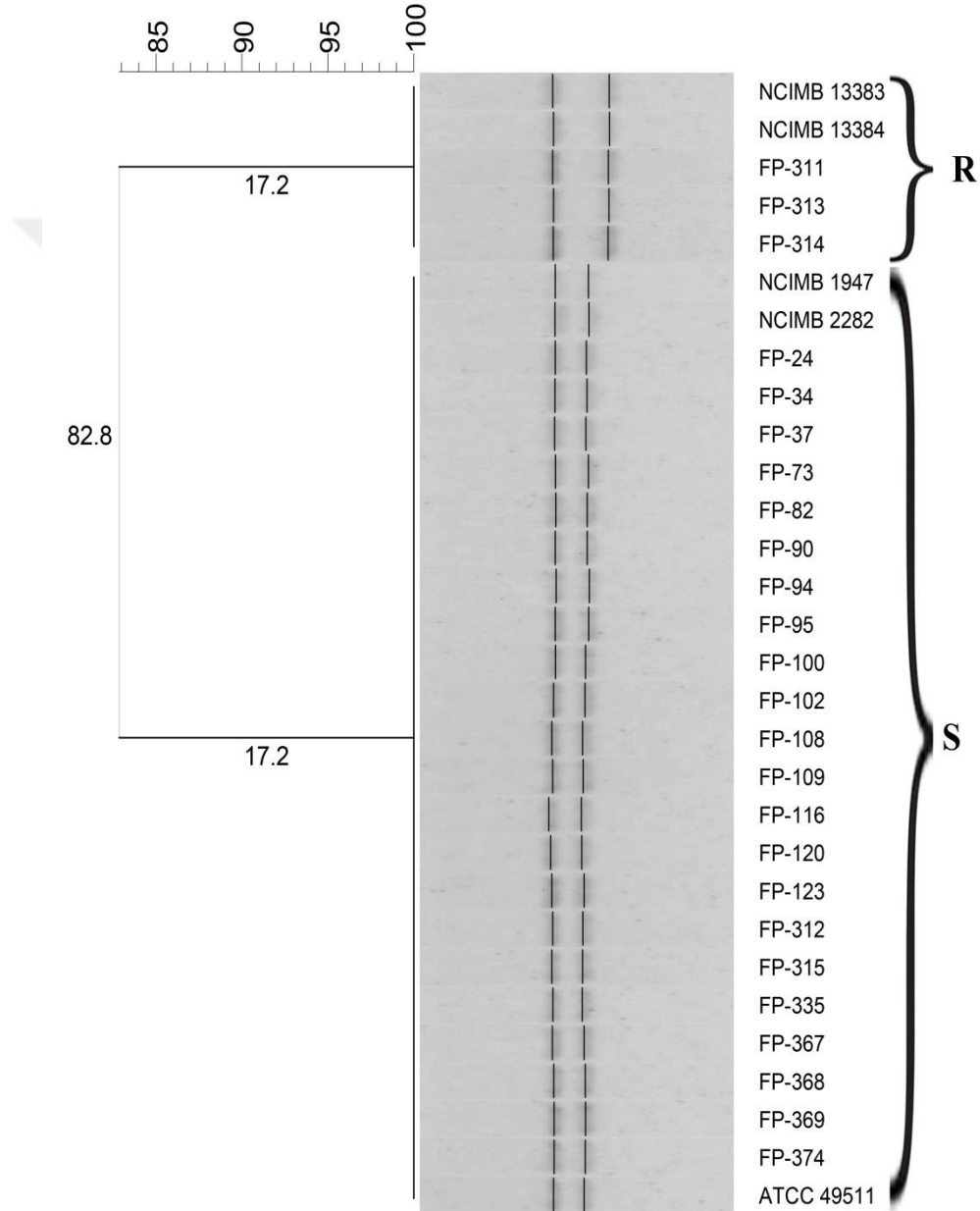
*F. psychrophilum* izolatlarının RFLP analizine ilişkin sonuçlar Şekil 10-15 ve tablo 8'de verilmiştir.

Amplifikasyonu yapılan *gyrA* bölgesinin *Mph1103I* enzimi ile kesimi sonrasında tüm izolatlar %100 duyarlılık ile tek bir genetik grupta toplanmıştır. Referans izolatlarda dahil olmak üzere tüm izolatlar 396 bp uzunluğunda tek bir bant vermiştir. Elde edilen sonuçlara ilişkin dendrogram Şekil 10'da verilmiştir.



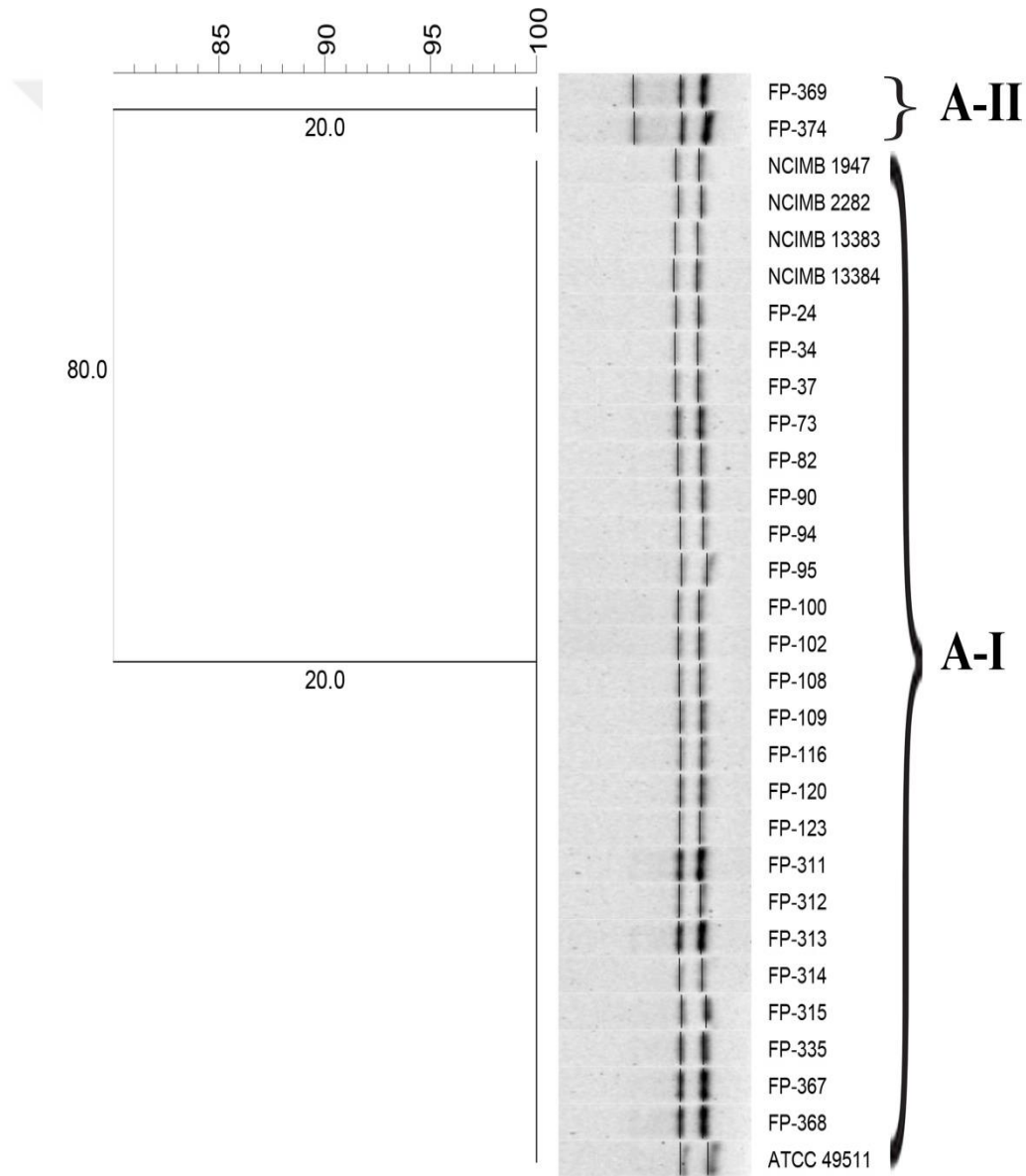
**Şekil 10.** *F. psychrophilum* izolatlarının *gyrA* bölgesinin *Mph1103I* enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendrogram

Amplifikasyonu yapılan *gyrB* bölgesinin *RsaI* enzimi ile kesimi sonrasında tüm izolatlar %82,8 duyarlılık sınırı ile “R” ve “S” olmak üzere 2 genetik gruba ayrılmıştır. R genotipindeki izolatlar 327 ve 429 bp, S genotipindekiler ise 367 ve 429 bp uzunluğunda bantlar vermiştir. Sonuçlar ve yapılan filogenetik analiz Şekil 11’de gösterilmiştir.

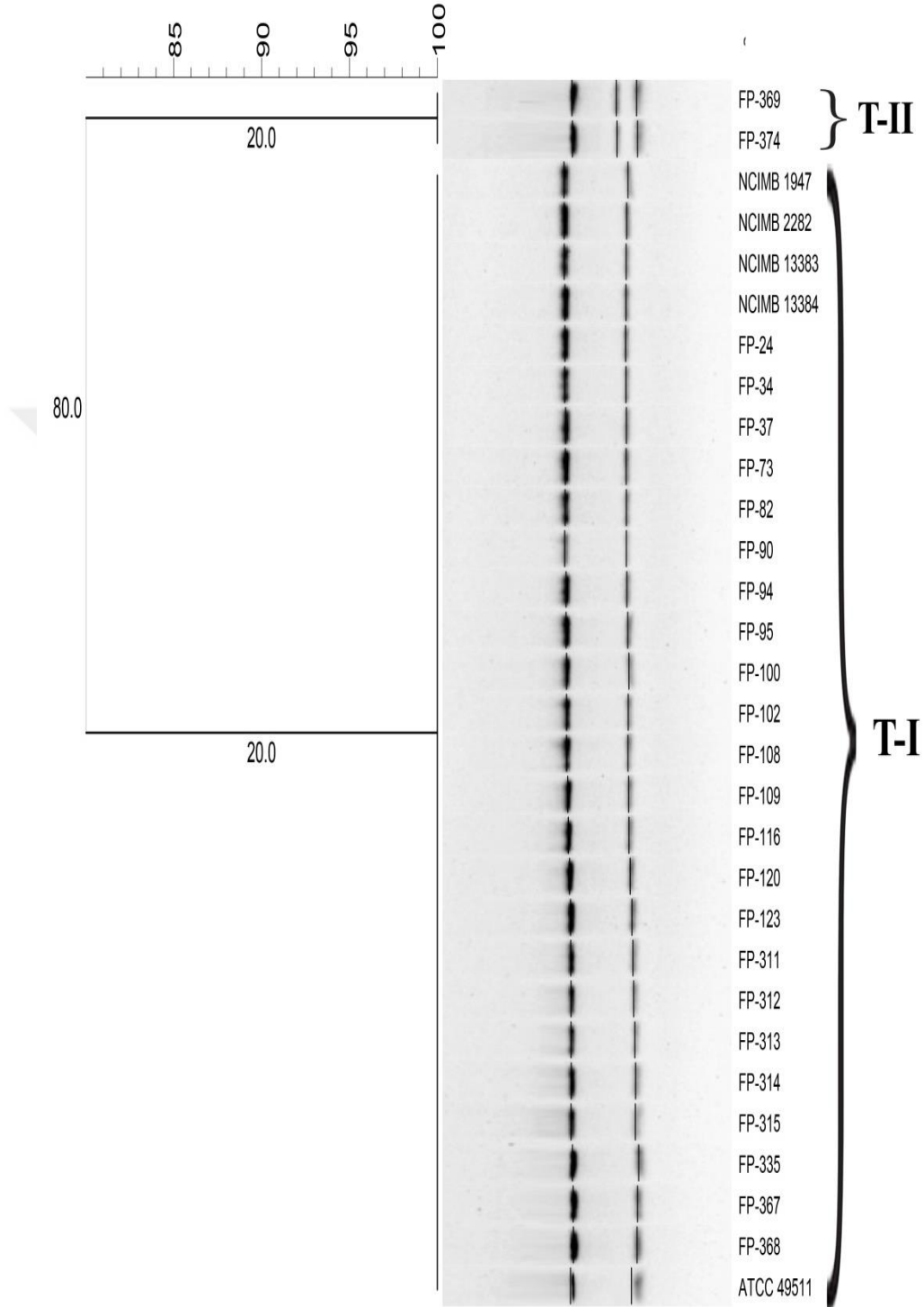


**Şekil 11.** *F. psychrophilum* izolatlarının *gyrB* bölgesinin *RsaI* enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendrogram

Amplifikasyonu FP1 ve FP2 primerleri ile yapılan 16S rRNA bölgesinin *AluI* ve *TaqI* enzimleri ile ayrı ayrı kesilmesi sonrasında %80 duyarlılık sınırına göre 2 genetik gruba ayrılmıştır. *AluI* enzimi ile kesim sonrası A-I genotipi 220 ve 350 bp uzunluğunda bant verirken A-II genotipi 220-350 ve 580 bp uzunluğunda 3 bant vermiştir. *TaqI* enzimi ile kesim sonrası T-I genotipi 320 ve 750 bp uzunluğunda bant verirken T-II genotipi 320-410 ve 750 bp uzunluğunda 3 bant vermiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre yapılan filogenetik analize ait dendogramlar Şekil 12-13'de gösterilmiştir.



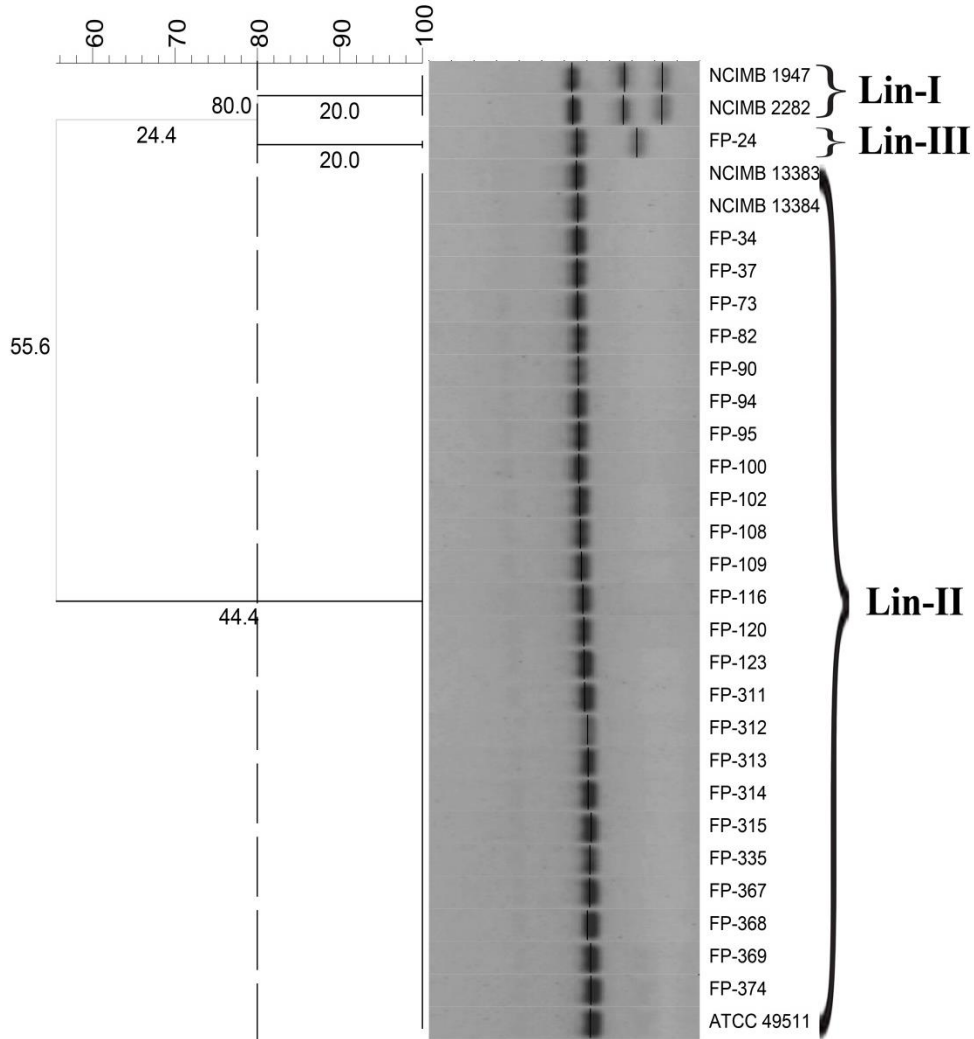
**Şekil 12.** *F. psychrophilum* izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *AluI* enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendogram



**Şekil 13.** *F. psychrophilum* izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *TaqI* enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendrogram

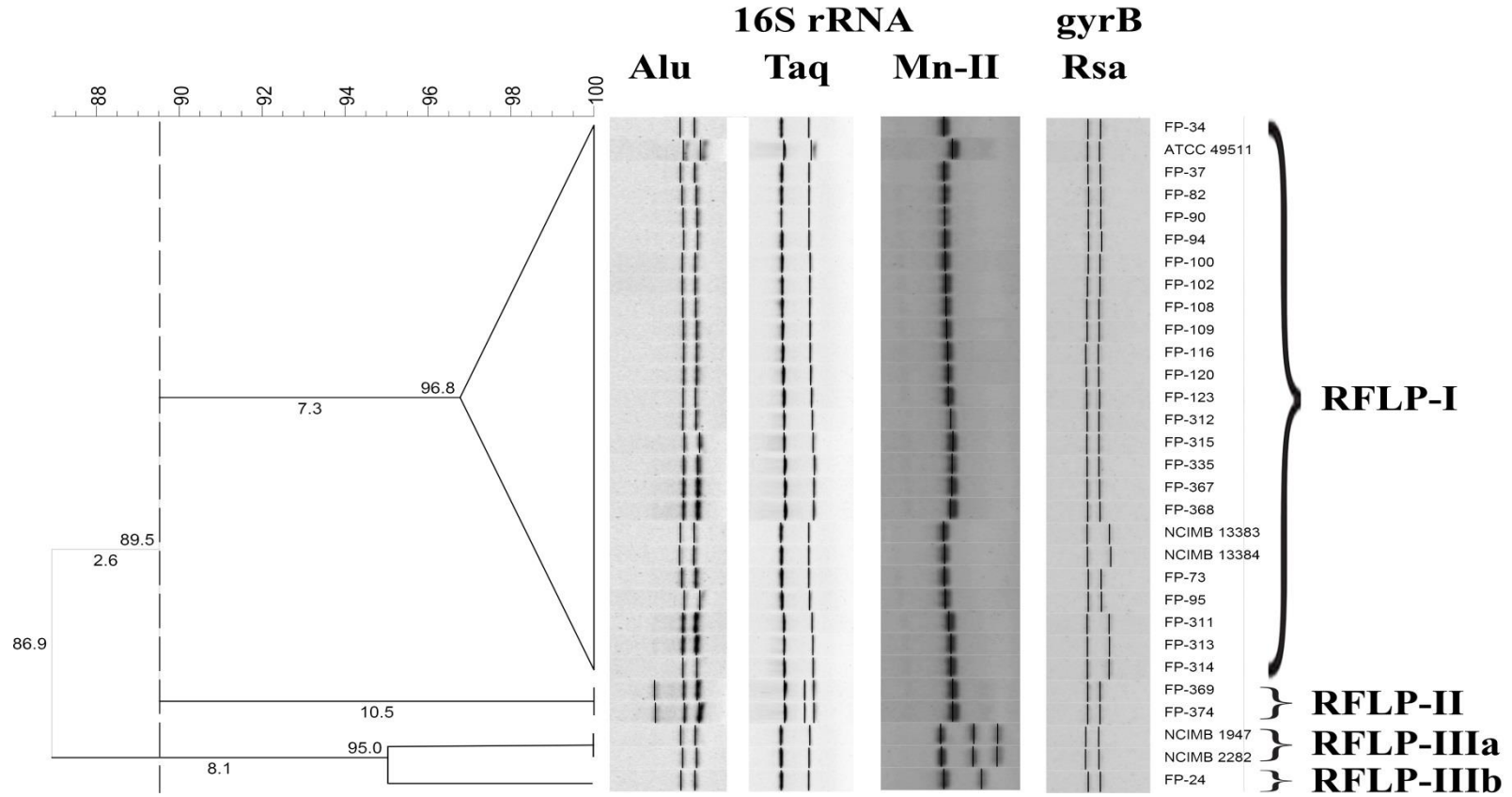
Amplifikasyonu 337F ve 587R primerleri ile yapılan 16S rRNA bölgesinin *MnII* enzimi ile kesimi sonrasında %80 duyarlılık sınırına göre 3 genetik gruba

ayrılmıştır. *MnII* enzimi ile kesim sonrası Lin-I genotipi enzimle kesilmemiş 194 bp uzunluğunda bantın yanı sıra 62 ve 105 bp uzunluğunda 3 bant, Lin-II genotipi enzimle kesilmemiş 194 bp uzunluğunda 1 bant ve Lin-III ise enzimle kesilmemiş 194 bp uzunluğunda bantın yanı sıra ve 85 bp uzunluğunda 2 bant vermiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek yapılan filogenetik analiz Şekil 14’te verilmiştir.



Şekil 14. *F. psychrophilum* izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *MnII* enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendrogram

16S rRNA bölgesini *AluI*, *TaqI* ve *MnII* enzimleri, *gyrB* bölgesinin de *RsaI* enzimi ile kesimi ile oluşturulan RFLP profillerinin ortalama benzerlik bağlantısı kullanılarak yapılan filogenetik analizinde 89,5 duyarlılık sınırına göre 3 genetik gruba ayrıldığı görülmüştür. Filogenetik analiz neticesinde oluşturulan dendrogram Şekil 15’te verilmiştir.



**Şekil 15.** *F. psychrophilum* izolatlarının 16S rRNA ve *gyrB* bölgesinin RFLP profillerinin ortalama benzerlik bağlantıları analiz edilerek oluşturulan akrabalık ilişkilerine ait dendrogram.

**Tablo 8.** *F. psychrophilum* izolatlarının PCR- RFLP ile tiplendirilmesi

RFLP							
İzolat	Konakçı	Coğrafiik Bölge	<i>gyrB</i> <i>RsaI</i>	16S rRNA <i>TaqI</i>	16S rRNA <i>AluI</i>	16S rRNA <i>MnII</i>	Ortak RFLP Profili*
FP-24	<i>R.T</i>	İç Anadolu	S	T-I	A-I	Lin-III	RFLP-III-b
FP-34	<i>R.T</i>	Marmara	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-37	<i>R.T</i>	Karadeniz	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-73	<i>R.T</i>	İç Anadolu	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-82	<i>R.T</i>	İç Anadolu	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-90	<i>R.T</i>	Ege	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-94	<i>R.T</i>	İç Anadolu	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-95	<i>R.T</i>	Ege	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-100	<i>R.T</i>	İç Anadolu	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-102	<i>R.T</i>	İç Anadolu	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-108	<i>R.T</i>	Ege	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-109	<i>R.T</i>	Ege	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-116	<i>R.T</i>	Ege	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-120	<i>R.T</i>	Ege	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-123	<i>R.T</i>	Doğu Anadolu	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-311	<i>R.T</i>	Ege	R	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-312	<i>R.T</i>	Ege	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-313	<i>R.T</i>	Ege	R	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-314	<i>R.T</i>	Ege	R	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-315	<i>R.T</i>	Ege	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-335	<i>R.T</i>	Ege	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-367	<i>R.T</i>	İç Anadolu	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-368	<i>R.T</i>	İç Anadolu	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
FP-369	<i>S.C</i>	Karadeniz	S	T-II	A-I	Lin-II	RFLP-II
FP-374	<i>S.F</i>	Karadeniz-	S	T-II	A-I	Lin-II	RFLP-II
NCIMB 13383	<i>R.T</i>	Danimarka	R	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
NCIMB 13384	<i>R.T</i>	Danimarka	R	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I
NCIMB 1947	<i>C.S</i>	Amerika	S	T-I	A-II	Lin-I	RFLP-III-a
NCIMB 2282	<i>C.S</i>	Amerika	S	T-I	A-II	Lin-I	RFLP-III-a
ATCC 49511 (JIP02/8 6)	<i>R.T</i>	Fransa	S	T-I	A-I	Lin-II	RFLP-I

\* *F. psychrophilum* izolatlarının 16S rRNA ve *gyrB* bölgelerinin RFLP profillerinin filogenetik analizi neticesinde elde edilen ortak RFLP profili, R.T: Gökkuşuğu alabalığı, S.T.M: Anadolu/dağ alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*), S.F: Kaynak Alabalığı (*Salvelinus fontinalis*), S.L: Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*), S.C: Çoruh Alabalığı (*Salmo coruhensis*), C.S: Koho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)

#### 4.3.2. *Flavobacterium* spp.'nin restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi PCR-RFLP analizi

*Flavobacterium* spp. izolatlarının 16S rRNA gen bölgesini çoğaltan *FvpF1-FvpR1* primer çifti kullanılarak yapılan RFLP analizi sonuçlarına ait veriler Tablo 9 ve Şekil 16-22'de verilmiştir.

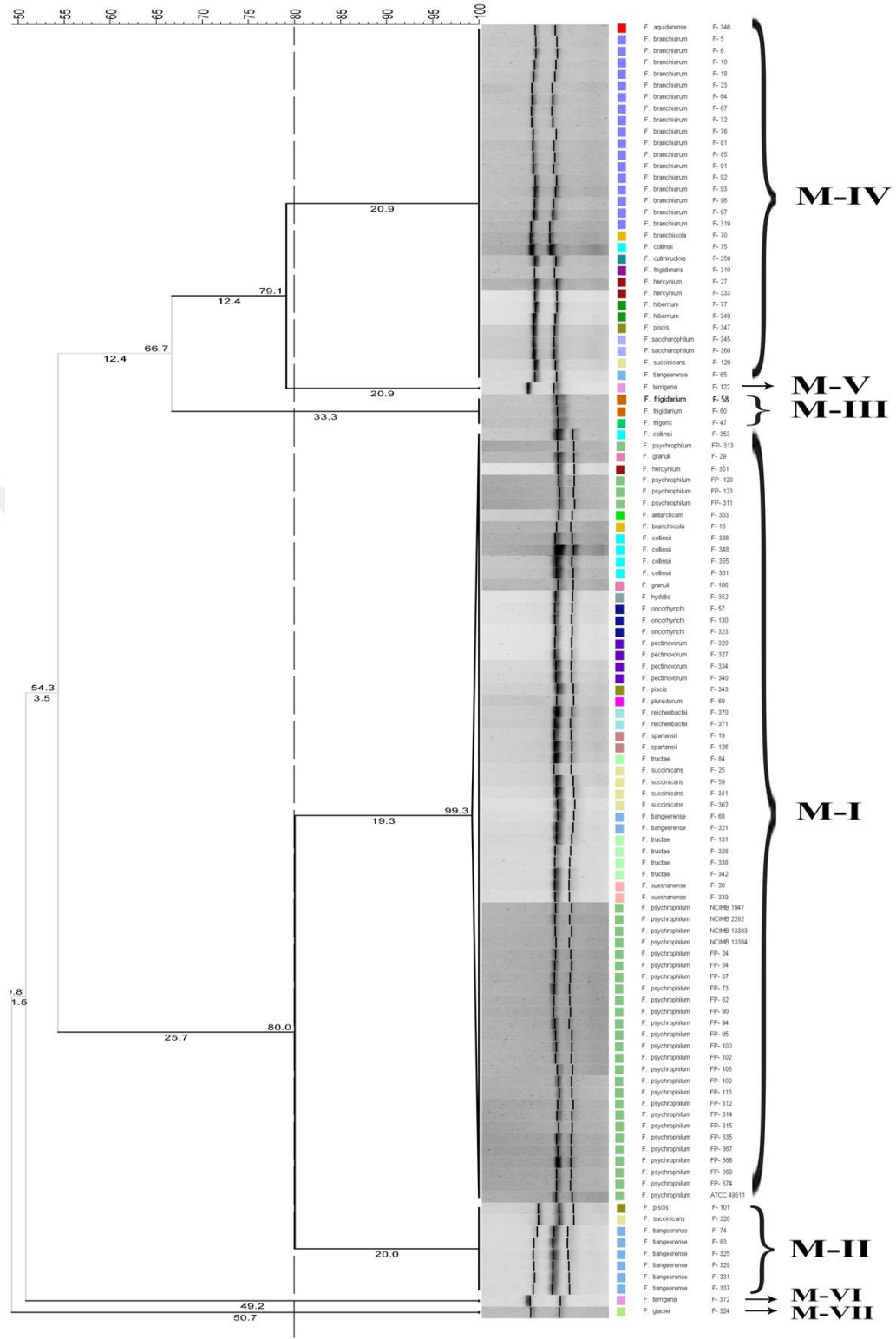
##### RFLP analizinde:

- ✓ *MspI* enzimi ile kesilmesi sonrasında %80 duyarlılık sınırına göre;
  - M-I genotipi 320 ve 430 bp,
  - M-II genotipi 101, 430 ve 653 bp,
  - M-III genotipi 450 bp,
  - M-IV genotipi 410 ve 653 bp,
  - M-V genotipi 410 ve 770 bp,
  - M-VI genotipi 390 ve 770 bp
  - M-VII genotipi 410 ve 750 bp uzunluğunda bantlar vererek 7 genetik gruba ayrılmıştır (Şekil 16).
  
- ✓ *AluI* enzimi ile kesilmesi sonrasında %80 duyarlılık sınırına göre;
  - A-I genotipi 220 ve 350 bp,
  - A-II genotipi 220, 350 ve 580 bp,
  - A-III genotipi 200 ve 700 bp,
  - A-IV genotipi 220 ve 580 bp uzunluğunda bantlar vererek 4 genetik gruba ayrılmıştır (Şekil 17).
  
- ✓ *CfoI* enzimi ile kesilmesi sonrasında %85,7 duyarlılık sınırına göre;
  - C-I genotipi 234 ve 690 bp,
  - C-II genotipi 234, 453 ve 690 bp,
  - C-III genotipi 234, 453, 690 ve 950 bp,
  - C-IV genotipi 234, 690, 950 ve 1193 bp,
  - C-V genotipi 234 ve 950 bp,

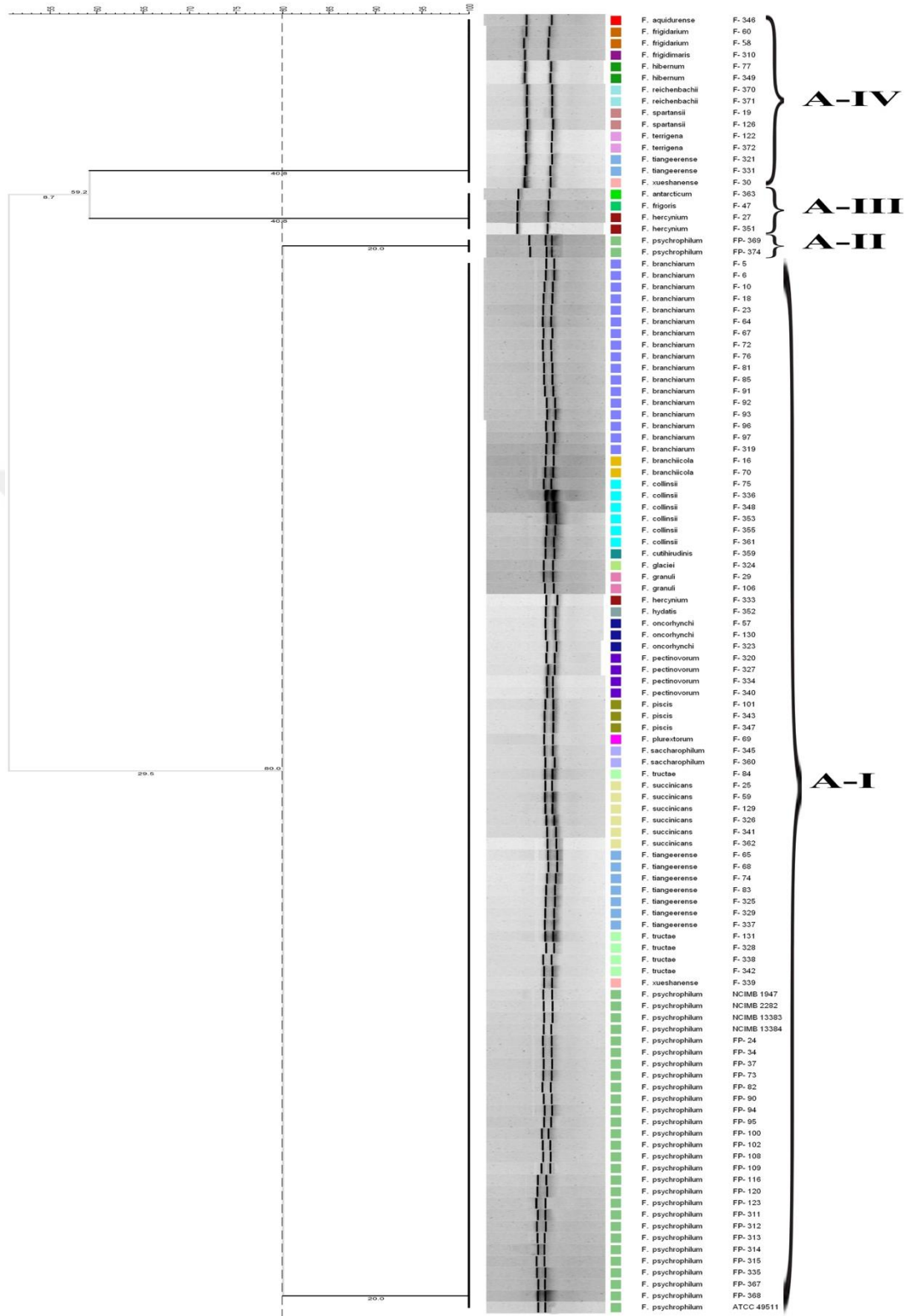


- C-VI genotipi 234 ve 453 bp uzunluğunda bantlar vererek 6 genetik gruba ayrılmıştır (Şekil 18).
- ✓ *HaeIII* enzimi ile kesilmesi sonrasında %74,3 duyarlılık sınırına göre;
  - H-I genotipi 300 ve 480 bp,
  - H-II genotipi 300 ve 350 bp,
  - H-III genotipi 1193 bp uzunluğunda bant/bantlar vererek 3 genetik gruba ayrılmıştır (Şekil 19).
- ✓ *Taq* enzimi ile kesilmesi sonrasında %69,7 duyarlılık sınırına göre;
  - T-I genotipi 370 ve 750 bp,
  - T-II genotipi 370 ve 670 bp,
  - T-III genotipi 220 ve 750 bp uzunluğunda bantlar vererek 3 genetik gruba ayrılmıştır (Şekil 20).
- ✓ *HinfI* enzimi ile kesilmesi sonrasında %80,5 duyarlılık sınırına göre;
  - Hn-I genotipi 120 ve 500 bp,
  - Hn-II genotipi 80, 120 ve 500 bp,
  - Hn-III genotipi 120 ve 570 bp,
  - Hn-IV genotipi 120, 500 ve 570 bp,
  - Hn-V genotipi 300 bp uzunluğunda bant/bantlar vererek 5 genetik gruba ayrılmıştır (Şekil 21).

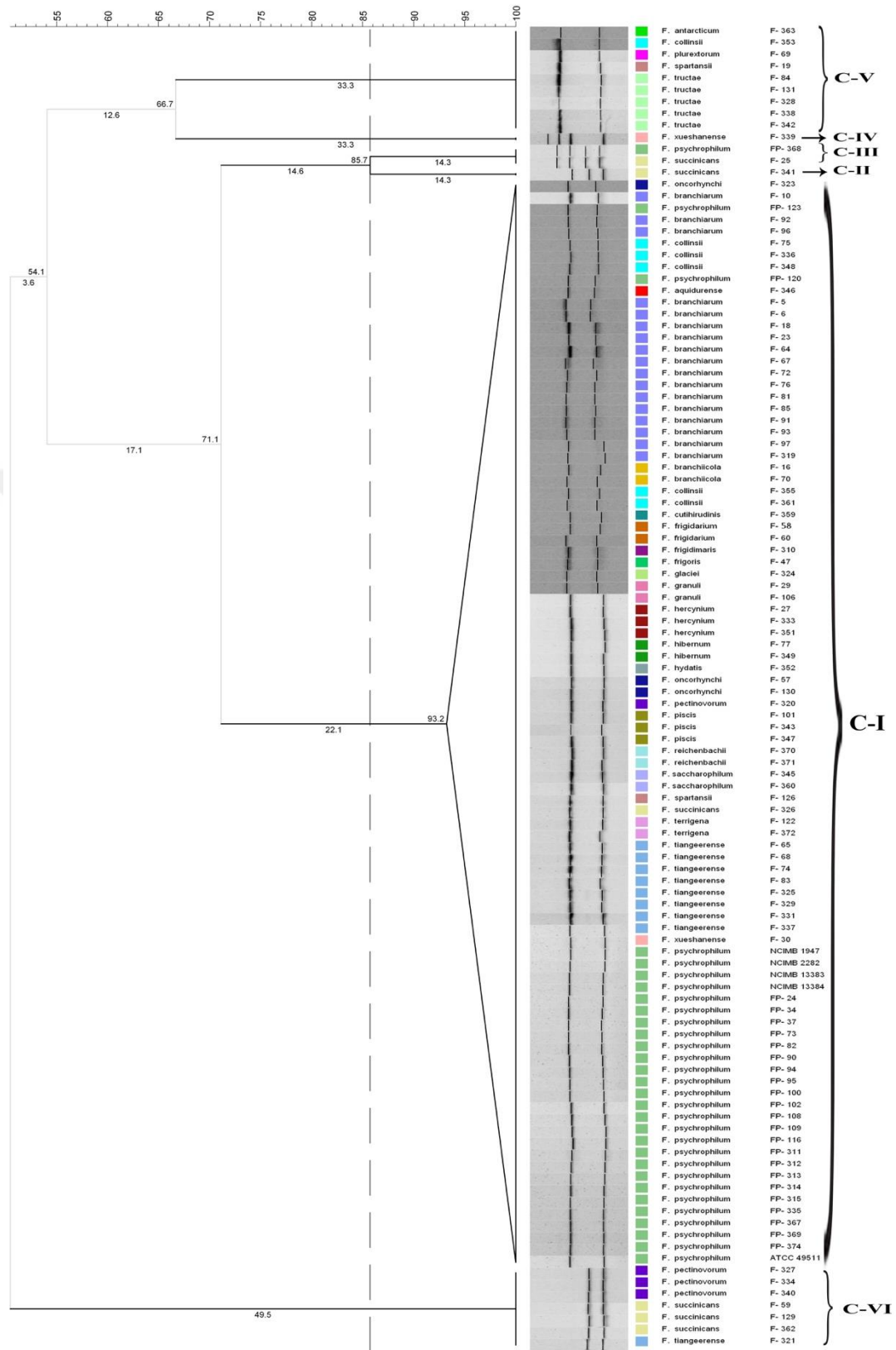
*Flavobacterium* spp. izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *MspI*, *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *TaqI* ve *HinfI* enzimleri ile ayrı ayrı kesimi sonucunda ortaya çıkan RFLP profillerinin, ortalama benzerlik bağlantısı kullanılarak yapılan filogenetik analiz neticesinde % 89,4 duyarlılık sınırına göre 8 genetik gruba ayrıldığı görülmüştür (Şekil 22).



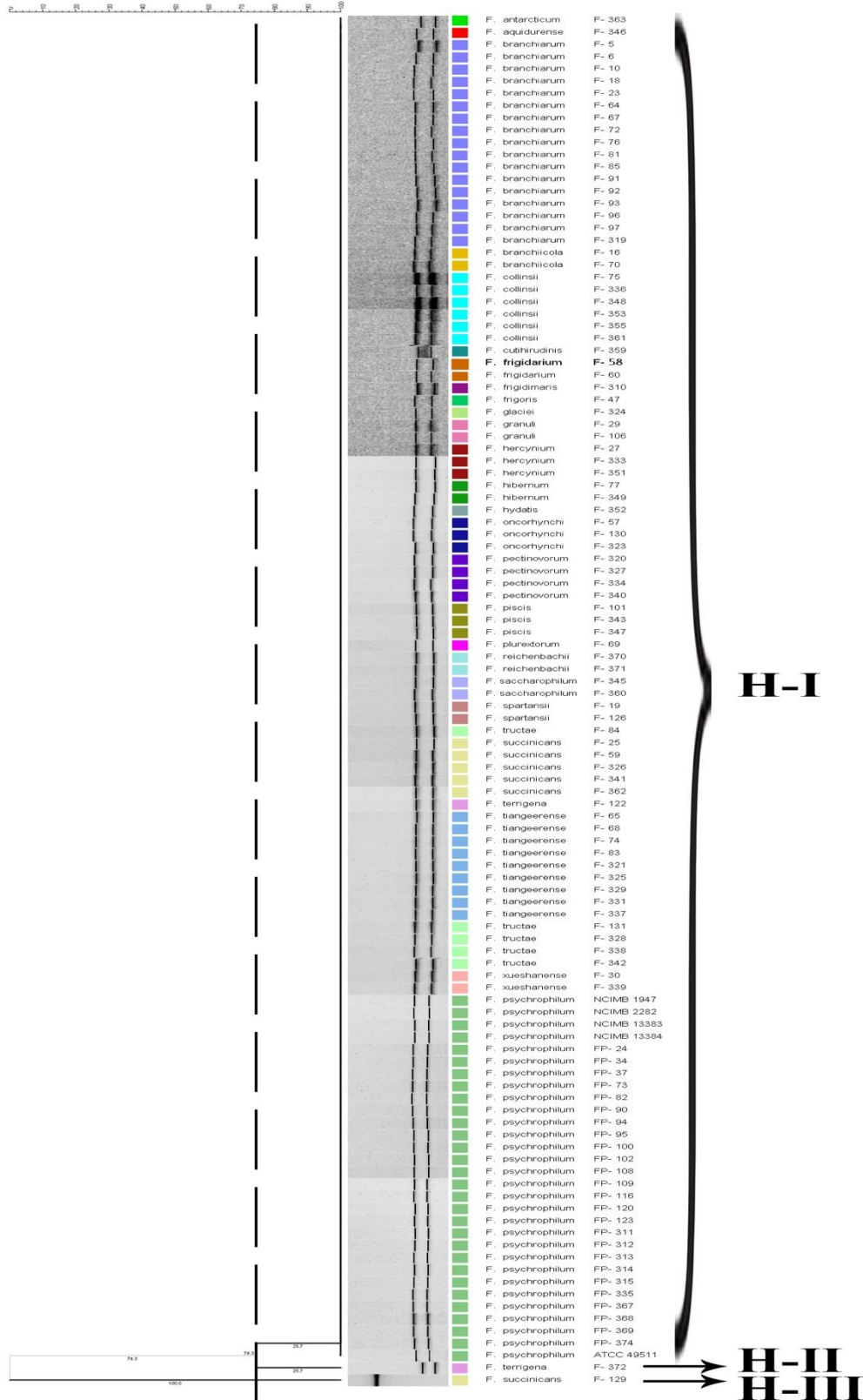
Şekil 16. *Flavobacterium* spp. izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *MspI* enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendrogram



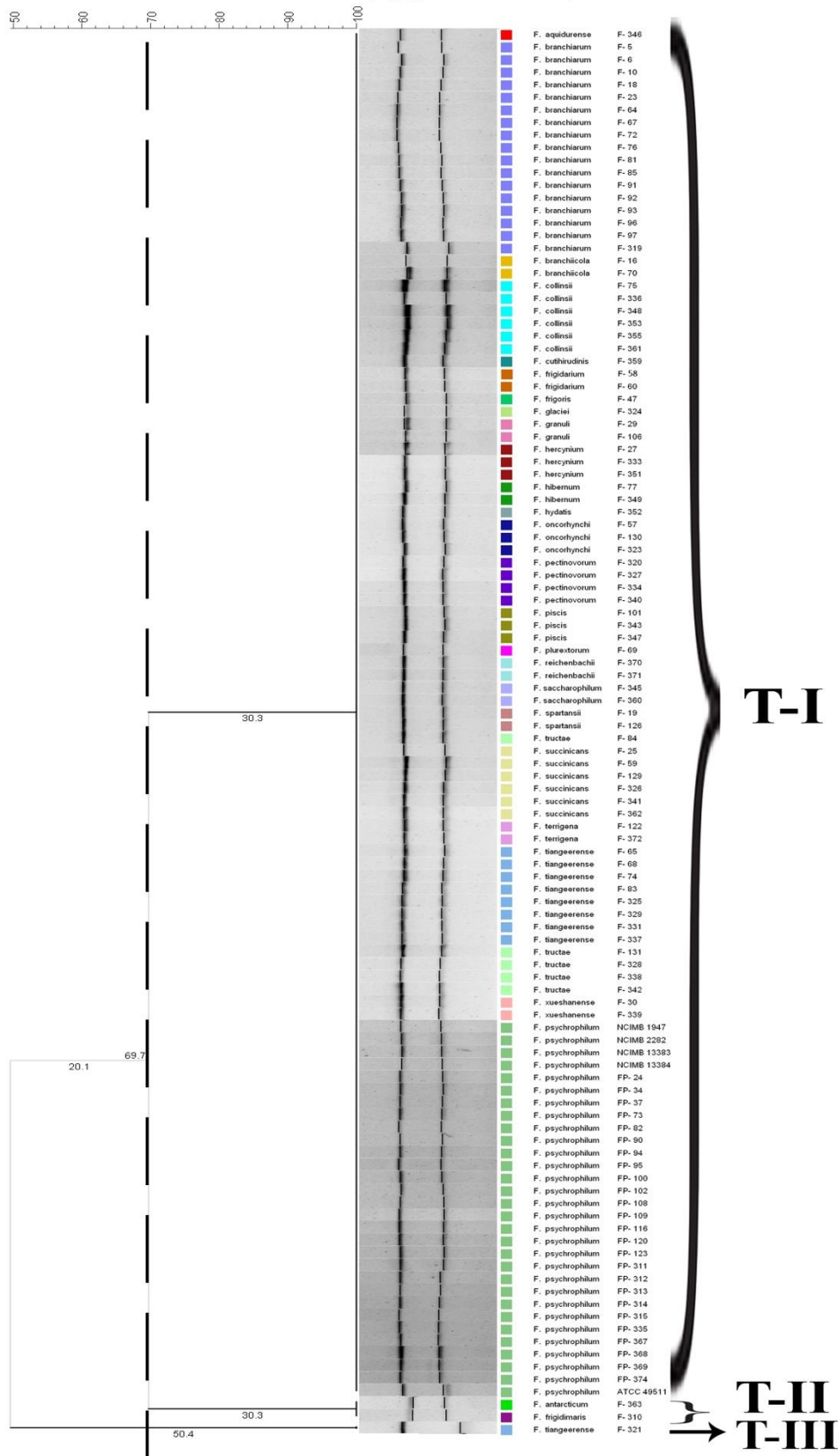
Şekil 17. *Flavobacterium* spp. izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *AluI* enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendrogram



Şekil 18. *Flavobacterium* spp. izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *CfoI* enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendrogram

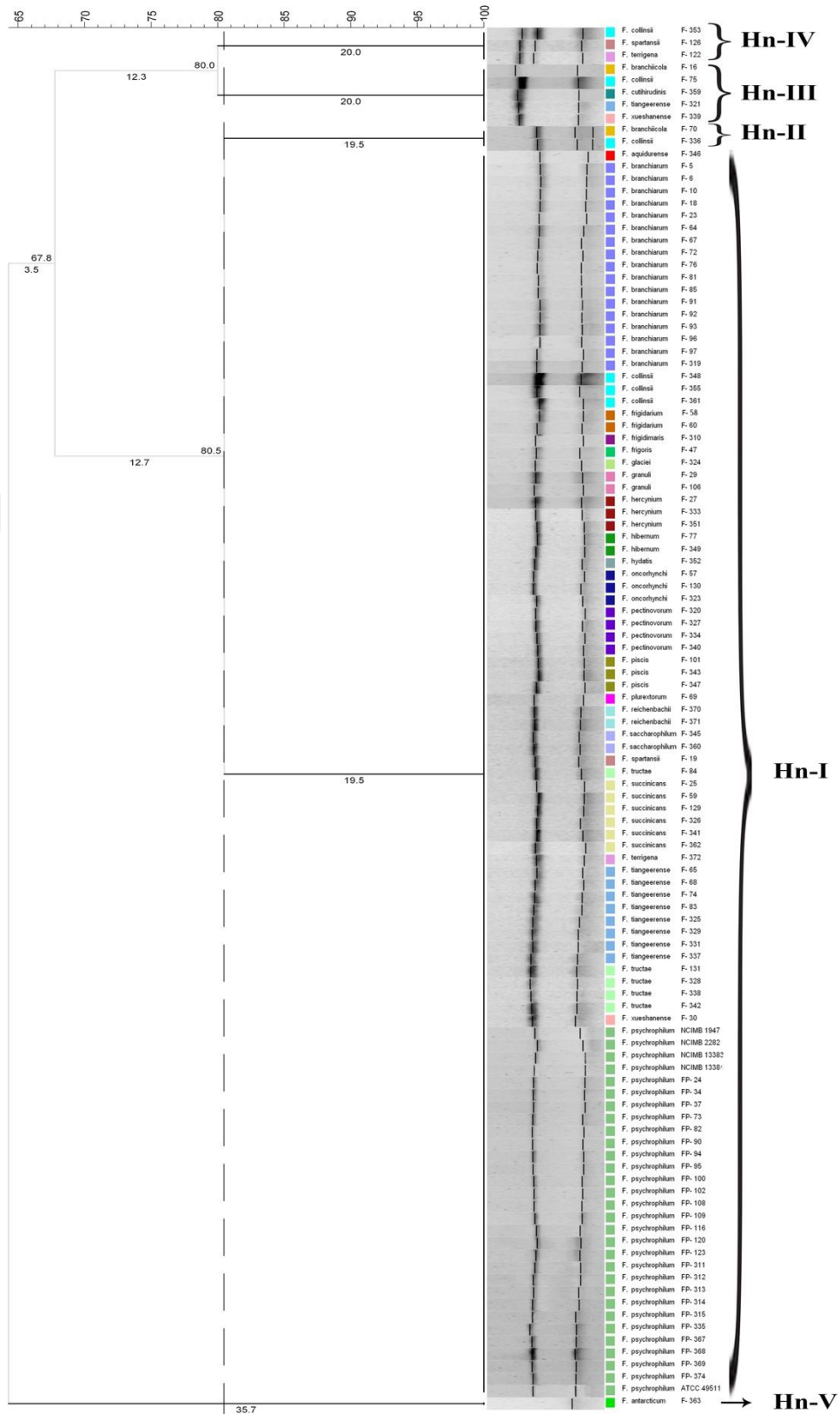


Şekil 19. *Flavobacterium* spp. izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *Hae*III enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendrogram

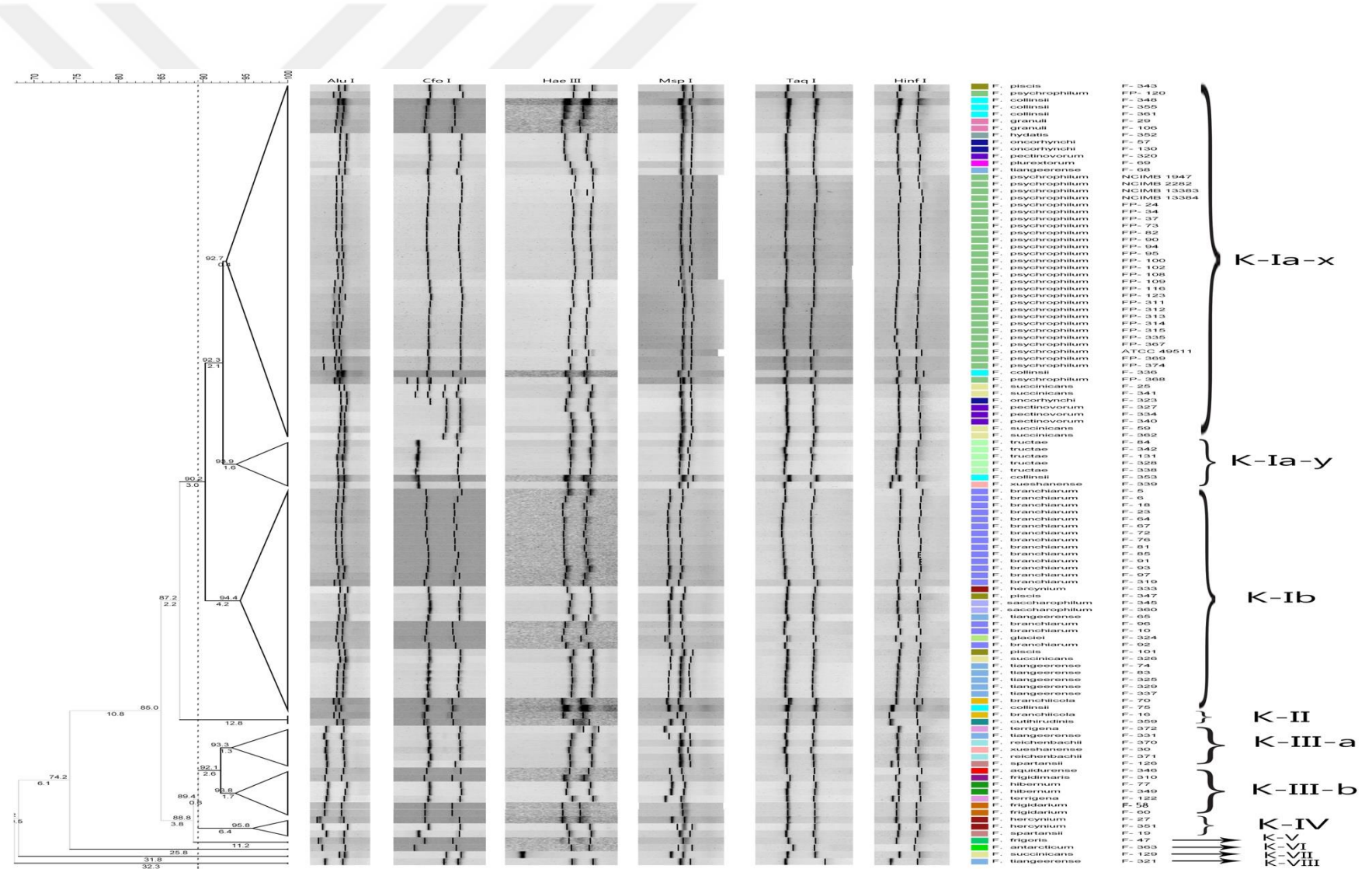


Şekil 20. *Flavobacterium* spp. izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *TaqI* enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendrogram





Şekil 21. *Flavobacterium* spp. izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *HinfI* enzimi ile kesimi sonrasında akrabalık ilişkilerine ait dendrogram



**Şekil 22.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının 16S rRNA bölgesinin RFLP profillerinin ortalama benzerlik bağlantıları analiz edilerek oluşturulan akrabalık ilişkilerine ait dendrogram.



**Tablo 9.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının PCR- RFLP ile tiplendirilmesi

İzolat No	Balık Türü	Bölge	16S rRNA RFLP						Ortak RFLP Tipi
			<i>MspI</i>	<i>AluI</i>	<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	
F-5	R.T.	Ege	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-6	R.T.	Ege	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-10	R.T.	Ege	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-16	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-III	K-II
F-18	R.T.	Ege	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-19	R.T.	Doğu Anadolu	M-I	A-IV	C-V	H-I	T-I	Hn-I	K-IV
F-23	R.T.	Ege	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
FP-24	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-25	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-III	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-27	R.T.	Akdeniz	M-IV	A-III	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-IV
F-29	R.T.	Akdeniz	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-30	R.T.	Akdeniz	M-I	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-III-a
FP-34	R.T.	Marmara	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
FP-37	R.T.	Karadeniz	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-47	R.T.	İç Anadolu	M-III	A-III	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-V
F-57	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-58	R.T.	Ege	M-III	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-III-b
F-59	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-VI	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-60	R.T.	Ege	M-III	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-III-b
F-64	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-65	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-67	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-68	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-69	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-V	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-70	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-II	K-Ib
F-72	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
FP-73	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-74	R.T.	Ege	M-II	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-75	R.T.	Ege	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-III	K-Ib
F-76	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-77	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-III-b
F-81	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
FP-82	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-83	R.T.	Ege	M-II	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-84	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-V	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-y
F-85	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
FP-90	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x
F-91	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib
F-92	R.T.	Ege	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib

Tablo 9'un Devamı

İzolot No	Balık Türü	Bölge	16S rRNA RFLP							Ortak RFLP Tipi
			<i>Msp</i>	<i>AluI</i>	<i>Cfo</i>	<i>Hae III</i>	<i>Taq</i>	<i>Hinf I</i>		
F-93	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	
FP-94	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
FP-95	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
F-96	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	
F-97	R.T.	İç Anadolu	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	
FP-100	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
F-101	R.T.	İç Anadolu	M-II	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	
FP-102	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
F-106	R.T.	Marmara	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
FP-108	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
FP-109	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
FP-116	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
FP-120	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
F-122	R.T.	Ege	M-V	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-IV	K-III-b	
FP-123	R.T.	Doğu Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
F-126	R.T.	Marmara	M-I	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-IV	K-III-a	
F-129	R.T.	Marmara	M-IV	A-I	C-VI	H-III	T-I	Hn-I	K-VII	
F-130	R.T.	Marmara	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
F-131	R.T.	Marmara	M-I	A-I	C-V	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-y	
F-310	R.T.	Ege	M-IV	A-IV	C-I	H-I	T-II	Hn-I	K-III-b	
FP-311	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
FP-312	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
FP-313	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
FP-314	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
FP-315	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
F-319	R.T.	Ege	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	
F-320	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
F-321	R.T.	Ege	M-I	A-IV	C-VI	H-I	T-III	Hn-III	K-VIII	
F-323	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-II	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
F-324	R.T.	Ege	M-VII	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	
F-325	R.T.	Ege	M-II	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	
F-326	R.T.	Ege	M-II	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	
F-327	S.T.M	Ege	M-I	A-I	C-VI	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-x	
F-328	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-V	H-I	T-I	Hn-I	K-Ia-y	
F-329	R.T.	Ege	M-II	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	
F-331	R.T.	Ege	M-II	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-III-a	
F-333	S.T.M	Ege	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	
F-333	S.T.M	Ege	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-Ib	

Tablo 9'un Devamı

İzolot No	Balık Türü	Bölge	16S rRNA RFLP							Ortak RFLP Tipi
			<i>Msp</i>	<i>AluI</i>	<i>Cfo</i>	<i>Hae III</i>	<i>Taq</i>	<i>Hinf I</i>		
F-334	S.T.M.	Ege	M-I	A-I	C-VI	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
FP-335	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
F-336	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-II	K-la-x	
F-337	R.T.	Ege	M-II	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-lb	
F-338	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-V	H-I	T-I	Hn-I	K-la-y	
F-339	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-V	H-I	T-I	Hn-I	K-la-y	
F-340	S.T.M.	Ege	M-I	A-I	C-VI	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
F-341	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-III	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
F-342	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-V	H-I	T-I	Hn-I	K-la-y	
F-343	R.T.	Ege	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
F-345	R.T.	Karadeniz	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-lb	
F-346	S.F.	Karadeniz	M-IV	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-III-b	
F-347	S.L.	Karadeniz	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-lb	
F-348	R.T.	Karadeniz	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
F-349	S.T.M.	Karadeniz	M-IV	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-III-b	
F-351	R.T.	Karadeniz	M-I	A-III	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-IV	
F-352	R.T.	Karadeniz	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
F-353	S.T.M.	Karadeniz	M-I	A-I	C-V	H-I	T-I	Hn-IV	K-la-y	
F-355	R.T.	Doğu Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
F-359	R.T.	Karadeniz	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-III	K-II	
F-360	R.T.	Karadeniz	M-IV	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-lb	
F-361	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
F-362	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-VI	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
F-363	Sazan	İç Anadolu	M-I	A-III	C-V	H-I	T-II	Hn-V	K-VI	
FP-367	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
FP-368	R.T.	İç Anadolu	M-I	A-I	C-IV	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
FP-369	S.C.	Karadeniz	M-I	A-II	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
F-370	S.T.M.	Karadeniz	M-I	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-III-a	
F-371	R.T.	Karadeniz	M-I	A-IV	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-III-a	
F-372	R.T.	Karadeniz	M-VI	A-IV	C-I	H-II	T-I	Hn-I	K-III-a	
FP-374	S.F.	Karadeniz	M-I	A-II	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
NCIMB 13383	R.T.	Denmark	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
NCIMB 13384	R.T.	Denmark	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
NCIMB 1947	C.S.	USA	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
NCIMB 2282	C.S.	USA	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	
ATCC 49511	R.T.	France	M-I	A-I	C-I	H-I	T-I	Hn-I	K-la-x	

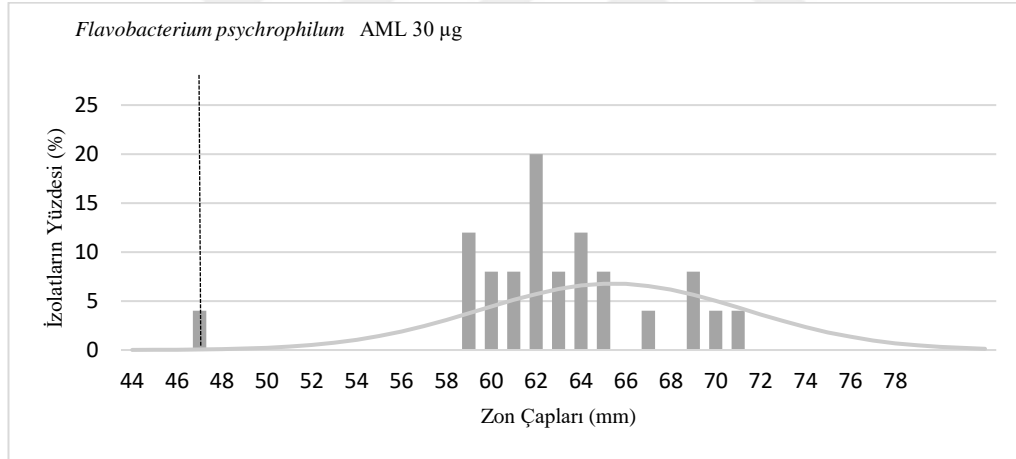
R.T: Gökkuşığı alabalığı, S.T.M: Anadolu/dağ alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*), S.F: Kaynak Alabalığı (*Salvelinus fontinalis*), S.L: Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*), S.C: Çoruh Alabalığı (*Salmo coruhensis*), C.S: Koho Salmon

#### 4.4. Antimikrobiyal duyarlılık konsantrasyonlarının belirlenmesi

##### 4.4.1. Disk difüzyon

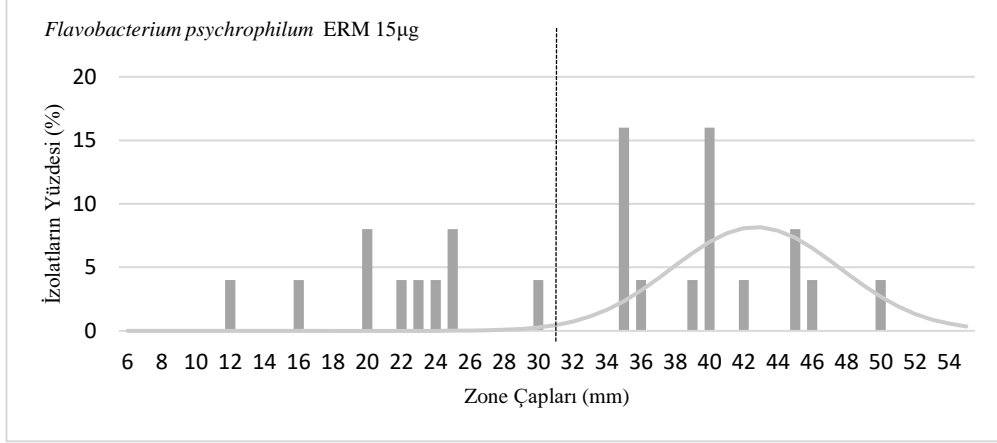
*F. psychrophilum* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde %5 FDS eklenmiş DMHA kullanılarak 18°C’de 96 saat inkube edilmiş ve inkübasyon sonrası zon çapları ölçülmüştür. Antimikrobiyallere karşı direnç gelişiminin belirlenmesinde EUCAST ve CLSI’nın önerdiği Normalize Edilmiş Yorumlama (NIR) metodu kullanılmıştır. Epidemiyolojik eşik değerleri (cut-off) belirlenerek *Flavobacterium* spp. izolatları (WT) ve (N-WT) olarak sınıflandırılmıştır.

*F. psychrophilum*’un amoksisiline karşı epidemiyolojik eşik değeri 47mm olarak bulunmuş olup zon çapı 47 mm’den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 47 mm’den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların tümünün amoksisiline karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 23).



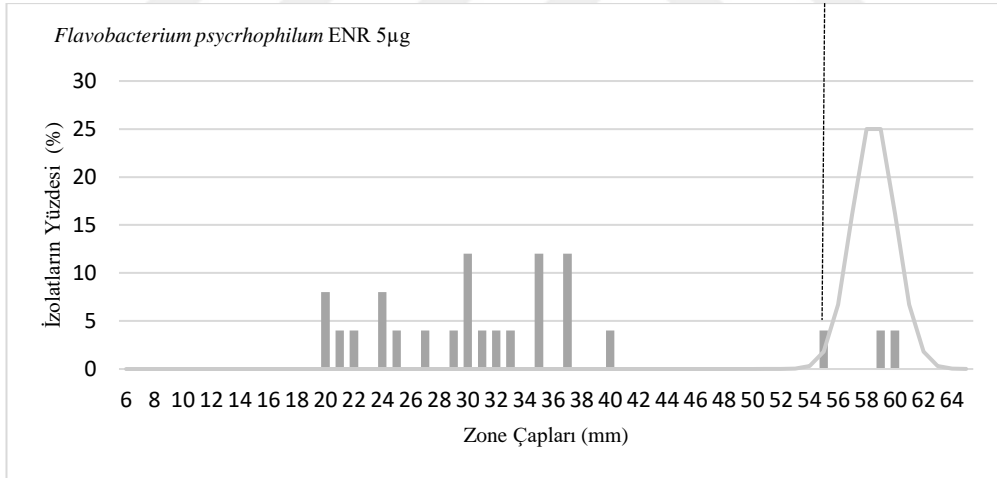
Şekil 23. *F. psychrophilum* izolatlarının amoksisiline (30 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*F. psychrophilum*’un eritromisine karşı epidemiyolojik eşik değeri 31mm olarak bulunmuş olup zon çapı 31 mm’den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 31 mm’den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %40’ının N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 24).



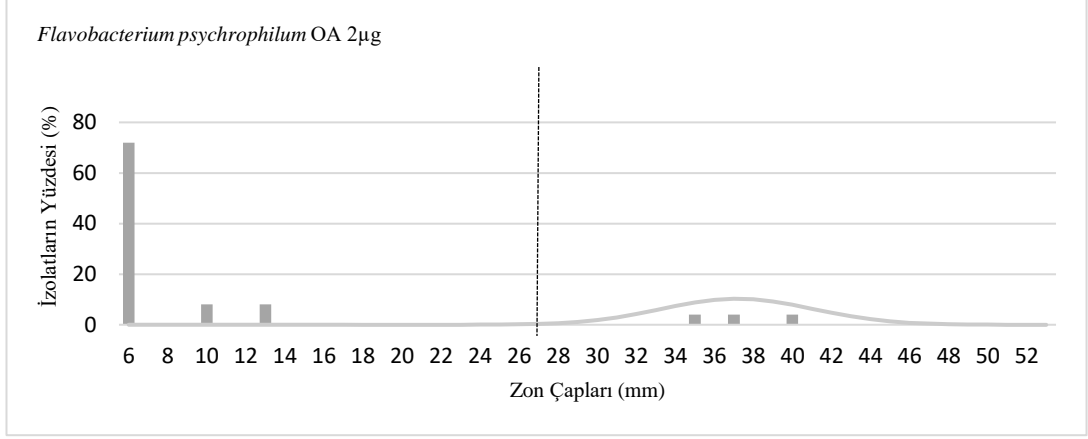
**Şekil 24.** *F. psychrophilum* izolatlarının eritromisine (15 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*F. psychrophilum*'un enrofloksasine karşı epidemiyolojik eşik değeri 55 mm bulunmuş olup zon çapı 55 mm'den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 55 mm'den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %88'inin N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 25).



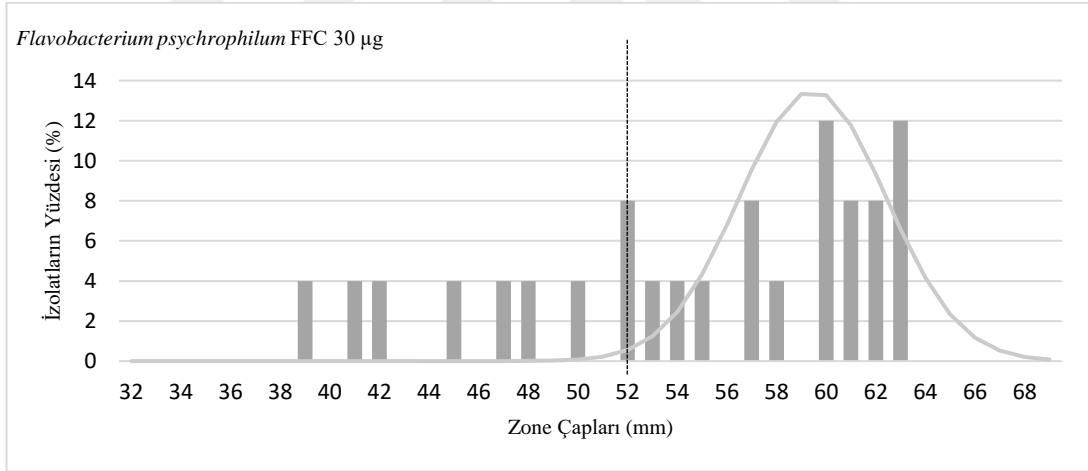
**Şekil 25.** *F. psychrophilum* izolatlarının enrofloksasine (5 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*F. psychrophilum*'un oksalinik asit karşı epidemiyolojik eşik değeri 27 mm bulunmuş olup zon çapı 27 mm'den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 27 mm'den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %88'inin N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 26).



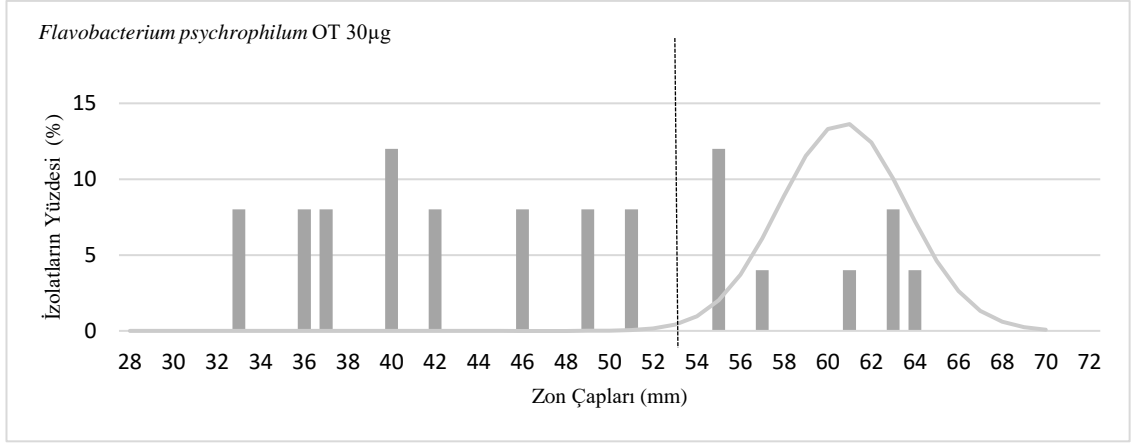
**Şekil 26.** *F. psychrophilum* izolatlarının oksalinik asite (2 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*F. psychrophilum*'un florfenikol'e karşı epidemiyolojik eşik değeri 52 mm bulunmuş olup zon çapı 52 mm'den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 52 mm'den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %28'inin N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 27).



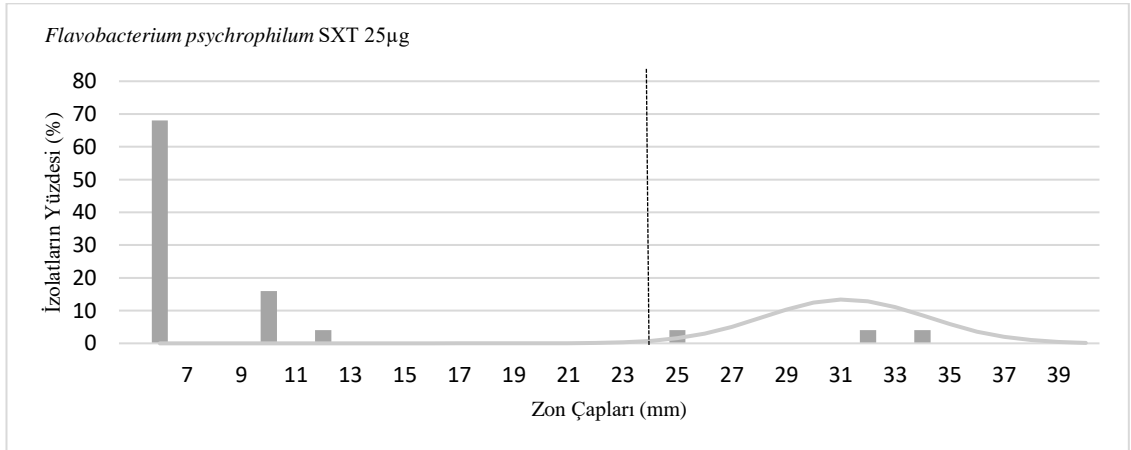
**Şekil 27.** *F. psychrophilum* izolatlarının florfenikole (30 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*F. psychrophilum*'un oksitetrasiklin'e karşı epidemiyolojik eşik değeri 53 mm bulunmuş olup zon çapı 53 mm'den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 53 mm'den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %68'inin N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 28).



**Şekil 28.** *F. psychrophilum* izolatlarının oksitetrasikline (30 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*F. psychrophilum*'un sulfamethoksazol + trimetoprim (19:1)'e karşı epidemiyolojik eşik değeri 24 mm bulunmuş olup zon çapı 24 mm'den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 24 mm'den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %88'inin N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 29, Tablo 10).



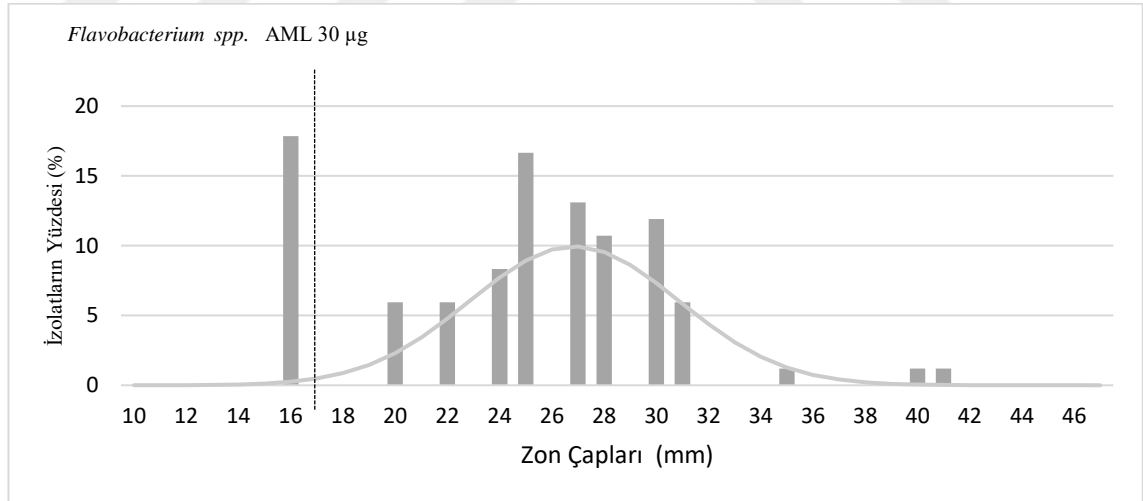
**Şekil 29.** *F. psychrophilum* izolatlarının sulfamethoksazol + trimetoprim (25 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

**Tablo 10.** Çalışmada kullanılan antimikrobiyallere karşı disk difüzyon testinde *F. psychrophilum* izolatlarının duyarlılıkları

Antimikrobiyal	Epidemiyolojik Duyarlılık Sınırı (WT ≥ mm)	Duyarlı Tip (WT)	Duyarlılığı azalan Tip (N-WT)
AML	≥ 47	25 (% 100)	0 (% 0)
ERM	≥ 31	15 (% 60)	10 (% 40)
FFC	≥ 52	18 (% 72)	7 (% 28)
ENR	≥ 55	3 (% 12)	22 (% 88)
OA	≥ 27	3 (% 12)	22 (% 88)
OT	≥ 53	8 (% 32)	17 (% 68)
SXT	≥ 24	3 (% 12)	22 (% 88)

*Flavobacterium* spp. izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde DMHA kullanılmış ve 22°C’de 48 saat inkube edilmiştir.

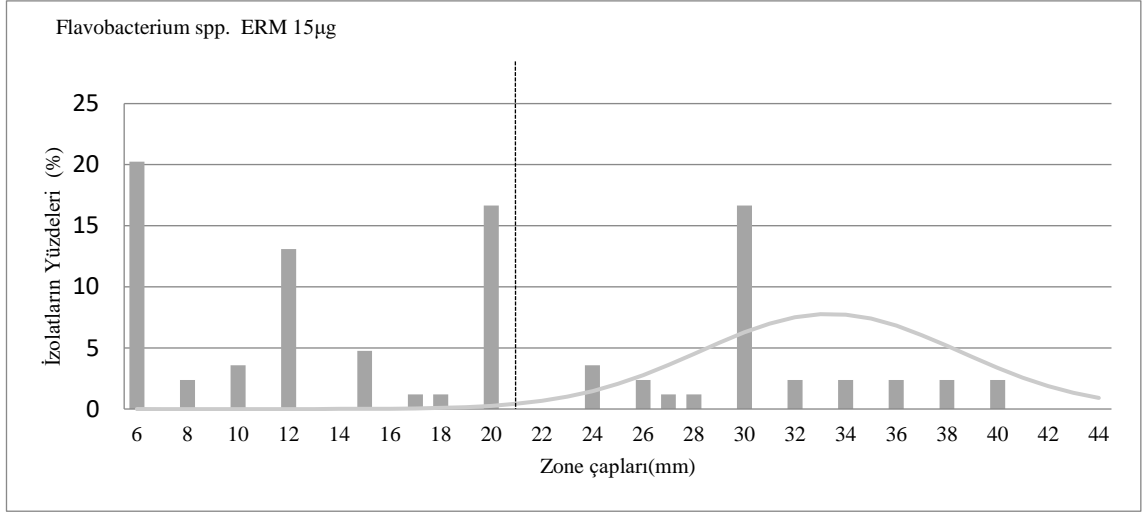
*Flavobacterium* spp.’nin amoksisiline karşı epidemiyolojik eşik değeri 17mm bulunmuş olup zon çapı 17 mm’den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 17 mm’den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %18’inin N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 30).



**Şekil 30.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının amoksisiline (30 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

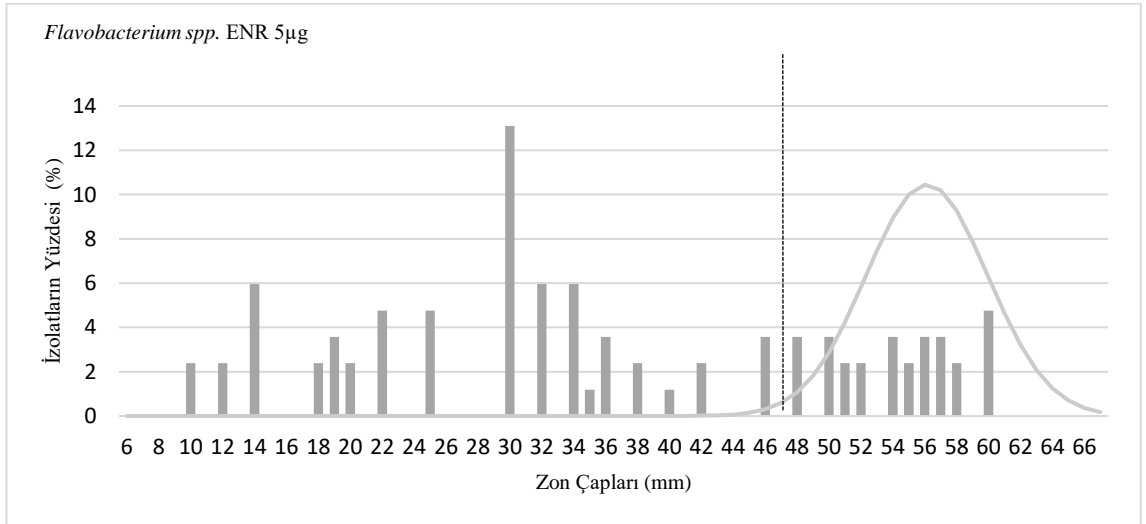
*Flavobacterium* spp.’nin eritromisine karşı epidemiyolojik eşik değeri 21mm bulunmuş olup zon çapı 21 mm’den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 21 mm’den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %53’ünün N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 31).





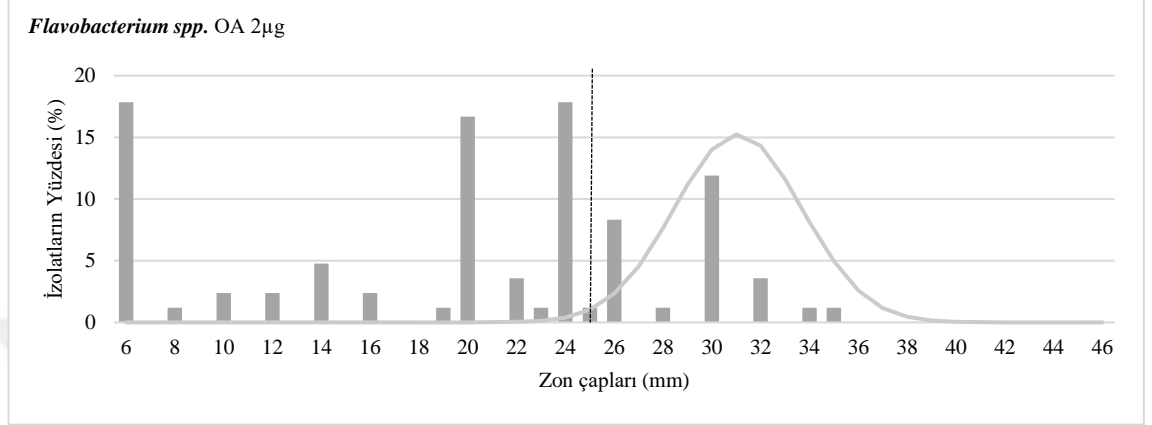
**Şekil 31.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının eritromisine (15 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*Flavobacterium* spp.'nin enrofloksasine karşı epidemiyolojik eşik değeri 47 mm bulunmuş olup zon çapı 47 mm'den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 47 mm'den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %68'inin N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 32).



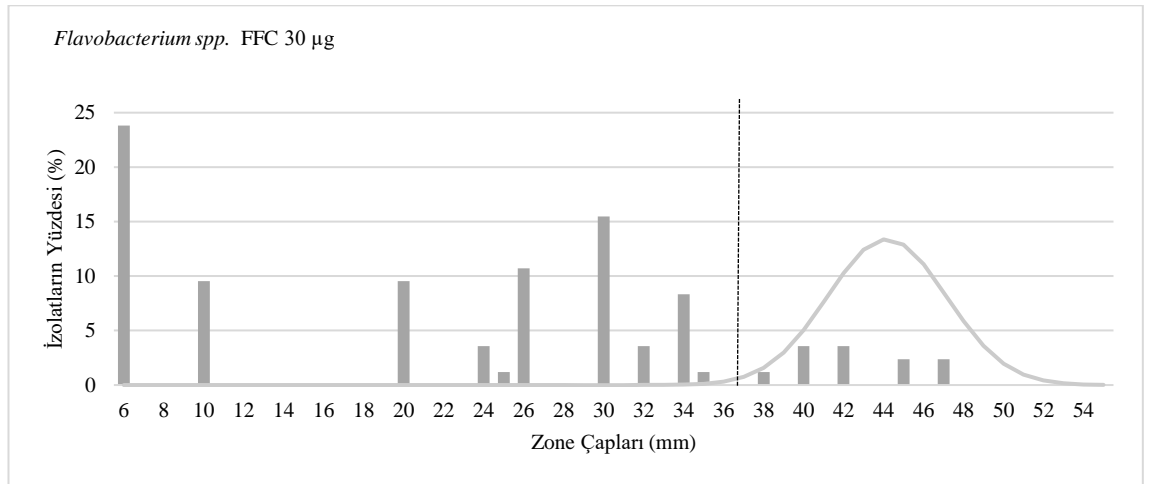
**Şekil 32.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının enrofloksasine (5 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*Flavobacterium* spp.'nin oksalinik asit karşı epidemiyolojik eşik değeri 25 mm bulunmuş olup zon çapı 25 mm'den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 25 mm'den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %72'sinin N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 33).



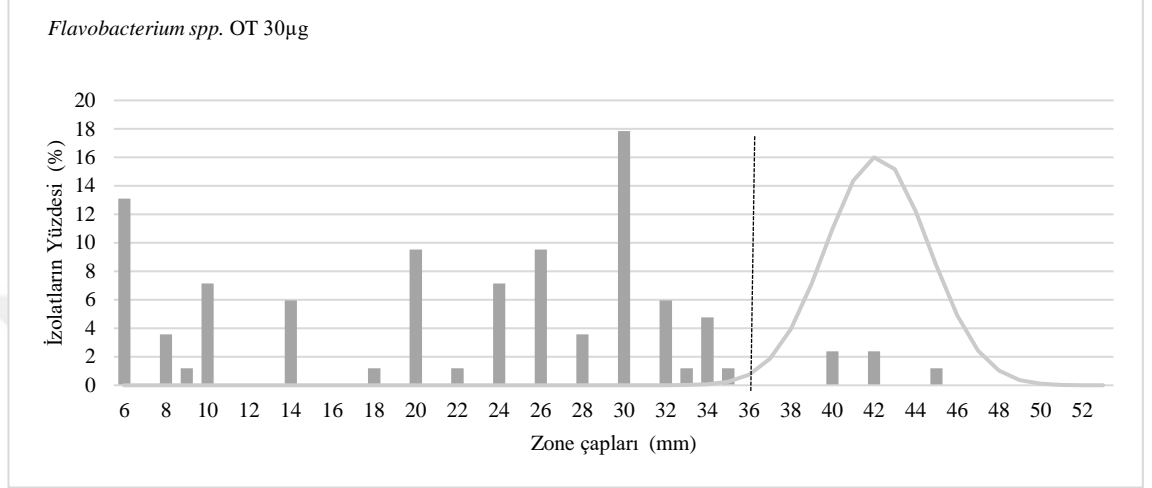
**Şekil 33.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının oksalinik asite (2 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*Flavobacterium* spp.'nin florfenikol'e epidemiyolojik karşı eşik değeri 37 bulunmuş olup zon çapı 37 mm'den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 37 mm'den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %86'nın N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 34).



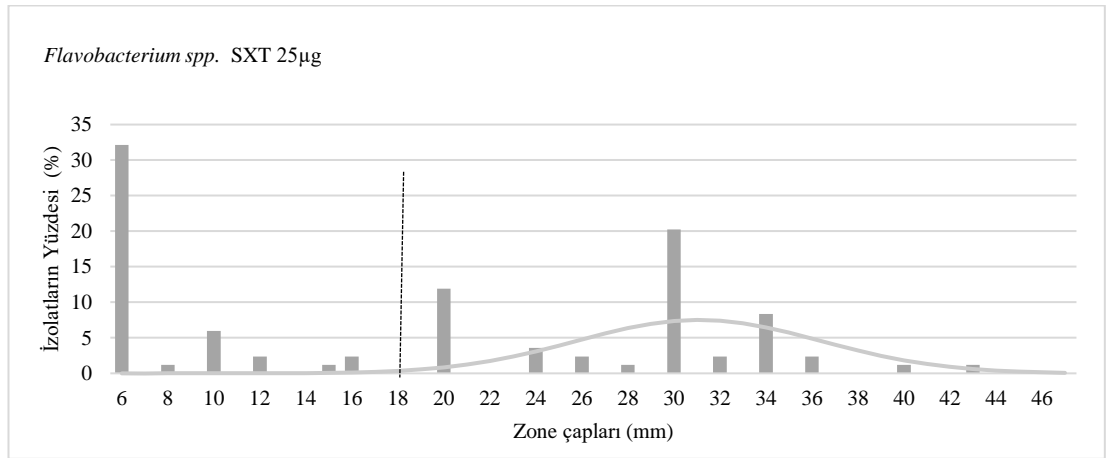
**Şekil 34.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının florfenikole (30 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*Flavobacterium* spp.'nin oksitetrasiklin'e karşı epidemiyolojik eşik değeri 36 mm bulunmuş olup zon çapı 36 mm'den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 36 mm'den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %92'sinin N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 35).



**Şekil 35.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının oksitetrasikline (30 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

*Flavobacterium* spp.'nin sulfamethoksazol + trimetoprim (19:1)'e karşı epidemiyolojik eşik değeri 18 mm bulunmuş olup zon çapı 18 mm'den büyük olan izolatlar duyarlı (WT), 18mm'den küçük olanlar ise duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak gruplandırılmıştır. İzolatların %45'inin N-WT grubunda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 36, Tablo 11).



**Şekil 36.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının sulfamethoksazol + trimetoprim (30 µg) karşı oluşturdukları zon çaplarının oransal dağılımı. Dikey kesikli dik çizgi duyarlılık sınırını belirtmektedir.

**Tablo 11.** Çalışmada kullanılan antimikrobiyallere karşı disk difüzyon testinde *Flavobacterium* spp. izolatlarının duyarlılıkları

Antimikrobiyal	Epidemiyolojik Duyarlılık Sınırı (WT ≥ mm)	Duyarlı Tip (WT)	Duyarlılığı azalan Tip (N-WT)
AML	≥ 17	69 (% 82)	15 (%18)
ERM	≥ 21	31 (% 37)	53 (% 63)
FFC	≥ 37	11 (% 24)	73 (% 86)
ENR	≥ 47	27 (% 32)	57 (% 68)
OA	≥ 25	24 (% 28)	60 (% 72)
SXT	≥ 18	46 (% 55)	38 (%45)
OT	≥ 36	7 (% 8)	77 (% 92)

#### 4.4.2 Minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi (MİK)

*Flavobacterium* spp. izolatlarının antimikrobiyallere karşı duyarlılıklarının MİK yöntemiyle belirlenmesinde EUCAST ve CLSI tarafından önerilen Normalize Edilmiş Yorumlama (NRI) metodu kullanılmıştır.

*F. psychrophilum* ve *Flavobacterium* spp. izolatlarının NRI yöntemi ile belirlenen duyarlılık durumları ve MİK Değerleri sırasıyla Tablo 12 ve Tablo 13’de verilmiştir.

**Tablo 12.** *F. psychrophilum* izolatlarının MİK Değerleri ve duyarlılığı azalmış tiplerin (N-WT) oranları

	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	64	128	Duyarlılık Sınırı (µg/ml)	N-WT oranı (%)
<b>β laktamlar</b>																		
AML		9	4	12													≤ 0,0625	0
<b>Makrolidler</b>																		
ERM							3	5	6	2	4	5					≤ 8	20
<b>Fenikoller</b>																		
FFC						7	8	6	4								≤ 2	0
<b>Kinolonlar</b>																		
ENRO	1	2			1	8	7	5	1								≤ 0.03	88
OA				2	1					3	4	9	6				≤ 0.25	88
<b>Tetrasiklinler</b>																		
OT				3	2	2	1	2	3	8	4						≤ 0,25	72
		0.008/0.15	0.015/0.30	0.03/0.59	0.06/1.19	0.12/2.38	0.25/4.75	0.5/9.5	1/19	2/38	4/76						Duyarlılık Sınırı	N-WT oranı
<b>*Sülfametoksazol + trimetoprim (19:1)</b>																		
SXT											2	3	9	9	2		≤ 16/304	-

**Tablo13.** *Flavobacterium* spp. izolatlarının MİK Değerleri ve duyarlılığı azalmış tiplerin (N-WT) oranları

	0.008	0.016	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	Duyarlılık Sınırı (µg/ml)	N-WT oranı (%)				
<b>β laktamlar</b>																						
AML	6	12	16	10	3	15	8		3	2	4		5				≤ 0,25	26				
<b>Makrolidler</b>																						
ERM	1	2	5	2	13	2	15	1	5	5	6	9	8	4	1	5	≤ 0,25	70				
<b>Fenikoller</b>																						
FFC			3	3	4	1	3	4	6	9	14	13	11	9	4		≤ 0,5	83				
<b>Kinolonlar</b>																						
ENRO	7	8	5	5	7	8	5	7	9	8	7	8					≤ 0.0625	77				
OA		1	9	9	5	8	8	5	7	6	5	7	6	5	3		≤ 0.125	72				
<b>Tetrasiklinler</b>																						
OT	8	3	2	6	13	12	11	4	3	5	4	9	2	2			≤ 0,0312	87				
<hr/>																						
	0.008/0.15		0.015/0.30		0.03/0.59		0.06/1.19		0.12/2.38		0.25/4.75		0.5/9.5		1/19		2/38		4/76		Duyarlılık Sınırı (µg/ml)	N-WT oranı (%)
<b>*Sülfametoksazol + trimetoprim (19:1)</b>																						
SXT		2		5		10		10		6		5		5		26		15			≤ 0,25/4,75	54

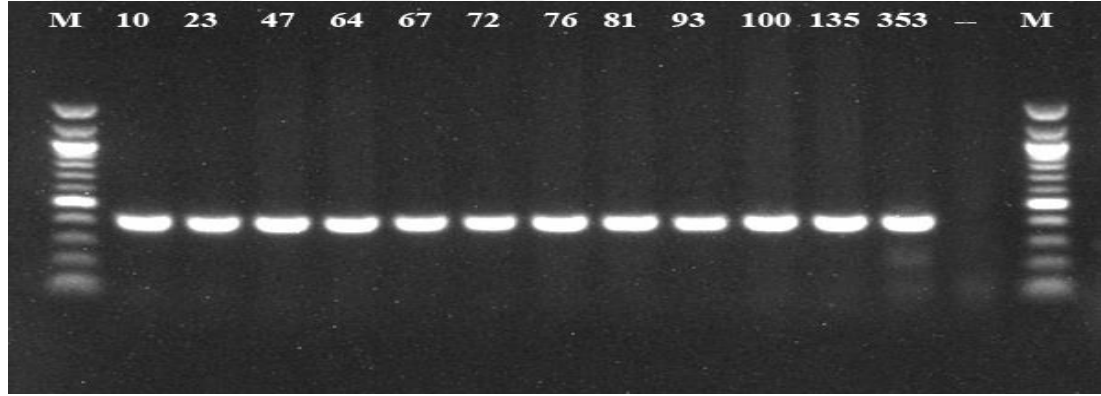
#### 4.5. Antimikrobiyal direnç genleri

Bu çalışmada;

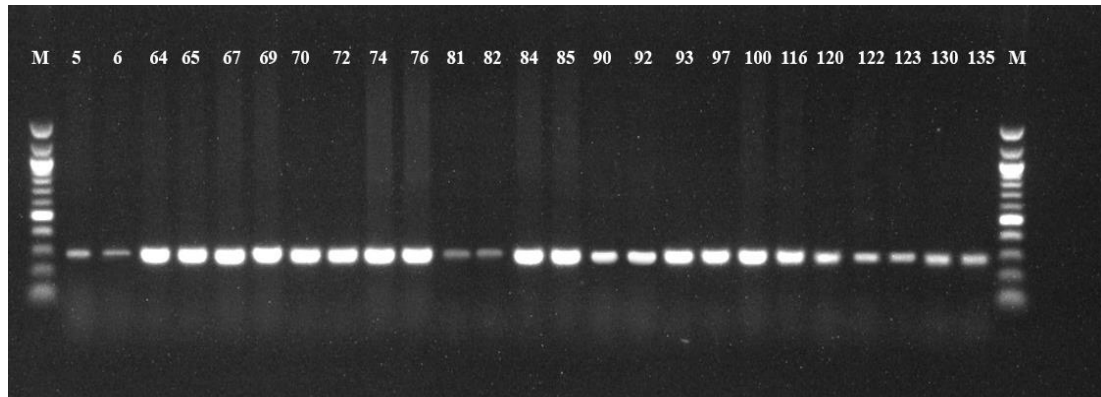
- ✓ 25 *F. psychrophilum* izolatından birinin *floR*, 4'ünün *sul2* direnç geni taşıdığı,
- ✓ 84 *Flavobacterium* spp. izolatından 11'inin *floR*, 23'ünün *sul2* direnç geni taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 37, 38).
- ✓ *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE*, *tetH*, *tetM*, *tetL*, *sul1*, *sul3*, *qnrA*, *qnrB* ve *qnrS* direnç genleri tespit edilememiştir.

Direnç geni tespit edilen *Flavobacterium* türlerinin MİK değerleri ve fenotipik duyarlılık durumlarına (NW/ N-WT) ilişkin sonuçlar tablo 14'e verilmiştir.

PCR ile tespit edilen direnç genlerinin doğrulaması dizi analizi ile yapılmıştır.



Şekil 37. *floR* geni pozitif örnekler 399 bp (M; Marker; 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, --; negatif kontrol)



Şekil 38. *Sul2* geni pozitif örnekler 293 bp (M; Marker; 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500)

*F. psychrophilum* izolatlarında kinolon direncinin belirlenmesi için; DNA Giraz (*gyrA*, *gyrB*) ve topoisomerez IV (*parC* ve *parE*) gen bölgelerinde meydana

gelen kromozomal mutasyonlar dizi analizi ile belirlendikten sonra NCBI’da kayıtlı referans suşlarla karşılaştırması yapılmıştır (Tablo 15).

Fenotipik olarak kinolon direnci saptanan izolatların %95’inde *gyrA* bölgesinde 244. ve/veya 245. nükleotidin mutasyona uğradığı buna bağlı olarak 82. amino asit olan treonin değişime uğrayarak arjinin, valin veya isolösine dönüştüğü, ancak fenotipik olarak dirençli olmasına rağmen FP-374 nolu izolatta ise *gyrA* bölgesinde herhangi bir mutasyon oluşmadığı görülmüştür.

*F. psychrophilum* izolatların %92’sinin *gyrB* bölgesinde. 474, 528, 642, 927, 1053, 1176, 1326, 1371, 1407, 1413, 1431, 1452, 1455, 1458, 1464, 1473 ve 1476. nükleotidlerde mutasyon şekillenmesine rağmen amino asit değişimi (sessiz mutasyon) oluşmadığı belirlenmiştir. İzolatların %8’sinin *parC* bölgesinde 159, 426, 537 ve 540. nükleotidlerde sessiz mutasyon (amino asit değişimi olmadığı) tespit edilmiştir. Buna karşılık izolatların %18’inde *parE* bölgesinde 1795. nükleotidin mutasyona uğradığı ve 599. aminoasit olan aspartanın değişime uğrayarak asparagine dönüştüğü saptanmıştır.

**Tablo 14.** Flavobacterium izolatlarının antimikrobiyal duyarlılığı ve tespit edilen direnç genleri

İzolat no	FFC	Duyarlılık Durumu	<i>floR</i>	SXT	Duyarlılık Durumu	<i>sul2</i>
F-5	8	N-WT		0,12/2,38		+
F-6	16	N-WT		0,25/4,75		+
F-10	16	N-WT	+	0,015/0,30	WT	
F-23	8	N-WT	+	0,015/0,30	WT	
F-47	4	N-WT	+	0,015/0,30	WT	
F-64	32	N-WT	+	0,12/2,38		+
F-65	32	N-WT		2/38		+
F-67	64	N-WT	+	2/38		+
F-69	32	N-WT		1/19		+
F-70	0,064	WT		0,12/2,38		+
F-72	64	N-WT	+	1/19		+
F-74	128	N-WT		0,06/1,19		+
F-76	128	N-WT	+	2/38		+
F-81	64	N-WT	+	0,5/9,5		+
FP-82	0,5	WT		2/38		+
F-84	32	N-WT		0,03/0,59		+
F-85	32	N-WT		0,03/0,59		+
FP-90	<b>0,5</b>	<b>WT</b>		<b>1/19</b>		+
F-92	16	N-WT		2/38		+
F-93	16	N-WT	+	0,12/2,38		+
F-97	8	N-WT		2/38		+
FP-100	<b>2</b>	<b>WT</b>	+	<b>4/76</b>		+
FP-116	1	N-WT		4/76		+
FP-120	<b>0,25</b>	<b>WT</b>		<b>1/19</b>		+
F-122	4	N-WT		1/19		+
FP-123	<b>0,5</b>	<b>WT</b>		<b>2/38</b>		+
F-130	32	N-WT		1/19		+
F-135	4	N-WT	+	1/19		+
F-319	64	N-WT		1/19		+
F-353	4	N-WT	+	0,06/1,19		+

W: Wild Tip, NW: Non- Wild Tip,



**Tablo 15.** *F. psychrophilum* izolatlarının kinolon grubu antimikrobialerine karşı duyarlılığı ve tespit edilen kromozomal mutasyonları

İzolat no	ENR	Duyarlılık Durumu	OA	Duyarlılık Durumu	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	ParC	ParE
FP-24	1	N-WT	16	N-WT	K.M	S.M		
FP-34	0.25	N-WT	8	N-WT	K.M	S.M		
FP-37	0.25	N-WT	8	N-WT	K.M	S.M		
FP-73	1	N-WT	8	N-WT	K.M	S.M		
FP-82	2	N-WT	16	N-WT	K.M	S.M		
FP-90	0.5	N-WT	8	N-WT	K.M	S.M		
FP-94	1	N-WT	16	N-WT	K.M	S.M		
FP-95	0.5	N-WT	16	N-WT	K.M	S.M		
FP-100	0.5	N-WT	8	N-WT	K.M	S.M		
FP-102	0.5	N-WT	8	N-WT	K.M			
FP-108	0.5	N-WT	4	N-WT	K.M	S.M		K.M
FP-109	0.25	N-WT	8	N-WT	K.M	S.M		
FP-116	0.5	N-WT	16	N-WT	K.M	S.M		K.M
FP-120	0.25	N-WT	8	N-WT	K.M	S.M		
FP-123	0.5	N-WT	8	N-WT	K.M	S.M		K.M
FP-311	0.008	WT	0.125	WT		S.M		
FP-312	1	N-WT	16	N-WT	K.M	S.M		
FP-313	0.016	WT	0.064	WT				
FP-314	0.016	WT	0.064	WT		S.M		
FP-315	1	N-WT	4	N-WT	K.M	S.M		
FP-335	0.25	N-WT	4	N-WT	K.M	S.M		K.M
FP-367	0.25	N-WT	2	N-WT	K.M	S.M		
FP-368	0.25	N-WT	4	N-WT	K.M	S.M		
FP-369	0.25	N-WT	2	N-WT	K.M	S.M	S.M	
FP-374	0.125	N-WT	2	N-WT		S.M	S.M	

WT; Duyarlı, N-WT; Duyarlılığı azalmış, KM; Kayıp Mutasyon, SM; Sessiz Mutasyon  
**Sarı** ile işaretli gruplarda 245. Nükleotidin değişmesinden dolayı 82. Amino asit Treonin'den arjinine dönmüştür.

**Yeşil** ile işaretli gruplarda 244 ve 245.. Nükleotidlerin değişmesinden dolayı 82. Amino asit Threonine'den Valine dönmüştür.

**Turkuaz** ile işaretli gruplarda 245. Nükleotidin değişmesinden dolayı 82. Amino asit Threonine'den İzösin'e dönmüştür.

**Kırmızı** ile işaretli gruplarda 1795. Nükleotidin değişmesinden dolayı 599. Amino asit Aspartate'dan Asparagine dönmüştür.

Tez çalışmasında tespit edilen direnç genlerinin dizi analizi yapılmış ve genbank (NCBI) veritabanına kaydı yapılmıştır. Gen kaydına ait kayıt numaraları Tablo 16.'da verilmiştir.

**Tablo 16.** Tez çalışmasında tespit edilen direnç genlerini Genbank kayıt numaraları

İzolat No	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>floR</i>	<i>Sul2</i>
F- 5						MG494266
F-6						MG494267
F-10					MG495145	
F-23					MG495146	
FP-24	MG495157	MG495180	MG495203	MG525554		
FP-34	MG495158	MG495181	MG495204	MG525555		
FP-37	MG495159	MG495182	MG495205	MG525556		
F-47					MG495147	
F-64					MG495148	MG494268
F-65						MG494269
F-67					MG495149	MG494270
F-69						MG494271
F-70						MG494272
F-72					MG495150	MG494273
FP-73	MG495160	MG495183	MG495206	MG525557		
F-74						MG494274
F-76					MG495156	MG494275
F-81					MG495151	MG494276
FP-82	MG495161	MG495184	MG495207	MG525558		MG494277
F-84						MG494278
F-85						MG494279
FP-90	MG495162	MG495185	MG495208	MG525559		MG494280
F-92						MG494281
F-93					MG495152	MG494282
FP-94	MG495163	MG495186	MG495209	MG525560		
FP-95	MG495164	MG495187	MG495210	MG525561		
F-97						MG494283
FP-100	MG495165	MG495188	MG495211	MG525562	MG495153	MG494284
FP-102						
FP-108	MG495166	MG495189	MG495212	MG525563		
FP-109	MG495167	MG495190	MG495213	MG525564		
FP-116	MG495168	MG495191	MG495214	MG525565		MG494285
FP-120	MG495169	MG495192	MG495215	MG525566		MG494286
F-122						MG494287
FP-123	MG495170	MG495193	MG495216	MG525567		MG494288
F-130						MG494289
F-135					MG495154	MG494290
FP-311	MG495171	MG495194	MG495217	MG525568		
FP-312	MG495172	MG495195	MG495218	MG525569		
FP-313						
FP-314	MG495173	MG495196	MG495219	MG525570		
FP-315	MG495174	MG495197	MG495220	MG525571		
F-319						MG494300
FP-335	MG495175	MG495198	MG495221	MG525572		
F-353					MG495155	MG494301
FP-367	MG495176	MG495199	MG495222	MG525573		
FP-368	MG495177	MG495200	MG495223	MG525574		
FP-369	MG495178	MG495201	MG495224	MG525575		
FP-374	MG495179	MG495202	MG495225	MG525576		

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

*Flavobacteriaceae* familyasına mensup türler; tatlı ve tuzlu suda yaşayan balıklar başta olmak üzere, bitkiler (Bernardet ve Nakagawa, 2006), omurgasızlar (Li ve ark., 2010), amfibiler (Xie ve ark., 2009), sürüngenler (Hernandez-Divers ve ark., 2009), kuşlar (Segers ve ark., 1993) ve insanların da dahil olduğu (Benedetti ve ark., 2011) birçok (Haburjak ve Schubert, 1997) canlı organizma türünde hastalık vakalarından bildirilmiştir (Loch ve Faisal, 2015). Bu türlerin fenotipik identifikasyonda; morfolojik, fizyolojik, metabolik, biyokimyasal, kemotaksonomik özellikler (hücre duvarı bileşikleri, yağ asiti profili vb.), faj tiplendirme, yüzey antijenleri ve antimikrobiyal duyarlılık profilleri kullanılmaktadır.

*Flavobacterium* türlerinin fenotipik olarak identifikasyonunda; farklı sıcaklıklarda üreme, koloni morfolojisi, karbonhidrat fermantasyonu, jelatin ve eskülin hidrolizi, kondroitinaz üretimi, oksidaz, katalaz, nitrat indirgenmesi, hidrojen sülfid üretimi, tuzluluk toleransı ve fleksirubin pigment varlığı gibi birçok testin yapılması gerekmektedir. Bu testlerin yapılabilmesi için ortalama 7-10 gün bir süre gerekmektedir. Ancak söz konusu fenotipik özelliklerinin aynı tür içerisinde heterojenite göstermeleri (spontan mutasyonlar ve kromazal farklıklar nedeniyle büyüme koşullarındaki değişimler) ve tekrarlanabilirliklerinin zayıf olması, fenotipik testlerle yapılan identifikasyonların güvenilirliğinin sorgulanmasına yol açmaktadır. Ayrıca *Flavobacterium* türlerinde biyokimyasal ve fenotipik testler için harcanan sürenin uzun olması ve belirli bir standardının olmaması gibi nedenler araştırmacıları daha hızlı ve güvenilir sonuçlar veren moleküler yöntemlere yöneltmektedir.

*Flavobacterium* türlerinin dizi analizi ile yapılan identifikasyonda 16S rRNA ve DNA gyrase bölgeleri kullanılmaktadır. Ancak 16S rRNA bölgesi birbiri ile çok yakın ilişkili olan türlerin birbirinden ayrılmasında yeterli olmayabilir (Bernardet ve Nakagawa, 2006; Fox ve ark., 1992). Bu gibi durumda bakterinin farklı bir gen bölgesi veya bölgeleri kullanılarak (23S rDNA 16S+23S rDNA, *gyrA* ve *gyrB*) cins veya tür düzeyinde identifikasyon yapılabilmektedir.

Bu çalışmada 16S rRNA bölgesi kullanılarak yapılan dizi analizinde 109 *Flavobacterium* spp. izolatından 27 farklı *Flavobacterium* türü tanımlanmıştır. Bu türler içerisinde; *F. psychrophilum* (%23), *F. branchiarum* (%15,5) ve *F. tiangeerense* (%8)'nin en yaygın türler olduğu tespit edilmiştir.

*Flavobacterium* türleri başta salmonid balıklar olmak üzere birçok tatlı su balık türünden izole edildiği bildirilmiştir (Loch ve Faisal, 2015). Çalışmamızda gökkuşığı alabalığı ve lokal olarak üretimi yapılan doğal alabalık türlerinde (Anadolu/dağ alabalığı, kaynak alabalığı, karadeniz alabalığı, Çoruh alabalığında) hastalık vakalarından *Flavobacterium* spp. izole edilmiştir. Bu izolatların yaklaşık %63'ü 0,1-2 gram ağırlığındaki balıklardan izole edilmiştir. Bu durum gökkuşığı alabalığı kuluçkahanelerinde Flavobakteriyozisin önemli bir sorun olduğunu göstermektedir (Madetoja ve ark., 2002; Wiklund ve ark., 1994).

### ***F. psychrophilum***

Ülkemizde geçmiş yıllarda yapılan birçok araştırmada, gökkuşığı alabalıklarındaki hastalık vakalarından *F. psychrophilum* rapor edilmiştir (Çağırman ve ark., 1997; Diler ve ark., 2003; Öztürk ve Altınok, 2014). Çalışmamızda da 5 farklı bölgeden *F. psychrophilum* izole edilmiştir.

Brown ve arkadaşları (1997) *F. psychrophilum*'un vertikal olarak anaçlardan yavruya sperm ve yumurta vasıtasıyla geçtiğini; Kubilay ve ark (2009); *F. psychrophilum*'un anaçlardan, kuluçkahane suyundan ve yumurtalardan izole edildiğini, anaçlardan ve yumurtadan larvaya bulaşmanın mümkün olabildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda gökkuşığı alabalığı anaçlarına ait spermden *F. psychrophilum*'un izole edilmesi araştırmacıların vertikal geçiş konusundaki raporlarını desteklemektedir.

*F. psychrophilum*'un epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesinde PFGE, PCR-RFLP, RAPD-PCR ve ribotiplendirme gibi yöntemler kullanılmaktadır (Chakroun ve ark., 1997; Chakroun ve ark., 1998; Izumi ve ark., 2003; Lorenzen ve ark., 1997; Madsen ve Dalsgaard, 1999). PCR-RFLP yöntemi; izolatlar arasındaki genetik varyasyonun belirlenmesinde kullanılan ayırım gücü yüksek, kolay uygulanabilen güvenilir bir yöntemdir (Tabata, 2004).

Bu çalışmada daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak *F. psychrophilum* izolatının genetik yakınlıklarının belirlenmesinde PCR-RFLP kullanılmıştır. İzolatların genetik yakınlıklarının belirlenmesi için *gyrA*'nın 396 bp uzunluğundaki kısmının *MphI103I* enzimi ile kesilmesi neticesinde elde edilen profiller karşılaştırılmıştır. Izumi ve ark., (2007) ayu ve gökkuşacağı alabalıklarından izole edilen *F. psychrophilum* izolatlarını kullanarak yaptığı genotiplendirmede; ayu balıklarında QR genotipinin (%82,4) ve gökkuşacağı alabalıklarında QS genotipinin (%82,3) yaygın olduğunu bildirilmiştir. Çalışmamızda ise gökkuşacağı alabalığı ve diğer lokal alabalık (Çoruh alabalığı ve kaynak alabalığı) izolatlarının tamamının QS genotipine ait olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada *F. psychrophilum* izolatlarının *gyrB* bölgesi kullanılarak yapılan RFLP analizinde gökkuşacağı alabalığı izolatlarının %87'sinin S genotipinde, %13'ünün R genotipinde olduğu ve ayrıca Çoruh ve kaynak alabalığı izolatlarının ise S genotipinde yer aldığı belirlenmiştir. Japonya'da gökkuşacağı alabalığından izole edilen *F. psychrophilum* izolatları kullanılarak yapılan bir çalışmada izolatların %90,3'ünün "R" genotipinde olduğu, (Izumi ve ark. 2003) ve Şili'de ise gökkuşacağı alabalıklarından izole edilen izolatlarının %55,6'sının R genotipinde olduğunu bildirmiştir (Valdebenito ve Avendaño-Herrera, 2009). Bu çalışmada kullanılan *F. psychrophilum* izolatlarının %87'sinin S genotipinde yer almasıyla Japonya ve Şili izolatları ile yapılan araştırmalardan farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

*F. psychrophilum* izolatlarının 16S rRNA bölgesinin *MnII* enzimi ile kesilerek yapılan RFLP analizinde, Solue ve ark., (2005) ve Hesami ve ark., (2008) 2 genotip (Lin I ve II) bildirirken, çalışmamızda bu iki genotipe ilaveten Lin-III olarak adlandırdığımız yeni bir genotip belirlenmiştir. Bu çalışmada Lin-I'de: koho salmonlardan izole edilmiş olan NCIMB 1947, NCIMB 2248 suşları yer alırken, Lin-II'de; gökkuşacağı alabalığı, Çoruh alabalığı ve kaynak alabalığından izole edilen izolatlar, Lin III'de; gökkuşacağı alabalığından izole edilmiş olan FP-24 yer almıştır. Ramsrud ve ark., (2007) 4 farklı kıta ve 11 farklı balık türünden izole edilmiş olan 73 *F. psychrophilum* izolatı ile yaptığı çalışmada pasifik salmonlarda her iki genotipinde (Lin I ve II) bulunabildiğini, gökkuşacağı alabalığından izole edilen izolatların ise sadece Lin-II genotipinde yer aldığını bildirmesi, çalışma sonuçlarımızla benzerlik göstermiştir (Ramsrud ve ark., 2007). Gelecekteki araştırmalarda, izolatların izole

edildiği balık türüyle bağlantılı olarak farklılık gösterebilme durumu ve Lin-III genotipinde yer alan FP-24 nolu izolatin farklı bir profil vermesi üzerinde durulmalı ve ayrıntılı dizi analizleri yapılarak, farklılığın nedenleri üzerinde çalışılmalıdır.

Bu çalışmada 16S rRNA'nın (1092 bp) bölgesi *AluI* ve *TaqI* enzimleri ayrı ayrı kesilmesi sonucunda sırasıyla A-I, A-II ve T-I, T-II olmak üzere iki farklı RFLP profili belirlenmiştir. Her iki enzimle kesim sonrasında benzer profiller elde edilmiştir. Gökkuşuğu alabalığı ve koho salmon izolatlarının aynı grupta (A-I ve T-I), Çoruh ve kaynak alabalığı izolatlarının ise A-II ve T-II farklı bir grupta yer aldığı tespit edilmiştir. *AluI* veya *TaqI* enzimi kullanımı durumunda konakçı ayırımının kısmi olarak yapılabildiği ancak coğrafik bölge ayırımının tam olarak yapılamadığı görülmüştür.

*gyrB* ve 16S rRNA bölgelerinin PCR-RFLP analizi ile oluşturulan ortak RFLP profillerinin ortalama benzerlik bağlantısı kullanılarak yapılan filogenetik analizde 3 genetik gruba ayrıldığı görülmüştür. RFLP-I grubunu yalnızca gökkuşuğu alabalığı izolatlarından oluşurken RFLP-II grubu Çoruh ve kaynak alabalıklarından izole edilen izolatlardan oluşmaktadır. RFLP-III grubu ise %95 benzerlik oranı ile 2 genotipe ayrılmıştır. RFLP-IIIa genogrubu koho salmon izolatlarından oluşurken RFLP-IIIb genotipi 2014 yılında İç Anadolu'dan izole edilen FP-24 nolu izolattan oluşmaktadır. Bu izolatin diğer gökkuşuğu alabalığı izolatlarına benzerliği %86,9 bulunmuştur.

Bu çalışmada kullanılan tüm RFLP profillerinin coğrafik ve konakçı ayırımının yapılabilmesi amacıyla jel görüntülerinin ayrı ayrı ve kombine edilerek karşılaştırılması yapıldı. Tek tek analizi yapılan jel görüntülerinin konakçı ayırımını tam olarak yapamadığı görülmüştür. Jel görüntülerinin kombine edilerek birlikte kullanılmasıyla oluşturulan ortak RFLP profilinde ise bakterinin izole edildiği konakçının ayırımının yapılabildiği fakat coğrafik bölge ayırımının yapılamadığı belirlenmiştir.

Ülkemizde 5 farklı bölgesinden izole edilen *F. psychrophilum* izolatlarının genotipik olarak homojen bir yapıda olması, işletmeler arasında yumurta ve yavru balık transferlerinin yapılması, aynı su kaynağında çok sayıda işletme olması sebebiyle etkenin yayılım göstermesine bağlanabilir.

RTFS/BCWD'ye birçok aşı çalışması yapılmasına rağmen etkili bir ticari aşı mevcut değildir. *F. psychrophilum* 'e karşı antibiyotik kullanımına alternatif olarak

sunulan faj tedavisi ve probiyotik bakterilerin kullanımına yönelik çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir. Fakat bunların *F. psychrophilum* enfeksiyonunu önlemede etkisinin tam olarak kanıtlanması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, RTFS/BCWD salgınlarını kontrol etmek için antibiyotiklerin kullanımı tek seçenektir. Bu durumun *F. psychrophilum*'da antimikrobiallere karşı direnç geliştirmesine neden olacağı şüphesizdir (Gomez ve ark., 2014).

*F. psychrophilum*'un antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesine yönelik çok sayı çalışma mevcuttur (Boyacıoğlu ve ark., 2015; Boyacıoğlu ve Akar, 2012; Bruun, ve ark., 2003; Durmaz ve ark., 2012; Kum ve ark., 2008; Michel ve Garcia, 2003; Smith ve ark., 2016; Soule ve ark., 2005). Ancak, bu çalışmalarda farklı besi yerleri ve inkübasyon sıcaklıkların kullanılması antimikrobiyal duyarlılık testlerindeki verilerin karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır.

Bu çalışmada *F. psychrophilum*'un antimikrobiyal duyarlılığının fenotipik olarak belirlenmesinde disk difüzyon ve MİK testleri kullanılmıştır. AML, ENR, OT ve OA antimikrobiallerinde disk difüzyon sonuçları MİK testiyle birbirine benzerlik gösterirken, ERM, FFC ve SXT'de bu iki test arasında farklılık görülmüştür. Bu nedenle zorunlu psikrofilik bir bakteri olan *F. psychrophilum* gibi bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde MİK testinin kullanılması önerilmektedir (Smith ve Kronvall, 2015; Smith ve ark., 2018).

Bu çalışmada *F. psychrophilum* izolatlarının florfenikole karşı eşik değerinin 2 mg/l olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar; CLSI (2018), Van Vliet ve ark. (2017), Ngo ve ark., (2017) ve Smith ve ark., (2016)'nın çalışma sonuçları ile benzerlik göstermiş ve çalışmamızda da kullanılan tüm *F. psychrophilum* izolatlarının florfenikole karşı duyarlı tipte (WT) olduğu belirlenmiştir.

Gram negatif bakterilerde florfenikol direncinden primer olarak ilacın hücre dışına çıkartılmasından sorumlu olan *floR* geninin sorumlu olduğu bilinmektedir (Fernández-Alarcón ve ark., 2010). Bu gen, salmonidlerde hastalık yapan *Hafnia alveai*, *Pseudomonas* spp., *Citrobacter freundii* gibi türlerde rastlanırken; Flavobacterium türlerinden henüz rapor edilmemiştir (Miranda ve ark., 2013). Verner-Jeffreys ve ark. (2017); *Flavobacterium* spp. ile aynı genusta yer alan *Chryseobacterium* spp. izolatlarında florfenikol (*floR*), tetrasiklin (*tetX*), streptotrisin ve kloramfenikol asetiltransferaz genlerini içeren gen kaseti tespit etmiştir. Fakat tespit

edilen bu gen kasetinin *Flavobacteriaceae* izolatlarında yaygın olmadığını bildirmiştir (Verner-Jeffreys ve ark., 2017). Çalışmamızda daha önce *F. psychrophilum* izolatlarında bildirilmemiş olan *floR* geni FP-100 nolu izolatta tespit edilmiş ancak FP 100 nolu izolatın florfenikole karşı duyarlı (WT) tipte olduğu ve direnç geni varlığını fenotipine yansımadağı görülmüştür. Bu durum *floR* geninin ekspresyon sentezinin düzenlenmesi ve florfenikol direncinin fenotipik ekspresyonuyla bağlantılı konakçı faktörlerinin belirlenmesine yönelik daha ayrıntılı çalışmalar yapılmasına ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada *F. psychrophilum* izolatlarının eşik değerinin enrofloksasinde 0,03 mg/l, oksalinik asitte ise 0,25 mg/l olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan epidemiyolojik eşik değeri; CLSI (2018), Van Vliet ve ark. (2017), Ngo ve ark., (2017) ve Smith ve ark., (2016)'nın aynı yöntemle belirlemiş oldukları eşik değerlerle benzerlik göstermektedir. Ngo ve ark., (2017); İngiltere'den izole edilmiş olan izolatlarla yaptıkları çalışmada; enrofloksasin ve oksalinik asite karşı duyarlılıkları azalan izolatların (N-WT) oranını sırasıyla %85 ve %84 olarak belirlemiştir. Smith ve ark., (2014); İngiltere ve Danimarka izolatlarıyla yaptıkları çalışmada oksalinik asitin N-WT oranının %48 olduğunu bildirmiştir. Van Vliet ve ark. (2017) ise Amerika'dan izole edilmiş izolatlarla yaptıkları çalışmada hem enrofloksine hem de oksalinik asite karşı tüm izolatların duyarlı tipte (WT) olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada da, *F. psychrophilum* izolatlarının enrofloksasin ve oksalinik asit antimikrobiyallerinde N-WT oranı %88 olarak tespit edilmiştir.

Gram negatif bakterilerde *gyrA*, *gyrB*, *parC* ve *parE* genlerindeki noktasal mutasyonlar sonucunda kinolonlara karşı oluşan direnç seviyesinin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Akuakültürde kinolonların yaygın kullanımı sonucunda *A. salmonicida*, *Edwardsiella tarda* ve *Photobacterium damsela* gibi bazı balık patojenlerinde tespit edilen oksalinik asit direncinin *gyrA* bölgesindeki mutasyondan kaynaklandığı bildirilmiştir (Goñi-Urriza ve ark., 2002; Kim ve ark., 2011). Farklı araştırmacılar tarafından *F. psychrophilum*'un kinolonlara karşı direnç geliştirdiği bu direncinde DNA giraz ve topoizomeraz IV'de meydana gelen mutasyonlardan kaynaklandığı rapor edilmiştir. (Gibello ve ark., 2004; Izumi ve ark., 2007; Miranda ve ark., 2013; Shah ve ark., 2014).



*F. psychrophilum* izolatlarında kinolon direncinin genetik olarak tespit edilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada; *gyrA* bölgesindeki 82. amino asit olan treoninin değişime uğrayarak arjinine dönüştüğü bildirilmiştir. Aynı çalışmada, fenotipik olarak dirençli olduğu belirlenen izolatların tümünde, kromozomal mutasyona bağlı olarak genetik direnç geliştiği tespit edilmiştir (Shah ve ark., 2012b).

Shah ve ark., (2012b)'nin bildirdiği gibi çalışmamızda da *gyrB* ve *parC* bölgelerinde amino asit değişimine yol açmayan sessiz mutasyonlar tespit edilmiş ve aktarılabılır plazmid aracılı kinolon (*qnr*) direnç genlerini taşıyan herhangi bir izolat tespit edilememiştir.

*ParC* ve *parE* bölgelerindeki mutasyonların sıklıkla *gyrA* bölgesinde meydana gelen mutasyonları ile birlikte şekillendiği, *parC* veya *parD* biriminde meydana gelen bir mutasyonun tek başına bakterinin kinolon duyarlılığını değiştirmediği bildirilmiştir (Cengiz, 2010). Çalışmamızda fenotipik olarak kinolanlara duyarlılığı azalmış (N-WT) olarak belirlenen 4 izolatın *gyrA* ve *parE* bölgesinde mutasyon şekillendiği belirlenmiştir. Hooper, 1999; *gyrA* ile birlikte *parC* veya *parE* birimlerinde görülen mutasyonların yüksek etkili direnç oluşturduğunu bildirmiştir (Hooper, 1999). Bu durumda ülkemizde FP-108, FP, 116, FP-123, FP-335 izolatlarının yüksek etkili kinolon direnci geliştirmiş olduğu söylenebilir.

Bu çalışmada *F. psychrophilum* izolatlarının oksitetrasiklin eşik değeri, Ngo ve ark., (2017)'nin yaptığı çalışmada olduğu gibi 0,25 mg/l belirlenmiştir. CLSI (2018), Smith ve ark., (2016) ve Van Vliet ve ark. (2017)'nin yaptıkları çalışmalarda ise oksitetrasiklin eşik değeri 0,125 mg/l olarak rapor edilmiştir. Ngo ve ark., (2017); oksitetrasikline karşı antimikrobiyal duyarlılıkları azalan izolatların (N-WT) oranını %58; Smith ve ark., (2014); %36(N-WT); Van Vliet ve ark. (2017)' ise %24(N-WT) olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise N-WT oranı %72 olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda, *F. psychrophilum* enfeksiyonlarının tedavisinde Avrupa, Amerika'da olduğu gibi ülkemizde de ruhsatlı olan oksitetrasiklinin antimikrobiyal duyarlılığın azaldığı söylenebilir.

*Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae* gibi birçok akuatik bakteri türünde tetrasiklin direnç genlerinin varlığı rapor edilmiştir (Akinbowale ve ark., Barton, 2007). Su ve sediment örneklerinden izole edilen *Flavobacterium* spp. türlerinde antimikrobiyal dirence yönelik yapılan az sayıdaki araştırmada ise; *tetA*, *tetB*, *tetC*,

*tetE*, *tetM*, *tetH* ve *tetL* genlerinin varlığı rapor edilmiştir (Akinbowale ve ark., 2007; Dolejska ve ark., 2009; Miranda ve ark., 2003). Çalışmamızda oksitetrasikline karşı antimikrobiyal duyarlılığı azalan türlerde dahi tetrasiklin direnç genleri tespit edilememiştir. Bu durum fenotipik olarak tespit edilen antimikrobiyal direncin her zaman genotipe yansımayaabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada *F. psychrophilum* izolatlarının eritromisin eşik değerinin 8 mg/l olarak tespit edilmesi; CLSI, Van Vliet ve ark. (2017) ve Ngo ve ark., (2017)'nin çalışmalarında elde edilen eritromisinin eşik değerlerine ilişkin sonuçları desteklemektedir. Ngo ve ark., (2017) ve Van Vliet ve ark. (2017)'nin yaptıkları çalışmalarda tüm izolatların eritromisine duyarlı tipte (WT) olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda ise eritromisine duyarlılığı azalmış tipte (N-WT) izolat oranının %20 olduğu belirlenmiştir. Bu durum; balıklarda kullanım için Avrupa, Amerika ve Türkiye'de ruhsatlı olmayan ve genellikle Gram pozitif patojenlerin tedavisinde kullanılan eritromisinin etiket dışı olarak ülkemizde yoğun bir şekilde kullanılması ile ilişkilendirilebilir.

Bu çalışmada *F. psychrophilum* izolatlarının amoksisilin eşik değeri 0,064 mg/l olarak belirlenmiştir. Ngo ve ark., (2017)'nin 133 izolatla yaptıkları çalışmada izolatlarının yaklaşık %70'inin MİK değerin minimum konsantrasyonun altında çıkmasından dolayı eşik değer saptanamamıştır. Çalışmamızda kullanılan tüm izolatların amoksisiline duyarlı tipte (WT) olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada *F. psychrophilum* izolatlarının sulfamethoksazol + trimetoprim eşik değeri 16/304 mg/l olarak kaydedilmiştir. Smith ve ark., (2016) 'nin yaptığı çalışmada 1/19 mg/l, Van Vliet ve ark. (2017) 'nin yaptığı çalışmada 0,5/9,5, Ngo ve ark., (2017) 'nin yaptığı çalışmada ise 8/152 mg/l olarak bildirilmiştir. CLSI'nın revize standartlarında da belirtildiği gibi laboratuvarlar arasında *F. psychrophilum* izolatlarının Sulfamethoksazol + trimetoprim için belirlenen MİK değerlerinin çok değişken olması ve standart hatalarının fazla olması nedeniyle eşik değerlerde farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu durum standardize edilmemiş eşik değerlerle kesin bir sonuca varılamayacağını göstermektedir. Minogue ve ark., (2012) *A. salmonicida* ve *E. tarda* ile yaptıkları çalışmalarda sulfamethoksazol/trimetoprim duyarlılığındaki yüksek varyasyonların, aktarılabilir nitelikteki sul (sul1, sul2 ve sul3) direnç genlerinin varlığından kaynaklanabileceğini bildirmiştir (Minogue ve ark., 2012).

Wang ve ark., (2014) akuatik çevrede yaygın olarak bulunan *Flavobacterium* spp.'de *sul* (*sul1*, *sul2* ve *sul3*) genlerini tespit ettiğini bildirmiştir. Bu çalışmada ise daha önce *F. psychrophilum* izolatlarıyla ilgili bildirim yapılmamış olan *sul2* geni; FP 82, FP 90, FP 100, FP 116, FP 120, FP 123 nolu izolatlarda tespit edilmiştir.

### ***Flavobacterium* spp.**

*Flavobacterium* türlerinin neden olduğu hastalık salgınları ve bunlarla mücadeleyi amaçlayan çalışmaların büyük çoğunluğu *Flavobacterium psychrophilum*, *F. columnare* ve *F. branchiophilum*'ı konu almıştır. Son yıllarda birçok yeni *Flavobacterium* türünün de sistemik olarak enfekte veya klinik belirti gösteren balıklardan izole edildiği bildirilmiştir (Loch ve Faisal, 2015). Bu yeni *Flavobacterium* türlerinin ekolojisi, epidemiyolojisi ve patogenezi hakkında bilgilerin sınırlı olduğu görülmüştür (Austin ve Austin, 2016; Loch ve Faisal, 2017).

Son yıllarda tespit edilen *Flavobacterium* türlerinin hastalığın asıl etkeni olup olmadığına ilişkin fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılmış olan sınırlı sayıdaki çalışmada *F. johnsoniae* ve *F. spartansii*'nin Koch postulatlarını sağladığını bildirilirken diğer *Flavobacterium* türlerinin sağlayıp sağlamadığına yönelik bir bilgiye rastlanılamamıştır (Loch, ve Faisal, 2014; Soltani ve ark.,1994).

Gökkuşluğu alabalığı, kahverengi alabalık ve koho salmon üzerine yapılan çalışmalarda *Flavobacterium* spp.'nin solungaç, bağırsak, dölleniş/gözlenmiş yumurtaların doğal mikrobiyotasında bulunduğu bildirilmiştir (Lowrey ve ark., 2015; Romero ve Navarrete, 2006; Wilkins ve ark., 2015; Wong ve ark., 2013).

Bu kapsamda yapılmış en kapsamlı çalışma Michigan State Üniversitesi'nde bulunan araştırmacı Thomas Loch tarafından yapılmıştır. Loch ve ark., (2013), 2003-2010 yılları arasında Michigan'da (ABD) bulunan tatlı su kaynaklarında yaşayan sağlıklı veya hastalık semptomu gösteren doğal ve kültür balıklarında yaptıkları saha taramasında 21 farklı balık türünden toplam 211 *Flavobacterium* spp. izole etmiştir. Söz konusu izolatları 16S rRNA bölgesi kullanılarak %96,5-100 oranında tanımlanmış ve 21 farklı *Flavobacterium* türü rapor etmiştir. Çalışmamızda ise 2013-2017 yılları ülkemizin 6 farklı bölgesinden gerek hastalık semptomu gösteren gerekse sağlıklı görülen ve yetiştiriciliği yapılan 5 farklı salmonid türünden toplam 109

*Flavobacterium* spp. izole edilmiştir. 16S rRNA bölgesi kullanılarak yapılan dizi analizinde 109 *Flavobacterium* spp. izolattından 27 farklı *Flavobacterium* türü identifiye edilmiştir. Loch ve ark., (2013) araştırma sonuçlarına benzer olarak çalışmamızda da *F. aquidurensis*, *F. frigidimaris*, *F. glacei*, *F. hercynium*, *F. hibernum*, *F. hydatis*, *F. oncorhynchi*, *F. pectinovorum*, *F. psychrophilum*, *F. reichenbachii* *F. succinicans* ve *F. tiangeerense* türleri izole edilmiştir.

- *F. branchiarum* ilk olarak Zamora ve ark. tarafından 2013 yılında gökkuşağı alabalıklarının solungaç ve karaciğerlerinden izole edilmiştir. Bu çalışmada *F. psychrophilum*'dan sonra en fazla izole edilen tür olan *F. branchiarum*; su sıcaklığının 8-12°C arasında olduğu dönemlerde gökkuşağı alabalığı frylarının (0,2-3g) böbreklerinden izole edilmiştir. Gözlerde uni-bilateral egzoftalmus, renkte hiperpigmentasyon gibi genel semptomlar gösteren balıklarda ciddi ölümlerin olmadığı belirlenmiştir. RFLP ile yapılan genotiplendirme çalışmasında *F. branchiarum* izolatların homojen bir yapıda olduğu saptanmıştır.
- İlk olarak Çin'de Xin ve ark., Uygur Özerk bölgesindeki (2009) buzullardan izole edilen *F. tiangeerense*, daha sonra Loch ve ark., (2013) tarafından hastalık semptomu göstermeyen gökkuşağı alabalığı (200-250 g), kahverengi alabalık fingerlinglerinin solungaçlarından ve anaç boydaki koho salmonların böbreklerinden izole edilmiştir. Çalışmamızda ise etken farklı su sıcaklıklarında (10-18°C) gökkuşağı alabalıklarının (0,3-200g) böbrek ve karaciğerlerinden izole edilmiştir. Balıklarda renkte hiperpigmentasyon, iştahsızlık gibi genel semptomların yanı sıra deride ülseratif lezyonlar görülmüştür. Çalışmamızda, dokuz *F. tiangeerense* izolatının 3 farklı genotipe ayrıldığı belirlenmiştir. Amerika'da yapılan bir çalışmada ise üç *F. tiangeerense* izolatının 2 ayrı genotipte yer aldığı rapor edilmiştir (Loch ve ark., 2013).
- *F. collinsii* ilk olarak Zamora ve ark. tarafından 2013 yılında gökkuşağı alabalıklarının karaciğerlerinden izole edilmiştir. Çalışmamızda izolatlar su sıcaklığının 10-12°C olduğu dönemde herhangi bir klinik bulgu göstermeyen gökkuşağı alabalığı (yumurta ve 0,2-130g) ve Anadolu alabalığından (keseli

frylardan) izole edilmiştir. Çalışmamızda RFLP analizlerinde F-353 nolu Anadolu alabalığı izolatu ile F-75, F-336, F-348, F-355, F-361 nolu gökkuşığı alabalığı izolatlarının balık orijini bakımından ayrımının yapılabildiği görülmüştür.

- *F. succinicans* ilk olarak Anderson ve Ordal (1961) tarafından chinook salmon fingerlinglerinin (*Oncorhynchus tshawytscha*) kaudal yüzgeçlerindeki erozyonlardan izole edilmiştir. Daha sonra Loch (2012) tarafından Michigan'daki tatlı su kaynaklarında bulunan balıklar üzerinde yapılan rutin sağlık taramasında klinik bulgu ve mortalite göstermeyen, kaynak alabalığı, gökkuşığı alabalığı, kahverengi alabalık ve beyaz göl balığından (*Coregonus clupeaformis*) etken izole edilmiştir. Çalışmamızda ise *F. succinicans* 12-15°C su sıcaklığında yaşayan ve herhangi bir klinik bulgu göstermeyen gökkuşığı alabalıklarından (0,2-3000g) izole edilmiştir. Çalışmamızda, altı *F. succinicans* izolatının 2 farklı genotipe ayrıldığı görülmüşken Loch ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada 16 *F. tiangeerense* izolatının 4 genotipe ayrıldığını bildirmiştir.
- İlk olarak Christensen, (1977) tarafından İngiltere'nin güneybatısında topraktan izole edilen *F. pectinovorum*, daha sonra Loch ve ark., (2013) tarafından gökkuşığı alabalığı fingerlingleri ve koho salmonlardan görülen salgınlardan izole edilmiştir. Araştırmacılar solungaçlarda ve karaciğerde solgunluk, yüzgeç diplerinde erezyon ve dalakta büyüme gibi klinik bulgular rapor etmiştir. Çalışmamızda ise etken 10-12°C su sıcaklığında yaşayan gökkuşığı alabalığı (1g) ve Anadolu alabalığının (4000 g) böbrek ve karaciğerlerinden izole edilmiştir. Klinik bulgu olarak ise sadece yüzgeç diplerinde erezyon görülmüştür. Çalışmamızda, dört *F. pectinovorum* izolatının 2 ayrı genotipde yer aldığı saptanmasına karşılık, Loch ve ark., (2013) 28 izolat ile yaptığı filogenetik analizde izolatların 3 farklı genotipe ayrıldığını bildirmiştir.
- *F. tructae* ve *F. piscis* ilk olarak İspanya'da gökkuşığı alabalıklarında septisemi ile seyreden bir salgından solungaç, karaciğer ve böbrekten izole edilmiştir (Zamora ve ark., 2014). Çalışmamızda ise *F. tructae* ve *F. piscis* su sıcaklığının 10-15°C olduğu dönemde görülmüştür. *F. tructae* 0,3-100 g

gökkuşığı alabalıklarından, *F. piscis* ise gökkuşığı alabalığı (0,2-1 g) ve karadeniz alabalığından (0,2 g) izole edilmiştir. Solungaçlarda hafif şişlik ve anemi, iştahsızlık, karaciğerde anemi, dalakta büyüme gibi semptomların görülmesi Zamora'nın belirttiği septisemi bulguları ile benzerlik göstermiştir. Çalışmamızda, *F. tructae* izolatlarının homojen bir yapıda olduğu görülürken, *F. piscis* izolatlarının heterojen bir yapıda (2 genotip) olduğu görülmüştür.

- *F. branchiicola* ilk olarak Zamora ve ark. tarafından 2013 yılında gökkuşığı alabalıklarının karaciğerinden izole edilmiştir. Çalışmamızda izolatlar genellikle su sıcaklığının 10-15°C olduğu dönemde gökkuşığı alabalığından (0,2-10 g) izole edilmiştir. Gözlerde hafif uni-bilateral egzoftalmus, solungaçlarda şişlik ve anemi gibi semptomlar gösteren balıklarda ciddi ölümlerin olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda, *F. branchiicola* izolatlarının heterojen bir yapıda (2 genotip) olduğu görülmüştür.
- *F. hercynium* ilk olarak Almanya'nın kuzeyinde bulunan dere suyundan izole edilmiştir. (Cousin ve ark., 2007). Amerika'da yapılan başka bir çalışmada ise yüzgeçlerde aşınma ve nekroz, asites, unilateral egzoftalmus, karaciğerde solgunluk, dalakta büyüme ve enteritis belirtileri gösteren kaynak alabalığı, gökkuşığı alabalığı ve kahverengi alabalık frylarından izole edilmiştir (Loch ve ark., 2013). Çalışmamızda ise etken su sıcaklığının 10-15 ° olduğu dönemlerde Anadolu alabalığı (4000 g) ve gökkuşığı alabalıklarından (20-35 g) izole edilmiştir. Yüzgeç diplerinde kanama, asites ve enteritis gibi semptomların görülmesi Loch ve ark., (2013)'nin belirttiği klinik bulguları ile benzerlik göstermiştir. Çalışmamızda, üç *F. hercynium* izolatının 2 farklı genotipte yer aldığı belirlenmiştir. Loch ve ark., (2013); 33 izolat ile yaptığı filogenetik analizde ise *F. hercynium* izolatlarının 5 farklı genotipe ayrıldığını bildirmiştir.
- *F. oncorhynchi* ilk olarak İspanya'da juvenil gökkuşığı alabalıklarında soğuk su hastalığı benzeri semptomlar gösteren bir salgından, dalak, karaciğer ve böbrekten izole edilmiştir (Zamora ve ark., 2012). Amerika'da yapılan başka bir çalışmada ise unilateral egzoftalmus, karaciğer ve böbrekte solgunluk, dalakta büyüme ve solungaçlarda epiteliyel hiperplazi belirtileri gösteren kaynak alabalığı, gökkuşığı alabalığı ve kahverengi alabalık fingerlinglerinden

izole edilmiştir (Loch ve ark., 2013). Çalışmamızda ise etken su sıcaklığının 10-13°C olduğu dönemde gökkuşağı alabalıklarından (0,2 g) izole edilmiştir. Solungaçlarda anemi ve dalakta büyüme gibi semptomların görülmesi Loch ve ark., (2013)'nın belirttiği klinik bulguları ile benzerlik göstermiştir. Çalışmamızda, üç *F. oncorhynchi* izolatında aynı genotipte olduğu tespit edilmişken Loch ve ark., 2013'de yaptıkları çalışmada 20 *F. oncorhynchi* izolatının 2 farklı genotipte yer aldığını bildirmiştir.

- *F. spartansi* ilk olarak Amerika'da; egzoftalmus, dermiste multifokal kanama, dalakta büyüme, hemorajik enterit ve karaciğerde solgunluk semptomları gösteren anaç ve fingerling boydaki chinook salmonların dalak, karaciğer ve solungaçlarından izole edilmiştir (Loch ve Faisal, 2014) Çalışmamızda ise etken su sıcaklığının 13°C olduğu dönemde gökkuşağı alabalıklarından (0,5-200 g) izole edilmiştir. Solungaç ve karaciğerde solgunluk, dalakta büyüme gibi semptomların görülmesi Loch ve ark., (2013)'nın belirttiği klinik bulguları ile benzerlik göstermiştir. Çalışmamızda, üç *F. oncorhynchi* izolatının 2 farklı genotipte olduğu görülmüştür (Loch ve ark., 2013).
- *F. frigidarium* ilk olarak Antartika'da Adelaide adasının çevresinde bulunan deniz sedimentinden izole edilmiştir. (Humphry ve ark., 2001). Daha sonra Tazmanya'da amoebik solungaç hastalığı bulunan Atlantik salmon (*Salmo salar*) balıklarının solungaçlarından izole etmiştir (Bowman ve Nowak, 2004). Patojenitesine ilişkin herhangi bir bilgi verilmemiştir. Çalışmamızda ise söz konusu etkenin 15°C su sıcaklığında ve herhangi bir klinik bulgu göstermeyen gökkuşağı alabalıklarından (1 g) izole edilmiştir. Çalışmamızda, iki *F. frigidarium* izolatının aynı genotipde olduğu görülmüştür.
- *F. hibernum* ilk olarak kutuplarda bulunan Crooked gölünden izole edilmiştir (McCammon ve ark., 1998). Daha sonra Loch (2013) tarafından Michigan'daki tatlı su kaynaklarında bulunan balıklar üzerinde yapılan rutin sağlık taramasında klinik bulgu ve mortalite göstermeyen iskorpit balığından (*Cottus bairdii*) etken izole edilmiştir. Çalışmamızda ise etken 13-15°C su sıcaklığında yaşayan ve herhangi bir klinik bulgu göstermeyen Anadolu alabalığı (0,2 g) ve gökkuşağı alabalıklarından (3 g) izole edilmiştir.

Çalışmamız, Loch ve ark., (2013)'nın yaptığı çalışmaya benzer olarak iki *F. hibernum* izolatında aynı genotipe olduğu görülmüştür.

- *F. reichenbachii* ilk olarak kuzey Almanya'da dere suyundan izole edilmiştir. (Ali ve ark., 2009). Daha sonra Loch (2013) tarafından Michigan'daki tatlı su kaynaklarında bulunan balıklar üzerinde yapılan rutin sağlık taramasında klinik bulgu ve mortalite göstermeyen kaynak alabalığı ve kahverengi alabalığının böbrek ve solungaçlarından izole edilmiştir. Çalışmamızda ise etken 10°C su sıcaklığında yaşayan ve herhangi bir klinik bulgu göstermeyen Anadolu alabalığı (0,1 g) ve gökkuşacağı alabalıklarından (gözlenmiş yumurta) izole edilmiştir. Çalışmamızda, iki *F. reichenbachii* izolatında aynı genotipe yer aldığı saptanmasına karşılık, Loch ve ark., (2013) 3 izolat ile yaptığı filogenetik analizde izolatların 2 farklı genotipe ayrıldığını bildirmiştir.
- *F. aquidurensis* ilk olarak Almanya'nın kuzeyinde bulunan dere suyundan izole edilmiştir. (Cousin ve ark., 2007). Amerika'da yapılan başka bir çalışmada ise spiral tarzda yüzme, unilateral egzoftalmus, yüzgeç tabanlarında kanama, solungaçlarda solgunluk ve nekroz, dalakta büyüme ve karaciğerde solgunluk belirtileri gösteren koho salmon frylarından *F. aquidurensis* izole edilmiştir (Loch ve ark., 2013). Çalışmamızda ise, su sıcaklığının 9°C olduğu dönemde Karadeniz bölgesindeki bir kaynak alabalığı anacından *F. aquidurensis* izole edilmiştir. Solungaçlarda solgunluk gibi semptomların görülmesi Loch ve ark., 2013'ün belirttiği klinik bulguları ile benzerlik göstermiştir.
- *F. frigidimaris* ilk olarak Güney kutbunda deniz suyundan izole edilmiştir. (Nogi ve ark., 2005). Amerika'da yapılan başka bir çalışmada ise spiral tarzda yüzme, karaciğerde beneklenme, solungaçlarda solgunluk ve yüzgeç tabanlarında erezyon belirtileri gösteren koho salmon ve kahverengi alabalıklardan (fry ve fingerling) izole edilmiştir (Loch ve ark., 2013). Çalışmamızda ise etken su sıcaklığının 10-13°C olduğu dönemde gökkuşacağı alabalıklardan (0,2 g) izole edilmiştir. Solungaçlarda solgunluk ve dalakta büyüme gibi semptomların görülmesi Loch'un belirttiği klinik bulguları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda, iki *F. frigidimaris* izolatında aynı genotipe olduğu belirlenmiştir. Loch ve ark., (2013) ise 12 *F. frigidimaris* izolatı ile yaptığı filogenetik analizde 3 genotipe görüldüğünü bildirmiştir.



- *F. glaciei* ilk olarak Çin'in 1 nolu buzullarından izole edilmiştir (Zhang ve ark., 2006). Daha sonra Loch (2013) tarafından Michigan'daki tatlı su kaynaklarında bulunan balıklar üzerinde yapılan rutin sağlık taramasında klinik bulgu ve mortalite göstermeyen koho salmon frylarının beyninden izole edilmiştir. Çalışmamızda ise etken 10°C su sıcaklığında yaşayan gökkuşağı alabalıklarından (gözlenmiş yumurta) izole edilmiştir.
- *F. hydati*s ilk olarak Amerika'da bakteriyel solungaç hastalığı semptomları gösteren chinook salmonlardan izole edilmiştir (Strohl ve Tait, 1978). Daha sonra Loch (2013) tarafından Michigan'daki tatlı su kaynaklarında bulunan balıklar üzerinde yapılan rutin sağlık taramasında klinik bulgu ve mortalite göstermeyen kaynak alabalığı (200-250g) ve kahverengi alabalıklarının (200-250g) solungaçlarından izole edilmiştir (Loch ve ark., 2013). Çalışmamızda ise etken 10°C su sıcaklığında bulunan gözlenmiş gökkuşağı alabalığı yumurtasından izole edilmiştir.
- *F. plurextorum* ilk olarak İspanya'da gökkuşağı alabalıklarında septisemi ile seyreden bir salgından solungaç, karaciğer ve yumurtadan izole edilmiştir (Zamora ve ark., 2013b). Amerika'da yapılan başka bir çalışmada ise yine septisemi belirtileri gösteren gökkuşağı alabalığı ve kahverengi alabalık frylarından izole edilmiştir (Loch ve Faisal, 2014a). Çalışmamızda ise etken su sıcaklığının 15°C olduğu dönemde gökkuşağı alabalığından (7-8 g) izole edilmiştir. Solungaçlarda şişlik ve anemi, iştahsızlık, renkte hiperpigmentasyon, karaciğer solgunluk, dalak büyüme ve perikarditis gibi semptomların görülmesi Zamora ve Loch'un belirttiği septisemi bulguları ile benzerlik göstermektedir.
- Ayrıca bu çalışmada daha önce balıklarda hastalık yaptığı rapor edilmeyen *F. antarticum*, *F. terrigena*, *F. granuli*, *F. frigoris*, *F. saccharophilum*, *F. xueshanense* ve *F. cutihrudinis* türleri balıklardan ilk defa izole edilmiştir. Bu türler proje çalışmaları kapsamında 2013-2017 yılları arasında yapılan saha örneklemelerinde herhangi bir klinik bulgu göstermeyen gökkuşağı alabalıklarının iç organlardan izole edilmiştir.

*Flavobacterium* spp. türlerinin antimikrobiyal duyarlılığı ve direnç genlerinin belirlenmesi konusunda pek fazla araştırma yapılmamıştır. Yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda *Flavobacteriaceae* familyasında yer alan türlerin, antimikrobiallerin yüksek konsantrasyonlarını bile tolere edebildiği ve birçok antimikrobialye karşı duyarlılıklarının azaldığı bildirilmiştir (Aber ve ark., 1978; Chang ve ark., 1997; Clark, ve ark., 2009.; Fraser ve Jorgensen, 1997; Loch ve ark.,2013; Verner-Jeffreys ve ark., 2017). Çalışmamızda incelenen *Flavobacterium* spp. izolatlarının %54'ünün sulfamethoksazol + trimetoprim (19:1), %70'inin eritromisin, %72'sinin oksalinik asit, %77'sinin enrofloksasin, %83'ünün florfenikol, %87'sinin oksitetrasiklin için duyarlılığı azalan tipte (N-WT) olduğunun belirlenmesi daha önce bu konuda yapılan araştırma sonuçlarını desteklemiştir.

Verner-Jeffreys ve ark., (2017); *Flavobacterium* spp. izolatlarının (86 izolat) büyük bir kısmının 16mg/l gibi yüksek konsantrasyonda bile amoksisiline tolerans gösterdiğini bildirmiştir. Çalışmamızda ise izolatların sadece %76'sının amoksisilin için eşik değer olan 0,25mg/l'den daha düşük konsantrasyonda (WT) MİK değerlerine sahip olması Verner-Jeffreys ve ark., 2017'nin bildirdiği sonuçlardan farklılık göstermiştir. Bu farklılığın amoksisilinin ülkemizde ruhsatlandırılmış olmasına rağmen alabalık yetiştiriciliğinde yaygın kullanılmamasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür.

Gram-negatif bakteriler arasında doğal direncin yanı sıra transpozonlar ve plazmidlerin neden olduğu aktarılabılır nitelikteki direnç yaygın olarak görülmektedir. *Flavobacteriaceae* ailesindeki türlerde görülen direncin, aktarılabılır ve/veya kromozomal dirençten ziyade doğal direnç mekanizmalarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Verner- Jeffreys ve ark., 2017). Çalışmamızda da *Flavobacterium* spp. izolatlarında yüksek oranda antimikrobiyal direnç tespit edilmesi *Flavobacterium* türlerinin bazı antimikrobiallere doğal olarak dirençli olabileceğini düşündürmüştür.

Akuakültürden izole edilen *Flavobacterium* spp. türleri üzerinde, sınırlıda olsa, antimikrobiyal dirence yönelik yapılan araştırmalarda *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE*, *tetM*, *tetH* ve *tetL* ve *sul* (*sul1*, *sul2* ve *sul3*) genlerinin varlığı rapor edilmiştir (Akinbowale ve ark., 2007; Stine ve ark., 2007, Miranda ve ark., 2003). Çalışmamızda ise 84 *Flavobacterium* spp. izolatından 11'inin *floR*, 23'ünün *sul2* direnç geni taşıdığı

belirlenmiştir. Ayrıca fenotipik olarak oksitetrasikline duyarlılığı azalan tipte (N-WT) olan *Flavobacterium* türlerinde tetrasiklin direnç genleri tespit edilememiştir

Bu çalışmada;

- 16S rRNA bölgesi kullanılarak yapılan dizi analizi sonucunda 27 farklı *Flavobacterium* türü identifiye edildiği,
- *F. psychrophilum* (%23), *F. branchiarum* (%15,5) ve *F. tiangeerense* (%8)'nin en yaygın türler olduğu,
- Ülkemizde salmonid balıklarından *F. branchiarum*, *F. tiangeerense*, *F. collinsii*, *F. succinicans*, *F. pectinovorum*, *F. tructae*, *F. piscis*, *F. branchiicola*, *F. hercynium*, *F. oncorhynchi*, *F. spartansi*, *F. frigidarium*, *F. hibernum*, *F. reichenbachii*, *F. aquidureense*, *F. frigidimaris*, *F. glaciei*, *F. hydatis*, *F. plurextorum*, *F. antarcticum*, *F. terrigena*, *F. granuli*, *F. frigoris*, *F. saccharophilum*, *F. xueshanense* ve *F. cutihirudinis* türlerinin ilk defa tespit edildiği,
- Balıklarda bugüne kadar rapor edilmemiş olan *F. antarcticum*, *F. terrigena*, *F. granuli*, *F. frigoris*, *F. saccharophilum*, *F. xueshanense* ve *F. cutihirudinis* türlerinin tespit edildiği,
- Flavobakteriyozisin özellikle 0,1-2 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalığı yavrularında önemli bir sorun olduğu,
- Ülkemizde *F. psychrophilum* izolatlarının genotipik olarak homojen bir yapı gösterdiği,
- *F. psychrophilum* izolatlarının amoksisilin ve florfenikole duyarlı, enrofloksasin ve oksalinik asite ise duyarlılığının azaldığı,
- *F. branchiarum*, *F. branchiicola*, *F. collinsii*, *F. frigoris* ve *F. psychrophilum* türlerinde **floR** ve *F. branchiarum*, *F. branchiicola*, *F. collinsii*, *F. oncorhynchi*, *F. plurextorum*, *F. psychrophilum*, *F. spartansii*, *F. terrigena* ve *F. tiangeerense* türlerinde ise **sul2** direnç geninin ilk defa tespit edildiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma sonuçlarına göre sürdürülebilir gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliğinin yapılabilmesi için;

1. *Flavobacterium* spp. türlerinin epidemiyolojik özellikleri ve patojenitelerinin belirlenmesi,
2. Hastalık salgınlarında mutlaka identifikasyon yapılması ve MİK sonuçları göz önünde bulundurularak tedavi protokollerinin hazırlanması,
3. Tüm genom ve biyoenformatik analizleri ile *Flavobacterium* türlerinde görülen doğal direnç mekanizmalarının belirlenmesi,
4. Gökkuşığı alabalığı işletmelerinde bakteriyel etkenlerin ve antimikrobiyal direnç genlerinin karasal ekosisteme ve insanlara yayılmasının önlenmesi için işletmelerde biyogüvenlik sistemlerinin kurulması ve belirli aralıklarda kontrol edilmesi önerilmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Aber RC, Wennersten C, Moellering RC (1978) Antimicrobial susceptibility of flavobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 14: 483–487.
- Akinbowale OL, Peng H, Barton MD (2007) Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology* 103: 2016–2025.
- Akova SB (2015) Aquaculture and its distribution in Turkey. *Population (billions)* 6: 1–7.
- Alcaide E, Blasco M-D, Esteve C (2005) Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3348–3350.
- Alderman DJ, Hastings TS (1998) Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance–potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science & Technology* 33: 139–155.
- Ali Z, Cousin S, Frühling A et al (2009) *Flavobacterium rivuli* sp. nov., *Flavobacterium subsaxonicum* sp. nov., *Flavobacterium swingsii* sp. nov. and *Flavobacterium reichenbachii* sp. nov. isolated from a hard water rivulet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(10): 2610–2617.
- Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI (2001) Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 22–32.
- Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N et al (2002) Development, Validation, and Application of PCR Primers for Detection of Tetracycline Efflux Genes of Gram-Negative Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1786–1793.
- Anderson RL, Ordal EJ (1961) *Cytophaga succinicans* sp. nov., a facultatively anaerobic, aquatic myxobacterium. *Journal of Bacteriology* 81(1): 130–138.
- Anonim (2018) *Flavobacterium* spp. güncel taksonomisi, <http://www.bacterio.net/flavobacterium.html>, (02.05.2018)
- Arias CR, Olivares-Fuster O, Hayden K et al (2007) First Report of *Yersinia ruckeri* Biotype 2 in the USA. *Journal of Aquatic Animal Health* 19: 35–40.
- Austin B, Austin DA (2016) Bacterial fish pathogens Disease of Farmed and Wild Fish. 6. Baskı, Springer International Publishing, Switzerland, pp: 397–465.
- Avendaño-Herrera R, Houel A, Irgang R et al (2014) Introduction, expansion and coexistence of epidemic *Flavobacterium psychrophilum* lineages in Chilean fish farms. *Veterinary Microbiology* 170: 298–306.
- Balta F (1997) Kültürü yapılan alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) görülen *Flexibacter psychrophila* enfeksiyonu. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu 19: 621–648.
- Balta F, Cagırgan H (1998) Kültürü Yapılan Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) Görülen *Flexibacter columnaris* enfeksiyonu. Doğu Anadolu Bölgesi III. Su Ürünleri Sempozyumu. pp: 163–169.
- Barton MD (2000) Antibiotic use in animal feed and its impact on human health.

- Nutrition Research Reviews 13: 279–299.
- Benedetti P, Rasso M, Pavan G et al (2011) Septic shock, pneumonia, and soft tissue infection due to *Myroides odoratimimus*: report of a case and review of Myroides infections. *Infection* 39: 161–165.
- Bernardet JF, Segers P, Vanca EYT et al (1996) Cutting a Gordian Knot: Emended Classification and Description of the Genus *Flavobacterium*, Emended Description of the Family *Flavobacteriaceae*, and Proposal of *Flavobacterium hydatis* norn. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 128–148.
- Bernardet JF, Nakagawa Y, Holmes B et al (2002) Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(3): 1049–1070.
- Bernardet JF, Bowman JP (2006) The Genus *Flavobacterium*. Editör: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W & Schleifer KH, *The Prokaryotes*. 2. Baskı, Springer-Verlag, New York, NY, pp: 481–531.
- Bernardet J and Bowman JP (2015). *Flavobacterium*. Editör: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, Hedlund B and Dedysch S, *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, New York: 2015, pp: 1–75.
- Bernardet JF, Grimont PAD (1989) Deoxyribonucleic Acid Relatedness and Phenotypic Characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 346–354.
- Bernardet JF, Kerouault B (1989) Phenotypic and genomic studies of *Cytophaga psychrophila* isolated from diseases rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1796–1800.
- Bernardet JF, Nakagawa Y (2006) An Introduction to the Family *Flavobacteriaceae*. *The Prokaryotes*. Springer New York, pp: 455–480.
- Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C., ve Derôme, N. (2012). Antagonistic effect of indigenous skin bacteria of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) against *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum*. *Veterinary Microbiology* 155(2-4): 355–361.
- Boutin S, Audet C, Derome N (2013) Probiotic treatment by indigenous bacteria decreases mortality without disturbing the natural microbiota of *Salvelinus fontinalis*. *Canadian Journal of Microbiology* 59: 662–670.
- Bowman JP, Nowak B (2004) Salmonid gill bacteria and their relationship to amoebic gill disease. *Journal of Fish Diseases* 27: 483–492.
- Bowser PR (1973) Seasonal Prevalence Of *Chondrococcus columnaris* Infection in Black Bullheads From Clear Lake, Iowa. *Journal of Wildlife Diseases* 9: 115–118.
- Boyacıoğlu M, Kum C, Kırkan Ş et al (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: 314–321.
- Boyacıoğlu M, Akar F (2012) Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* Causing

- Rainbow Trout Fry Syndrome and Determination of an Effective Antibacterial Treatment in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 18: 197–203.
- Bravo S, Midtlyng PJ (2007) The use of fish vaccines in the Chilean salmon industry 1999-2003. *Aquaculture* 270: 36–42.
- Brown LL, Cox WT, Levine RP (1997) Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 213–218.
- Bruun MS, 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.
- Bullock GL, Herman RL, Waggy C (1991) Hatchery efficacy trials with chloramine-T for control of bacterial gill disease. *Journal of Aquatic Animal Health* 3: 48–50.
- Bullock G, Herman R, Heinen J et al (1994) Observations on the occurrence of bacterial gill disease and amoeba gill infestation in rainbow trout cultured in a water recirculation system. *Journal of Aquatic Animal Health* 6: 310–317.
- Burridge L, Weis JS, Cabello F et al (2010) Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306: 7–23.
- Buschmann AH, Tomova A, López A et al (2012) Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PloS one* 7(8)-e42724:1-11.
- Çağırğan H, Tanrıkul TT, Balta F (1997) Characteristics of yellow pigmented bacteria isolated from diseased Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Eighth International Conference Diseases of Fish and Shell Fish, pp: 73–81.
- Carson J, Schmidtke LM, Munday BL (1993) *Cytophaga johnsonae*: a putative skin pathogen of juvenile farmed barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases* 16: 209–218.
- Castillo D, Higuera G, Villa M et al (2012) Diversity of *Flavobacterium psychrophilum* and the potential use of its phages for protection against bacterial cold water disease in salmonids. *Journal of Fish Diseases* 35: 193–201.
- Castillo D, Christiansen RH, Espejo R et al (2014) Diversity and geographical distribution of *Flavobacterium psychrophilum* isolates and their phages: patterns of susceptibility to phage infection and phage host range. *Microbial Ecology* 67: 748–757.
- Cattoir V, Nordmann P (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Current Medicinal Chemistry* 16: 1028–1046.
- Cengiz M (2010) Bakterilerde Kinolon Direncinin Genetiği. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 29(1): 55-60.
- Chakroun C, Urdaci MC, Faure D et al (1997) Random Amplified Polymorphic DNA analysis provides rapid differentiation among isolates of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* and among *Flavobacterium* species. *Diseases of Aquatic Organisms* 31: 187–196.
- Chakroun C, Grimont F, Urdaci MC et al (1998) Fingerprinting of *Flavobacterium psychrophilum* isolates by ribotyping and plasmid profiling. *Diseases of Aquatic Organisms* 33: 167–177.

- Chang J-C, Hsueh P-R, Wu J-J et al (1997) Antimicrobial Susceptibility of Flavobacteria as Determined by Agar Dilution and Disk Diffusion Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 1301–1306.
- Chen C-R, Chung Y-Y, Kuo G-H (1982) Studies on the pathogenicity of *Flexibacter columnaris*. Effect of dissolved oxygen and ammonia on the pathogenicity of *Flexibacter columnaris* to eel (*Anguilla japonica*). *CAPD Fisheries Series* 8: 87–61.
- Cipriano RC, Holt RA (2005) *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. *Fish Disease Leaflet*: 44-50.
- Clark SE, Jude BA, Danner GR et al Identification of a multidrug efflux pump in *Flavobacterium johnsoniae*. *Veterinary Research* 40(6): 1-10.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2006) *Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guidelines*. CLSI, Document, VET04-A2, Wayne, Pennsylvania, pp:1-20
- CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (2014a) *Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals: approved guideline*. CLSI, Document VET04-A2, Wayne, Pennsylvania, pp: 1-20.
- CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (2014b) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; second informational supplement*. CLSI document M42/49-S1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, pp: 1-20.
- Collins, V. G. (1970). Recent studies of bacterial pathogens of freshwater fish. *Society for Water Treatment and Examination* 19: 3-31
- Cousin S, Päufer O, Stackebrandt E (2007) *Flavobacterium aquidurensense* sp. nov. and *Flavobacterium hercynium* sp. nov. from a hard-water creek. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(2): 243-249.
- Crump EM, Burian J, Allen PD et al (2005) Identification and expression of a host-recognized antigen, FspA, from *Flavobacterium psychrophilum*. *Microbiology* 151: 3127–3135.
- Dalsgaard I, Madsen L (2000) Bacterial pathogens in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *Journal of Fish Diseases* 23: 199–209.
- Declercq AM, Haesebrouck F, Van den Broeck W et al (2013) Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary Research* 44: 27.
- Decostere A, Haesebrouck F, Devriese LA (1997) Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from diseased fish. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 322–4.
- Decostere A, Haesebrouck F, Turnbull JF et al (1999) Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches. *Journal of Fish Diseases* 22: 1–11.
- Depaola A, Peeler JT, Rodrick GE (1995) Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2335–2340.
- Didinen BI, Diler Ö, Ekiçi S et al (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): 64-70.
- Diler Ö, Altun S, Işıklı BI (2003) Kültürü yapılan gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un fenotipik karakterleri. SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 7: 1-8.
- Dolejska M, Bierošová B, Kohoutova L et al (2009) Antibiotic-resistant Salmonella and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric Black-headed Gulls. Journal of Applied Microbiology 106: 1941-1950.
- Duman M, Altun S, Cengiz M et al (2017a) Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. Diseases of Aquatic Organisms 125(1): 31-44.
- Duman M, Saticioglu IB, Buyukekiz AG et al (2017b) Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of atypical *Citrobacter gillenii* and *Citrobacter* sp. isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Global Antimicrobial Resistance 10: 136-142.
- Dumetz F, Duchaud E, LaPatra SE et al (2006) A protective immune response is generated in rainbow trout by an OmpH-like surface antigen (P18) of *Flavobacterium psychrophilum*. Applied and Environmental Microbiology 72: 4845-4852.
- Durmaz Y, Onuk EE, Çiftci 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.
- Elliott J a, Facklam RR (1996) Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between Antimicrobial Susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a Proposed Method To Discriminate between Them. Journal of Clinical Microbiology 34(5): 1296-1298.
- Evenhuis JP, Leeds TD, Marancik DP et al (2015) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) resistance to columnaris disease is heritable and favorably correlated with bacterial cold water disease resistance. Journal of Animal Science 93: 1546-1554.
- Farkas J (1985) Filamentous *Flavobacterium* sp. isolated from fish with gill diseases in cold water. Aquaculture 44: 1-10.
- Faruk M, Anka I (2017) An overview of diseases in fish hatcheries and nurseries. Fundamental and Applied Agriculture 2: 311.
- FEAP (Federation of European Aquaculture Producers) (2018). European Aquaculture Production Report 2008-2016. <http://www.feap.info/default.asp?SHORTCUT=582> (18.07.2018).
- Ferguson HW, Ostland VE, Byrne P et al (1991) Experimental production of bacterial gill disease in trout by horizontal transmission and by bath challenge. Journal of Aquatic Animal Health 3: 118-123.
- Fernández-Alarcón C, Miranda CD, Singer RS et al (2010) Detection of the *floR* gene in a diversity of florfenicol resistant Gram-negative bacilli from freshwater salmon farms in Chile. Zoonoses and Public Health 57: 181-188.
- Flemming L, Rawlings D, Chenia H (2007) Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. Research in Microbiology 158(1): 18-30.

- Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk JR P (1992) How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42: 166–170.
- Fraser SL, Jorgensen JH (1997) Reappraisal of the antimicrobial susceptibilities of *Chryseobacterium* and *Flavobacterium* species and methods for reliable susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 2738–2741.
- Fredriksen BN, Olsen RH, Furevik A et al (2013) Efficacy of a divalent and a multivalent water-in-oil formulated vaccine against a highly virulent strain of *Flavobacterium psychrophilum* after intramuscular challenge of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* 31: 1994–1998.
- Garnjobst L (1945) *Cytophaga columnaris* (Davis) in pure culture: a myxobacterium pathogenic to fish. *Journal of Bacteriology* 49: 113.
- Gibello A, Porrero MC, Blanco MM et al (2004) Analysis of the *gyrA* gene of clinical *Yersinia ruckeri* isolates with reduced susceptibility to quinolones. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 599–602.
- Gliniewicz K, Plant KP, LaPatra SE et al (2012) Comparative proteomic analysis of virulent and rifampicin-attenuated *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* 35: 529–539.
- Gómez E, Méndez J, Cascales D et al (2014) *Flavobacterium psychrophilum* vaccine development: a difficult task. *Microbial Biotechnology* 7: 414–423.
- Goñi-Urriza M, Arpin C, Capdepuy M et al (2002) Type II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 350–359.
- Von Graevenitz A (1990) Revised nomenclature of *Campylobacter laridis*, *Enterobacter intermedium*, and “*Flavobacterium branchiophila*.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 40: 211.
- Haburjak J, Schubert T (1997) *Flavobacterium breve* meningitis in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 33: 509–512.
- Henríquez-Núñez H, Evrard O, Kronvall G et al (2012) Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* 354: 38–44.
- Heo G-J, Kasai K, Wakabayashi H (1990) Occurrence of *Flavobacterium branchiophila* associated with bacterial gill disease at a trout hatchery. *Fish Pathology* 25: 99–105.
- Hernandez-Divers SJ, Hensel P, Gladden J et al (2009) Investigation of shell disease in map turtles (*graptemys* spp.). *Journal of Wildlife Diseases* 45: 637–652.
- Hesami S, Allen KJ, Metcalf D et al (2008) Phenotypic and genotypic analysis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from Ontario salmonids with bacterial coldwater disease. *Canadian Journal of Microbiology* 54: 619–629.
- Ho S-P, Hsu T-Y, Chen M-H et al (2000) Antibacterial effect of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol against aquatic animal bacteria. *Journal of Veterinary Medical Science* 62: 479–485.
- Högfors-Rönholm E, Wiklund T (2010) Phase variation in *Flavobacterium psychrophilum*: characterization of two distinct colony phenotypes. *Diseases of Aquatic Organisms* 90: 43–53.
- Högfors E, Pullinen K, Madetoja J et al (2008) Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum), with a low molecular mass fraction isolated

- from *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Fish Diseases 31: 899–911.
- Holt R., Rohovec JS, Fryer JL (1993) Bacterial cold-water disease. Editör: Inglis, Roberts & Brombage, Bacterial Diseases of Fish. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp: 3–22.
- Holt RA, Bertolini J, Cain K et al (2012) Coldwater Disease. Editör: AFS-FHS (American Fisheries Society-Fish Health Section), FHS blue book: suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. 2016 yılı baskısı, Bethesda, Maryland, pp:1-30
- Hooper DC (1999) Mechanisms of fluoroquinolone resistance. Drug Resistance Updates 2: 38–55.
- Humphry DR, George A, Black GW et al (2001) *Flavobacterium frigidarium* sp. nov., an aerobic, psychrophilic, xylanolytic and laminarinolytic bacterium from Antarctica. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 1235–1243.
- İspir Ü, Şeker E, Sağlam N et al (2004) Doğu Anadolu bölgesinde bazı gökkuşağı alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*) işletmelerinde görülen *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonunun araştırılması. Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi 16: 718–724.
- Izumi S, Aranishi F, Wakabayashi H (2003) Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. Diseases of Aquatic Organisms 56: 207–214.
- Izumi S, Ouchi S, Kuge T et al (2007) PCR-RFLP genotypes associated with quinolone resistance in isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Fish Diseases 30: 141–147.
- Johansen L-H, Jensen I, Mikkelsen H et al (2011) Disease interaction and pathogens exchange between wild and farmed fish populations with special reference to Norway. Aquaculture 315: 167–186.
- Jooste PJ, Britz TJ, Haast J De (1985) A numerical taxonomic study of *Flavobacterium-Cytophaga* strains from dairy sources. Journal of Applied Bacteriology 59: 311–323.
- Jooste PJ, Hugo CJ (1999) The taxonomy, ecology and cultivation of bacterial genera belonging to the family *Flavobacteriaceae*. International Journal of Food Microbiology 53: 81–94.
- Karatas S, Ercan D, Steinum TM et al (2010) First isolation of a *Flavobacterium johnsoniae* like bacteria from cultured Russian sturgeon in Turkey. Journal of Animal and Veterinary Advances 9: 1943–1946.
- Kim JH, Hwang SY, Son JS et al (2011) Molecular characterization of tetracycline- and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. Journal of Veterinary Science 12: 41–48.
- Kimura N, Wakabayashi H, Kudo S (1978) Studies on Bacterial Gill Disease in Salmonids. Fish Pathology 12: 233–242.
- Ko Y-M, Heo G-J (1997) Characteristics of *Flavobacterium branchiophilum* isolated from rainbow trout in Korea. Fish Pathology 32: 97–102.
- Kondo M, Kawai K, Okabe M et al (2003) Efficacy of oral vaccine against bacterial coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. Diseases of Aquatic Organisms 55: 261–264.
- Korun J, Timur G (2001) Gökkuşağı Alabalıklarında (*Onchorhynchus mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma. İstanbul Üniversitesi Su

- Ürünleri Dergisi 12: 15–30.
- Kronvall G (2010) Normalized resistance interpretation as a tool for establishing epidemiological MIC susceptibility breakpoints. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 4445–4452.
- Kubilay A, Altun S, Diler Ö et al (2008) Isolation of *Flavobacterium columnare* from Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 8: 165–169.
- Kubilay A, Altun S, Didinen BI et al (2009) Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 15(5): 709-715.
- Kum C, Kirkan S, Sekkin S et al (2008) Comparison of in vitro antimicrobial susceptibility in *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout fry. *Journal of Aquatic Animal Health* 20(4): 245-251.
- Kumagai A, Nawata A (2011) Concentration of *Flavobacterium psychrophilum* in the Ovarian Fluid and Milt of Cultured Salmonids. *Fish Pathology* 46: 116–119.
- LaFrentz BR, LaPatra SE, Jones GR et al (2002) Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative per cent survival in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* 25: 703–713.
- LaFrentz BR, LaPatra SE, Jones GR et al (2004) Protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 17–26.
- LaFrentz BR, Goodwin AE, Shoemaker CA (2012) Columnaris Disease Editör: AFS-FHS (American Fisheries Society-Fish Health Section), FHS blue book: suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. 2016 yılı baskısı, Bethesda, Maryland, pp:1-20.
- Leeds TD, Silverstein JT, Weber GM et al (2010) Response to selection for bacterial cold water disease resistance in rainbow trout. *Journal of Animal Science* 88: 1936–1946.
- Li H, Qiao G, Gu J et al (2010) Phenotypic and genetic characterization of bacteria isolated from diseased cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* in northeastern China. *Diseases of Aquatic Organisms* 91: 223–235.
- Lievens B, Frans I, Heusdens C et al (2011) Rapid detection and identification of viral and bacterial fish pathogens using a DNA array-based multiplex assay. *Journal of Fish Diseases* 34: 861–875.
- De Liguoro M, Cibir V, Capolongo F et al (2003) Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere* 52: 203–212.
- Lindstrom NM, Call DR, House ML et al (2009) A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay and filtration-based fluorescent antibody test as potential tools to screen broodstock for infection with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Aquatic Animal Health* 21(1): 43-56.
- Loch TP, Fujimoto M, Woodiga SA et al (2013a) Diversity of Fish-Associated Flavobacteria of Michigan. *Journal of Aquatic Animal Health* 25: 149–164.
- Loch TP, Faisal M (2014a) *Flavobacterium spartansii* sp. nov., a pathogen of fishes, and emended descriptions of *Flavobacterium aquidurensis* and *Flavobacterium araucanum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

- Microbiology 64: 406–412.
- Loch TP, Faisal M (2014b) Deciphering the biodiversity of fish-pathogenic *Flavobacterium* spp. recovered from the Great Lakes basin. *Diseases of Aquatic Organisms* 112: 45–57.
- Loch TP, Faisal M (2015) Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *Journal of Advanced Research* 6(3): 283-300.
- Loch TP, Faisal M (2017) *Flavobacterium* spp. Editör: Woo PTK & Cipriano RC, Fish viruses and bacteria: pathobiology and protection. CABI, Wallingford, pp: 211–232.
- Lorenzen E, Dalsgaard I, From J et al (1991) Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 11(2):77-79.
- Lorenzen E, Brudeseth BE, Wiklund T et al (2010) Immersion exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry to wildtype *Flavobacterium psychrophilum* induces no mortality, but protects against later intraperitoneal challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 28: 440–444.
- Lorenzen E, Olesen NJ (1997) Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: Serological studies. *Diseases of Aquatic Organisms* 31(3): 197-208.
- Lowrey L, Woodhams DC, Tacchi L et al (2015) Topographical mapping of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microbiome reveals a diverse bacterial community in the skin with antifungal properties. *Applied and Environmental Microbiology*: AEM-01826:1-12.
- Lumsden JS, Ostland VE, MacPhee DD et al (1994) Protection of rainbow trout from experimentally induced bacterial gill disease caused by *Flavobacterium branchiophilum*. *Journal of Aquatic Animal Health* 6: 292–302.
- Madetoja J, Dalsgaard I, Wiklund T (2002) Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish-farming environments. *Diseases of Aquatic Organisms* 52: 109–118.
- Madetoja J, Nystedt S, Wiklund T (2003) Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 217–223.
- Madetoja J, Wiklund T (2002) Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 259–266.
- Madsen L, Moller JD, Dalsgaard I (2005) *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum), hatcheries: studies on broodstock, eggs, fry and environment. *Journal of Fish Diseases* 28: 39–47.
- Madsen L, Dalsgaard I (1999) Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Diseases of Aquatic Organisms* 36: 169–176.
- Mainous ME, Kuhn DD, Smith SA (2012) Efficacy of common aquaculture compounds for disinfection of *Flavobacterium* and *F. psychrophilum*. *Journal of Applied Aquaculture* 24: 262–270.
- McCammon SA, Innes BH, Bowman JP et al (1998) *Flavobacterium hibernum* sp. nov., a lactose-utilizing bacterium from a freshwater Antarctic lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 48: 1405–1412.
- Michel C, Garcia C (2003) Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Veterinary Research* 34: 127–132.

- Minogue E, Barry T, Carroll C et al (2012) Setting epidemiological cut-off values for *Aeromonas salmonicida* disc diffusion data capable of discriminating between strains on the basis of their possession of sul1 genes. *Aquaculture* 364: 329–332.
- Miranda CD, Kehrenberg C, Ulep C et al (2003) Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Bacteria from Chilean Salmon Farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 883–888.
- Miranda CD, Tello A, Keen PL (2013) Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. *Frontiers in Microbiology* 4:233.
- Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F et al (2003) *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 26: 563–574.
- Ngo TPH, Smith P, Bartie KL et al (2017) Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from the United Kingdom. *Journal of Fish Diseases* 41(2): 309-320.
- Nilsen H, Olsen AB, Vaagnes Ø et al (2011) Systemic *Flavobacterium psychrophilum* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farmed in fresh and brackish water in Norway. *Journal of Fish Diseases* 34: 403–408.
- Nogi Y, Soda K, Oikawa T (2005) *Flavobacterium frigidimarum* sp. nov., isolated from Antarctic seawater. *Systematic and Applied Microbiology* 28(4): 310-315.
- Nya EJ, Austin B (2011) Development of immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila* after the dietary application of garlic. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 845–850.
- Oplinger RW, Wagner E (2010) Disinfection of Contaminated Equipment: Evaluation of Benzalkonium Chloride Exposure Time and Solution Age and the Ability of Air-Drying to Eliminate *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Aquatic Animal Health* 22: 248–253.
- Ordal EJ, Rucker RR (1944) Pathogenic myxobacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 56: 15–18.
- Ostland VE, Lumsden JS, MacPhee DD et al (1994) Characteristics of *Flavobacterium branchiophilum*, the cause of salmonid bacterial gill disease in Ontario. *Journal of Aquatic Animal Health* 6: 13–26.
- Ostland VE, MacPhee DD, Lumsden JS et al (1995) Virulence of *Flavobacterium branchiophilum* in experimentally infected salmonids. *Journal of Fish Diseases* 18: 249–262.
- Ozcan M, Sariyyupoglu M (2014) Identification and Investigation of Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Flavobacterium psychrophilum* in Fry Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Some Trout. *International Journal of Sciences* (3): 24-34.
- Öztürk RÇ, Altınok İ (2014) Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14: 275–297.
- Pan J-C, Ye R, Wang H-Q et al (2008) *Vibrio cholerae* O139 multiple-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202-like conjugative plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 3829–3836.
- Panangala VS, Shelby RA, Shoemaker CA et al (2006) Immunofluorescent test for simultaneous detection of *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare*. *Diseases of Aquatic Organisms* 68: 197–207.
- Panangala VS, Shoemaker CA, Klesius PH (2007) TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Flavobacterium columnare*. *Aquaculture Research* 38: 508–517.

- Peeler EJ, Taylor NG (2011) The application of epidemiology in aquatic animal health -opportunities and challenges. *Veterinary Research* 42(1): 94.
- Plant KP, LaPatra SE, Call DR et al (2011) Immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with *Flavobacterium psychrophilum* proteins elongation factor-Tu, SufB Fe-S assembly protein and ATP synthase $\beta$ . *Journal of Fish Diseases* 34: 247–250.
- Prasad Y, Kumar D, Sharma AK (2011) Lytic bacteriophages specific to *Flavobacterium columnare* rescue catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) from columnaris disease. *Journal of Environmental Biology* 32(2): 161-168.
- Rahman MH, Ototake M, Iida Y et al (2000) Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology* 35: 199–203.
- Ramsrud AL, LaFrentz SA, LaFrentz BR et al (2007) Differentiating 16S rRNA alleles of *Flavobacterium psychrophilum* using a simple PCR assay. *Journal of Fish Diseases* 30: 175–180.
- Rhodes G, Huys G, Swings J et al (2000) Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3883–3890.
- Rintamäki-Kinnunen P, Bernardet J-F, Bloigu A (1997) Yellow pigmented filamentous bacteria connected with farmed salmonid fish mortality. *Aquaculture* 149: 1–14.
- Romero J, Navarrete P (2006) 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology* 51: 422–430.
- Sarti M, Giorgetti G (1996) A survey of flexibacteriosis or Cytophaga lb. diseases on trout farms. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 16: 8–12.
- Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I et al (2000) Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4908–4915.
- Segers P, Mannheim W, Vancanneyt M et al (1993) *Riemerella anatispestifer* gen. nov., comb. nov., the Causative Agent of Septicemia Anserum Exsudativa, and Its Phylogenetic Affiliation within the *Flavobacterium-Cytophaga* rRNA Homology Group. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 768–776.
- Şen İ, Rad F (2016) Türkiye’de Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Walbaum, 1792) Yetiştiriciliğinde. *Turkish Journal Agricultural Economics* 22: 1–8.
- Shah SQA (2012a) Antimicrobial resistance in Fish Pathogenic and Aquatic Environmental Bacteria. Akademika Publishing, Oslo, pp:23-25.
- Shah SQA, Nilsen H, Bottolfsen K et al (2012b) DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in quinolone-resistant *Flavobacterium psychrophilum* isolated from diseased salmonids in Norway. *Microbial Drug Resistance* 18: 207–214.
- Shah SQA, Cabello FC, L’Abée-Lund TM et al (2014) Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental Microbiology* 16(5): 1310-1320.
- Shoemaker CA, Klesius PH, Drennan JD et al (2011) Efficacy of a modified live *Flavobacterium columnare* vaccine in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 304–308.

- Siekoula-Nguedia C, Blanc G, Duchaud E et al (2012) Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: Predominance of a clonal complex. *Veterinary Microbiology* 161: 169–178.
- Silverstein JT, Vallejo RL, Palti Y et al (2009) Rainbow trout resistance to bacterial cold-water disease is moderately heritable and is not adversely correlated with growth. *Journal of Animal Science* 87: 860–867.
- Smith P, Endris R, Kronvall G et al (2016) Epidemiological cut-off values for *Flavobacterium psychrophilum* MIC data generated by a standard test protocol. *Journal of Fish Diseases* 39(2): 143–154.
- Smith P, Finnegan W, Ngo T et al (2018) Influence of incubation temperature and time on the precision of MIC and disc diffusion antimicrobial susceptibility test data. *Aquaculture* 490: 19–24.
- Smith P, Kronvall G (2015) Effect of incubation temperature and time on the precision of data generated by antibiotic disc diffusion assays. *Journal of Fish Diseases* 38: 629–636.
- Soltani M, Munday B, Carson J (1994) Susceptibility of some freshwater species of fish to infection by *Cytophaga johnsonae*. *Bulletin of European Fish Pathologists* 14: 133–135.
- Soule M, LaFrentz S, Cain K et al (2005) Polymorphisms in 16S rRNA genes of *Flavobacterium psychrophilum* correlate with elastin hydrolysis and tetracycline resistance. *Diseases of Aquatic Organisms* 65: 209–216.
- Starliper CE (2012) Bacterial Gill Disease. Editor: AFS-FHS (American Fisheries Society-Fish Health Section), FHS blue book: suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. 2016 yılı baskısı, Bethesda, Maryland, pp:1-22.
- Stine OC, Johnson JA, Keefer-Norris A et al (2007) Widespread distribution of tetracycline resistance genes in a confined animal feeding facility. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29: 348–352.
- Strohl WR, Tait LR (1978) *Cytophaga aquatilis* sp. nov., a facultative anaerobe isolated from the gills of freshwater fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 28: 293–303.
- Ström-Bestor M, Wiklund T (2011) Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, in vitro. *Journal of Fish Diseases* 34: 255–264.
- Sundell K, Högfors-Rönholm E, Wiklund T (2014) Vaccination against Diseases Caused by Flavobacteriaceae Species. Editor: Guddingn R, Lillehaug A & Øystein E, *Fish Vaccination*. 1st edn. Wiley-Blackwell, Oxford, pp: 273–282.
- Sundell K, Wiklund T (2011) Effect of biofilm formation on antimicrobial tolerance of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* 34(5): 373–383.
- Suomalainen L, Bandilla M, Valtonen ET (2009) Immunostimulants in prevention of columnaris disease of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 32: 723–726.
- Swain P, Mishra S, Dash S et al (2007) Association of *Flavobacterium branchiophilum* in bacterial gill disease of Indian major carps. *The Indian Journal of Animal Sciences* 77(7):1-20.
- Tabata K (2004) Relationships of the infectivity of *Flavobacterium psychrophilum* between native fishes and released ayu *Plecoglossus altivelis* in a river. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)* 70(3): 318–323
- Timur G, Timur M, Korun J (2004) A study on the outbreak of *Flavobacterium*



- psychrophilum* infection in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hatchery in Turkey. Istanbul University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 17: 21–27.
- TÜİK (2018) Türkiye İstatistik Kurumu, Su Ürünleri İstatistikleri, <https://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf>, (04.06.2018).
- TÜİK (2013) Türkiye İstatistik Kurumu, Su Ürünleri İstatistikleri, Su Ürünleri İstatistikleri, [http://www.tuik.gov.tr/IcerikGetir.do?istab\\_id=52](http://www.tuik.gov.tr/IcerikGetir.do?istab_id=52), (04.06.2018).
- Ture M, Boran H (2015) Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Lactococcus* sp. strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 59: 37–42.
- 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.
- Van TTH, Chin J, Chapman T et al (2008) Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. International Journal of Food Microbiology 124: 217–223.
- Verner-Jeffreys DW, Brazier T, Perez RY et al (2017) Detection of the florfenicol resistance gene floR in Chryseobacterium isolates from rainbow trout. Exception to the general rule?. FEMS Microbiology Ecology 93(4):1-11.
- Vliet D Van, Loch TP, Smith P et al Antimicrobial Susceptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* Isolates from the Great Lakes Basin, Michigan. Microbial Drug Resistance 23(6): 791-798.
- Wakabayashi H, Huh GJ, Kimura N (1989) *Flavobacterium branchiophila* sp. nov., a causative agent of bacterial gill disease of freshwater fishes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 39: 213–216.
- Wakabayashi H (1991) Effect of environmental conditions on the infectivity of *Flexibacter columnaris* to fish. Journal of Fish Diseases 14: 279–290.
- Wakabayashi H (1993) Columnaris disease. Editör: Inglis RJR & Bromage NR, Bacterial Diseases of Fish. V. edition, Blackwell science Ltd, Oxford, pp: 23–39.
- Wang N, Yang X, Jiao S et al (2014) Sulfonamide-Resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Soils Fertilized with Manures from Jiangsu Province, Southeastern China (JL Balcazar, Ed. by ). PLoS ONE 9: e112626.
- Welker TL, Shoemaker CA, Arias CR et al (2005) Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. Diseases of Aquatic Organisms 63: 129–138.
- Wiens GD, LaPatra SE, Welch TJ et al (2014) Complete genome sequence of *Flavobacterium psychrophilum* strain CSF259-93, used to select rainbow trout for increased genetic resistance against bacterial cold water disease. Genome Announcements 2: e00889.
- WHO (2006) Report of a joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance, Seoul, Republic of Korea, 13–16 <http://www.fao.org/3/a-bq501e.pdf>, (03.07.2018).
- Wiklund, Kaas, Lonnstrom et al (1994) Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol 14(2): 44-46.
- Wilkins LGE, Rogivue A, Schütz F et al (2015) Increased diversity of egg-associated bacteria on brown trout (*Salmo trutta*) at elevated temperatures. Scientific Reports 5: 17084.

- Wong S, Waldrop T, Summerfelt S et al (2013) Aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) possess a large core intestinal microbiota that is resistant to variation in diet and rearing density. Applied and Environmental Microbiology: AEM-00924.
- Xie Z-Y, Zhou Y-C, Wang S-F et al (2009) First isolation and identification of *Elizabethkingia meningoseptica* from cultured tiger frog, *Rana tigrina rugulosa*. Veterinary Microbiology 138: 140–144.
- Yang S, Carlson K (2004) Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique. Water Research 38: 3155–3166.
- Yıldırım Y (2010) Antimikrobiyel Duyarlılık Testleri; İlgili Metodlar, Sonuçların Yorumlanması ve Kanatlılarda Bulunan Bazı Bakterilerdeki Dirençlilik. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 7(2): 117–129.
- Yılmaz E, Yılmaz A, Bilgin B et al (2011) Alabalık Kuluçkahanelerinde Görülen Önemli Hastalıklar ve Tedavi Yöntemleri. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi (2): 37-39.
- Yıldırım S, Özer S (2010) Mersin İli Çağlarca Köyündeki Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Walbaum, 1792) Kuluçkahanelerinde *Flavobacterium* Spp. varlığı. Journal of Fisheries Sciences. com 4(1): 112–122.
- Zamora L, Fernández-Garayzábal JF, Svensson-Stadler LA et al (2012) *Flavobacterium oncorhynchi* sp. nov., a new species isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Systematic and Applied Microbiology 35: 86–91.
- Zamora L, Vela AI, Sánchez-Porro C et al (2013a). Characterization of flavobacteria possibly associated with fish and fish farm environment. Description of three novel *Flavobacterium* species: *Flavobacterium collinsii* sp. nov., *Flavobacterium branchiarum* sp. nov., and *Flavobacterium branchiicola* sp. nov. Aquaculture 416: 346-353
- Zamora L, Fernández-Garayzábal JF, Sánchez-Porro C et al (2013b) *Flavobacterium plurextorum* sp. nov. Isolated from Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). PLoS ONE 8(6): e67741.
- Zamora L, Vela AI, Sánchez-Porro C et al (2014) *Flavobacterium tructae* sp. nov. and *Flavobacterium piscis* sp. nov., isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64: 392–399.
- Zhang DC, Wang HX, Liu HC et al (2006) *Flavobacterium glaciei* sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the China No. 1 glacier. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56(12): 2921-2925.

## 7. SİMGELER ve KISALTMALAR

%	: Yüzde
AML	: Amoksisilin
BCWD	: Bakteriyel soğuk su hastalığı
BGD	: Bakteriyel Solungaç Hastalığı
Bp	: Baz Çifti
BSGM	: Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü
CA	: Canlı ağırlık
Dk	: Dakika
DMHA	: Dilue Müller Hinton Agar
ELISA	: Enzim ilintili immün test
ENR	: Enrofloksasin
ERM	: Eritromisin
FAT	: Floresan antikor testi
FDS	: Fötal dana serumu
FEAP	: Avrupa akuakültür yetiştiricilik federasyonu
FFC	: Florfenikol
IFAT	: İndirekt floreasan antikor Testi
Kob	: koloni oluşturan birim
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mM	: Mili Molar
NaCl	: Sodyum klorür
OA	: Oksalinik Asit
OT	: Oksitetrasiklin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	: Piko Mol
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RTFS	: Gökkuşluğu alabalığı yavru sendromu
Sn	: Saniye
SXT	: Sulfamethoksazol/trimetoprim
TYES	: Tryptone yeast extract salts agar
µl	: Mikro litre
µM	: Mikro Molar

## 8. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını ve yol göstericiliğini esirgemeyen, akademik hayata atılmama vesile olan ve bugünlere gelmemde büyük emeği geçen danışmanım Sayın Prof. Dr. Soner ALTUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın örnekleme aşamasında bana yardımcı olan çalışma arkadaşım Ayşe Gül BÜYÜKEKİZ'e, fakültemizdeki öğrenci arkadaşlarım ve çalışmalarımda katkısı olan tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora çalışmalarım süresince yapılan proje çalışmalarında kapılarını sonuna kadar açan, çalışmalarımızda her türlü kolaylığı sağlayan ve tecrübelerini aktaran işletmelerin yönetim ve tüm çalışanlarına şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmalarımın proje ile maddi olarak desteklenmesine olanak sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın gerek örnekleme ve laboratuvar çalışmaları kısmında, gerekse tezimin hazırlanması ve düzenlenmesi sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Araş. Gör. Dr. Muhammed DUMAN'a çok teşekkür ederim.

Gerek lisans gerekse doktora eğitimim boyunca tüm zorlukları benimle göğüsleyen, her daim üşenmeden yardıma koşan değerli dostum Araş. Gör. Dr. Bayram SÜZER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere ulaşmamdaki en büyük pay sahibi olan, her zaman destek ve duaları ile yanımda olan, annem Serpil SATICIOĞLU'na, babam Mehmet SATICIOĞLU'na ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle, bu zorlu doktora sürecinde bütün sıkıntılara sabır gösteren ve zaman zaman ihmal ettiğim eşim Betül SATICIOĞLU ve oğlum Mehmet Erdem SATICIOĞLU'e sonsuz sevgi, hürmet ve teşekkürlerimi sunarım.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İzzet Burçin SATICIOĞLU  
Doğum Yılı: 1988  
Doğum Yeri: Diyarbakır

### EĞİTİM

2013-2018 Uludağ Üni. Veteriner Fak. Su Ürünleri Hastalıkları A.D. (doktora)  
2008-2012 Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi (Yüksek Lisans), Bursa  
2006-2008 Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
2004-2005 Atatürk Lisesi, Mersin  
2002-2004 Ziya Gökalp Lisesi, Diyarbakır  
1999-2002 Ali Emiri İlköğretim Okulu, Diyarbakır  
1994-1999 Hüseyin Gazi İlkokulu, Zile/Tokat

### Yabancı Dil Yeteneği:

#### İngilizce

- 77,5 (YDS, 2013- İlkbahar)
- 83,75 (YÖKDİL, 2017, Sonbahar)

### Alınan Eğitimler ve Sertifikalar

1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası. Uludağ Üniversitesi. 2014
2. PCR Temelli Genetik Analizler Yaklaşımlar, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü 2017
3. DNA Barkodlama ve Filogenetik Analiz, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü 2017
4. TÜBİTAK-BİDEB Proje Yazma Eğitimi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 2017

### Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Ülkemizde Gökkuşluğu alabalığı işletmelerinde Sıklıkla Karşılaşılan Motil Aeromonas (*Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*), *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* etkenlerinde antimikrobiyal direnç, Sülfonamidler Tetrasiklin Florfenikol ve Eritromisin ve IPN, VHS, IHN virüslerinin varlığının incelenmesi, TAGEM/14/AR-GE/26 (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü), Araştırmacı, 21/07/2014 (ULUSAL).
2. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) kuluçkahanelerinde hastalık oluşturan *Flavobacterium* türlerinin genotipik karakterizasyonu ve antimikrobiyal direnç gelişiminde rol oynayan genlerin varlığı-yaygınlığının belirlenmesi, Bursiyer, TÜBİTAK, Proje no: 116O626, 2016-(devam ediyor)
3. Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) *Yersinia ruckeri*, *Listonella anguillarum*, *Lactococcus garvieae* ve Deniz levreklerinde (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) *Listonella anguillarum*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*'ya karşı monovalan banyo emülsiyon ve polivalan enjeksiyon emülsiyon inaktif aşu üretilmesi, Araştırmacı, , 01/07/2018 (ULUSAL) -(devam ediyor).
4. Akuakültürden izole edilen *Vibrio spp.* ve *Pseudomonas spp.* türlerinin identifikasyonu, genotiplendirilmesi, antimikrobiyal duyarlılık ve direnç genlerinin belirlenmesi, Araştırmacı, TÜBİTAK, Proje no: 118O420, 2018-(devam ediyor)

### Araştırma makaleleri

#### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. **Saticioglu, I. B.**, Duman, M., & Altun, S. (2018). Antimicrobial resistance and molecular characterization of *Pantoea agglomerans* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Microbial pathogenesis*, 119, 131-136
2. **Saticioglu, I. B.**, Duman, M., Wiklund T., Altun, S. (2018). Serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from farmed salmonids in Turkey. *J Fish Dis.* <https://doi.org/10.1111/jfd.12901>
3. Duman M, **Saticioglu IB**, Janda JM, Altun S. (2018). The determination of the infectious status and prevalence of motile *Aeromonas* species isolated from Disease cases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and aquarium fish. *J Fish Dis.* 2018;00:1–15. <https://doi.org/10.1111/jfd.12896>
4. Duman, M., A. G. Buyukekiz, **I. B. Saticioglu**, M. Cengiz, P. Sahinturk. S. Altun, 2017. Epidemiology, Genotypic Diversity, and Antimicrobial Resistance of *Lactococcus garvieae* in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Science*. In press.
5. Duman, M., **I. B. Saticioglu**, A. G. Buyukekiz, F. Balta, S. Altun, 2017. Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance Profile of Atypical *Citrobacter gillenii* and *Citrobacter* sp. isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. S2213-7165(17)30101-7. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.014>.
6. Duman, M., S. Altun, M. Cengiz, **I. B. Saticioglu**, A. G. Buyukekiz, P. Sahinturk. 2017. Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, DOI <https://doi.org/10.3354/dao03132>.

7. Büyükekiz A. G., Altun S., Furuseth Hansen E., **Saticiöglu İ. B.**, Duman M., Markussen T., Rimstad E., 2017. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) serotype Sp is prevalent in Turkish rainbow trout farms. Journal of Fish Diseases DOI: 10.1111/jfd.12675.

#### **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:**

1. Yavaş Ö., Duman M., **Saticiöglu İ. B.**, Garip E., Karaer F., & Altun, S. Akuakültürde Tespit Edilen Fekal Koliform Kökenli Antimikrobiyal Direnç Genleri. 2018. Uluslararası Su ve Çevre Kongresi, 22-24 Mart, Bursa
2. Duman M., Altun S., **Saticiöglu İ. B.**, Büyükekiz A. G. 2016. Genotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated From Rainbow Trout By RAPD PCR Using M13 And P5 Primers In Turkey. AquaEpi I, Doi: 10.3389/conf.FVETS.2016.02.00017 (Özet Bildiri/)
3. Duman M., Altun S., Büyükekiz A. G., **Saticiöglu İ. B.** 2016. Genotyping of *Yersinia ruckeri* Isolated From Rainbow Trout In Turkey By RAPD PCR. AquaEpi I, Doi: 10.3389/conf.FVETS.2016.02.00016 (Özet Bildiri/)
4. Büyükekiz A. G., Altun S., Furuseth Hansen E., Burçin **Saticiöglu İ. B.**, Duman M., Markussen T., Rimstad E., 2017. Infectious pancreatic necrosis virus is prevalent in farmed rainbow trout in Turkey. 10th International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates.
5. **Saticiöglu İ. B.**, Duman M., Buyukekiz A. G., Sahinturk P., Cengiz M., Altun S., 2017. Determination of Oxytetracycline Resistance of *Yersinia ruckeri* Isolated From Rainbow Trout in Turkey. 33. World Veterinary Congress, WVC Incheon, Korea.
6. **Saticiöglu İ. B.**, Buyukekiz A. G., Duman M., Altun S., 2017. Detection of the First Sulfanamid Resistance Genes Positivity in Aquatic *Myroides* spp. Isolates in Turkey. 33. World Veterinary Congress, WVC Incheon, Korea.
7. **Saticiöglu İ. B.**, Duman M., Buyukekiz A. G., Altun S., 2017. Atypical Strains of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter asburiae* Isolated From Rainbow Trouts. 33. World Veterinary Congress, WVC Incheon, Korea.

#### **Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:**

1. Altun S., **Saticiöglu İ. B.**, Duman M., Buyukekiz A. G., Oruç H. H. Akuakültürde Toksikoloji. Türkiye Klinikleri J. Vet. Sci. Pharmacol Toxicol- Special Topics 2015;1(3)27-36
2. Duman, M, **Saticiöglu, I** , Altun, S . (2018). Biochemical Differences and Rapid Identification of *Yersinia ruckeri* and *Lactococcus garvieae* Isolated from Aquaculture. Uludag University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, 37 (1), 37-47. DOI: 10.30782/uluvfd.399275
3. Yavaş Ö., Duman M., **Saticiöglu İ. B.**, Garip E., Karaer F., & Altun, S. Akuakültürde Tespit Edilen Fekal Koliform Kökenli Antimikrobiyal Direnç Genleri. İklim Değişikliği ve Çevre, 3(1), 22-26.

### Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

1. Duman M., Altun S., Cengiz M., Büyükekiz A. G., **Saticioğlu İ. B.** 2016. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum 1792) Çiftliklerinde Hastalık Oluşturan *Lactococcus garvieae* Enfeksiyonlarında Antimikrobiyal Direncin Yaygınlığı. 5. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi, Bursa
2. Altun S., Duman M., Büyükekiz A. G., **Saticioğlu İ. B.** 2016. Türkiye’deki Gökkuşığı Alabalığı Çiftliklerinden İzole Edilen *Yersinia ruckeri* İzolatlarının Rapd-Pcr Yöntemiyle Genotiplendirilmesi. 12. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi
3. Altun S., Duman M., **Saticioğlu İ. B.** Büyükekiz A. G., 2016. Türkiye’deki Gökkuşığı Alabalığı Çiftliklerinden 2013-2015 Yılları Arasında İzole Edilen *L. garvieae* İzolatlarının Genetik Akralılıklarının Belirlenmesi. 12. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi
4. Büyükekiz A.G., Altun S., Duman M., **Saticioğlu İ. B.** 2016. Türkiye’de Gökkuşığı Alabalığı İşletmelerinde İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Hastalığının Dağılımı Nevşehir/Türkiye
5. **Saticioğlu İ. B.**, Altun S., Duman M., Büyükekiz A.G. 2016. Kültürü Yapılan Balıklarda Aşı Kullanımı 12. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi, Nevşehir (Türkiye)
6. Altun S., **Saticioğlu İ. B.** Büyükekiz A. G., Duman M. 2013. Gökkuşığı Alabalığı İşletmelerindeki Hastalık Vakalarından İzole Edilen Bakteriyel Etkenlerin Antimikrobiyal Duyarlılıkların İncelenmesi İstanbul, P-142



ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	İzzet Burçin SATICIOĞLU
Tez Adı	Gökkuşuğu alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss walbaum 1792</i> ) kuluçkahanelerinde hastalık oluşturan flavobacterium türlerinin genotipik karakterizasyonu ve antimikrobiyal direnç gelişiminde rol oynayan genlerin varlığı-yaygınlığının belirlenmesi
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Veteriner-Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı
Tez Türü	Doktora tezi
Tez Danışman(lar)ı	Prof. Dr. Soner ALTUN
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama İzni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum 1 yıl <input type="checkbox"/> 2 yıl <input type="checkbox"/> 3 yıl <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum

Hazırlamış olduğum tezimin yukarıda belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

11.09.2018

İmza:

  
RIT-FR-KDD-12/00