



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
VFT-DR-2007-0001

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) RTFS'YE (RAINBOW TROUT FRY SYNDROME) NEDEN OLAN *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* ETKENİNİN İZOLASYONU VE ANTİBAKTERİYEL SAĞALTIM SEÇENEĞİNİN BELİRLENMESİ**

Araş. Gör. Murat BOYACIOĞLU

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ferda AKAR

AYDIN - 2007

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
VFT-DR-2007-0001

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) RTFS'YE (RAINBOW TROUT FRY SYNDROME) NEDEN OLAN *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* ETKENİNİN İZOLASYONU VE ANTİBAKTERİYEL SAĞALTIM SEÇENEĞİNİN BELİRLENMESİ**

Araş. Gör. Murat BOYACIOĞLU

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ferda AKAR

AYDIN - 2007



## ÖNSÖZ

RTFS (Rainbow Trout Fry Syndrome), Türkiye de dahil gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede balık yavrularında yüksek oranda ölümlere neden olan bir hastalıktır. Enfeksiyona neden olan *Flavobacterium psychrophilum* (*F. psychrophilum*) suşunun fenotipik ve biyokimyasal özellikleri izole edilen coğrafik bölgelere göre değişmektedir. Literatürler izole edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarının da farklı olduğunu ve direnç gelişiminin var olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, merkezi Aydın'da bulunan, Muğla iline bağlı özel bir işletmede doğal yolla meydana gelen ve enfeksiyona neden olan *F. psychrophilum* suşunun izolasyonu ve identifikasyonunun ardından, *in vitro* ve *in vivo* ortamda etkili olan antibiyotikler araştırılmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda, enfeksiyonun sağaltımında fenikol grubu antibiyotiklerden florfenikolün etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışma, RTFS enfeksiyonunun sağaltımında, direnç gelişimi de göz önünde bulundurularak yapılacak antibiyogram testlerinden sonra, etkili antibiyotiğin kullanılacağı çalışmalarda referans olarak kullanılabilir.

Araştırma, “Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) RTFS'ye (Rainbow trout fry syndrome) neden olan *Flavobacterium psychrophilum* etkeninin izolasyonu ve antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi” isimli ve VTF-06005 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin desteği ile gerçekleştirilmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
KABUL VE ONAY SAYFASI .....	i
ÖNSÖZ .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Tanım .....	3
1.2. Tarihçe .....	3
1.3. Etiyoloji .....	4
1.4. Epizootiyoloji.....	5
1.5. Patogenezis .....	6
1.6. Bulaşma .....	7
1.7. Bulgular .....	8
1.7.1. Makroskobik Bulgular .....	8
1.7.2. Mikroskobik Bulgular .....	9
1.8. Tanı .....	10
1.9. Seroloji .....	12
1.10. Aşılama .....	13
1.11. Koruma ve Kontrol .....	13
1.12. Sağaltım .....	15
1.12.1. RTFS Enfeksiyonunda Kullanılan Antibiyotikler .....	16

1.12.1.1. Beta-laktamlar .....	17
1.12.1.2. Nitrofuranlar .....	18
1.12.1.3. Fenikoller .....	18
1.12.1.4. Kinolonlar .....	20
1.12.1.5. Tetrasiklinler .....	21
1.12.1.6. Sülfonamidler .....	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM .....	26
2.1. Gereç .....	26
2.1.1. Hayvan Materyali .....	26
2.1.2. Besiyerleri .....	27
2.1.2.1. İzolasyon besiyerleri .....	27
2.1.2.2. İdentifikasyon besiyerleri .....	27
2.1.2.3. Ayıraçlar .....	30
2.1.2.4. Boyalar .....	31
2.1.3. API ZYM Enzim Testi .....	31
2.1.4. Referans Bakteri Suşu .....	31
2.1.5. Antibiyotik Tanı Diskleri .....	31
2.1.6. İlaç Standartları .....	32
2.1.7. Cihazlar .....	32
2.2. Yöntem .....	32
2.2.1. Bakteri İzolasyonu .....	32
2.2.2. Bakteri Suşlarının İdentifikasyonu .....	33
2.2.2.1. Gram boyama .....	33
2.2.2.2. Katalaz testi .....	33
2.2.2.3. Oksidaz (sitokrom oksidaz) testi .....	34
2.2.2.4. Glikoz, laktoz, gaz, H <sub>2</sub> S testi .....	34
2.2.2.5. Mannitol ve hareket testi .....	34
2.2.2.6. Üreaz (üre hidrolizi) ve indol testi .....	34
2.2.2.7. Nitrat testi .....	35
2.2.2.8. Oksidasyon/fermentasyon (O/F) testi .....	35
2.2.2.9. Jelatin hidrolizi (jelatinaz üretimi) .....	35
2.2.2.10. Metil kırmızısı - Voges Proskauer (MR-VP) testi .....	35
2.2.2.11. Fleksirubin pigment testi .....	36

2.2.2.12. Kongo kırmızısı (galaktozamin glikan) testi .....	36
2.2.2.13. Simmons sitrat testi .....	36
2.2.2.14. Tryptone Soya Agar, Plate Count Agar, Müeller-Hinton Agar ve Kanlı Agarda üreme .....	37
2.2.2.15. NaCl içeren <i>Cytophaga</i> agarda üreme .....	37
2.2.2.16. <i>Cytophaga</i> agarda 5 °C ve 37 °C'de üreme .....	37
2.2.2.17. API ZYM enzim testi .....	37
2.2.3. Antibiyogram Testleri .....	38
2.2.4. Antibakteriyel İlaç ve Doz Uygulaması.....	38
2.3. İstatistiksel Değerlendirme .....	39
3. BULGULAR .....	40
3.1. İşletmeye Ait Bazı Bulgular .....	40
3.2. Enfekte Balıklarda Gözlenen Klinik Bulgular .....	40
3.3. Enfekte Balıklarda Gözlenen Otopsi Bulguları .....	42
3.4. Bakteri Suşlarının Fenotipik ve Biyokimyasal Testleri .....	42
3.5. Bakteri Suşlarının Antibiyotik Duyarlılığı .....	48
3.6. Antibakteriyel İlaç Uygulaması .....	51
4. TARTIŞMA .....	55
4.1. Enfekte Balıklarda Gözlenen Klinik Bulgular ve Otopsi Bulguları .....	55
4.2. Bakteri Suşlarının Fenotipik ve Biyokimyasal Özellikleri .....	56
4.3. Bakteri Suşlarının Antibiyotik Duyarlılığı .....	58
4.4. Antibakteriyel İlaç Sağaltımı .....	59
4.5. Antibakteriyel Direnç Gelişimi .....	62
5. SONUÇ .....	65
ÖZET .....	67
SUMMARY .....	69
KAYNAKLAR .....	71
ÖZGEÇMİŞ .....	80
TEŞEKKÜR .....	81

## ÇİZELGELER

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1. <i>F. psychrophilum</i> 'un fenotipik karakterizasyonu	11
Çizelge 3.1. İzole edilen suşların fenotipik ve biyokimyasal test özellikleri	45
Çizelge 3.2. İzole edilen suşların API ZYM enzim test sonuçları	47
Çizelge 3.3. Gram negatif mikroorganizmalara ait standart zon çapları	49
Çizelge 3.4. Solungaçlar, iç organlar ve lezyonlu bölgeden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> suşlarının antibakteriyallere karşı direnç durumları	50
Çizelge 3.5. İzole edilen <i>F. psychrophilum</i> suşlarının antibakteriyallere karşı direnç durumlarının yüzde dağılımı	50
Çizelge 3.6. Gökkuşığı alabalık yavrularında antibiyotik uygulama sonrası şekillenen ölüm sayıları ve yüzde oranları	52



## ŞEKİLLER

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. RTFS enfeksiyonunda kullanılan bazı antibiyotiklerin kimyasal yapısı	25
Şekil 2.1. Yavruhane bölümünden bir görünüm	27
Şekil 2.2. Yavruhane bölümünden diğer bir görünüm	27
Şekil 3.1. Enfekte balıklarda gözlenen klinik bulgular	41
Şekil 3.2. Enfekte balıklarda gözlenen diğer klinik bulgular	41
Şekil 3.3. İnkübasyon sonucunda görülen sarı pigmentli koloniler	42
Şekil 3.4. <i>F. psychrophilum</i> etkenlerinin ışık mikroskopik görüntüsü	42
Şekil 3.5. Katalaz testinde meydana gelen gaz oluşumu	43
Şekil 3.6. Oksidaz test kitinde meydana gelen eflatun-mor renk oluşumu	43
Şekil 3.7. Solungaç, iç organlar ve lezyonlu bölgeden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> suşlarının yüzde dağılımı	44
Şekil 3.8. İzole edilen <i>F. psychrophilum</i> suşlarının Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre oluşan zon çapları	49
Şekil 3.9. Gökkuşuğu alabalık yavrularında antibiyotik uygulama sonrası şekillenen ölüm oranlarının zamana bağlı değişim grafiği	53

## 1. GİRİŞ

Balık ve diğer su ürünleri, yeryüzünde milyonlarca insanın beslenmesinde protein açığını kapatan önemli bir kaynak oluşturur. Ayrıca geçimlerini bu sektörden sağlayan insanlar için de ticari bir uğraşı alanı yaratır (Arda ve ark 2002).

Entansif olarak yapılan kültür balıkçılığında, balıkların birbiri ile çok yakın temasta bulunmaları ve su kalitesinin bozulması gibi nedenlere bağlı olarak, bazıları zoonoz olan enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz hastalıklar kolayca ortaya çıkabilmektedir. Dolayısıyla bu hastalıkların veteriner hekimler tarafından sağaltımı, balıkların sağlığı açısından önemli olduğu kadar, balıkların bulunduğu ekosistem ve insan sağlığı açısından da o derecede önemlidir (Arda ve ark 2002).

Denizler ve iç su kaynaklarımız da dahil ülkemizin toplam kullanılabilir su ürünleri potansiyeli yaklaşık 25 000 000 hektardır ve üretim miktarı dikkate alındığında iç su kaynaklarımızda alabalık, denizlerimizde ise çipura ve levrek yetiştiriciliği ilk sıralarda yer almaktadır. Ege Bölgesi, Doğu Karadeniz Bölgesi'nin ardından su ürünleri üretimi içerisinde ikinci sırada yer almaktadır. Alabalık üretimi, toplam su ürünleri üretimi içerisinde % 41,6'lık bir paya sahiptir. Alabalık deniz yetiştiriciliği üretimi 2004 yılında 1650 ton iken 2005 yılında 1250 tona düşmüş, alabalık iç su üretimi ise 2004 yılında 43 000 ton iken 2005 yılında 48 000 tona ulaşmıştır. Ülkemiz su ürünleri üretimi açısından Avrupa Birliği ülkeleri içerisinde yedinci sırada yer almaktadır. Ancak ülkemiz, su ürünleri konusunda büyük bir potansiyele sahip olmasına karşılı, su ürünlerinin ekonomiye olan katkısı çok düşüktür ve gayri safi yurtiçi hasılası içerisinde balıkçılık sektörü % 0,27'lik bir paya sahiptir (DPT 2001, TÜGEM 2005, Aydın ve ark 2006, DPT 2006).

Birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de balık ve aynı zamanda tavuk eti tüketimi, daha sağlıklı ve ucuz olmaları nedeniyle kırmızı ete tercih edilir bir duruma gelmiştir.

Balık etinde düşük miktarda bağdoku ve yağ bulunmaktadır. Başta alabalık gibi yağlı balıklar olmak üzere, balık etinde yüksek oranda (% 60-80) mono veya poli doymamış yağ asitleri bulunmaktadır. Balık etinin A ve D vitaminleri ile demir, fosfor ve kalsiyum bakımından da zengin olması besin değerini arttırmaktadır. Ayrıca balık etinde trombosit kümeleşmesini engelleyen tromboksan-A<sub>3</sub> (TxA<sub>3</sub>) ile omega-3 yağ asiti, kanın pıhtılaşmasını azaltmakta ve dolayısıyla insanlarda kalp-damar hastalıklarının oluşma riskini azaltmaktadır. Buna rağmen ülkemizde kişi başına tüketilen balık miktarı yılda ortalama 8,5 kg iken, bu oran Avrupa'da ortalama 22 kg, dünya ortalaması ise 14 kg'dır (DPT 2001, Arda ve ark 2002, Brown 2002).

Tez kapsamında yer alan *Flavobacterium psychrophilum* (*F. psychrophilum*)'un neden olduğu Yavru Gökkuşluğu Alabalığı Sendromu (Rainbow Trout Fry Syndrome, RTFS) günümüzde birçok ülkede yaygın olarak görülen enzootik bir hastalık olup, 0,2-5 g ağırlığındaki gökkuşluğu alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) yavruları hastalığa duyarlılık göstermektedir. Dünyanın birçok ülkesinde 1985 yılından beri gökkuşluğu alabalık yavrularında % 90'lara varan mortaliteyle kendini göstermektedir (Madsen ve ark 2005). Ülkemizde de Ege, Marmara, Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki gökkuşluğu alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerden de izole edilmiştir (Çağırğan ve ark 1997, Korun ve Timur 2001, Diler ve ark 2003, İspir ve ark 2004).

*F. psychrophilum* alabalıkların deri, mukoza, yüzgeç, solungaç, operkulum (solungaç kapakları) gibi yapıların doğal florasında bulunmaktadır (Nematollahi ve ark 2003). Çevresel faktörlerin (özellikle su sıcaklığının düşmesi, kalitesi düşük sular, m<sup>3</sup>'ye düşen balık sayındaki artış, kötü bakım-besleme gibi) değişmesiyle etkenin virulensi artmakta ve enfeksiyona neden olmaktadır. Etken temas ve su yoluyla balıklar arasında hızlı bir şekilde yayılarak (horizontal yol) bulaştığından gökkuşluğu alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde yaygın ölümlere ve sonuçta işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Cipriano ve Holt 2005).

Hastalığın kontrolünde etkin bir aşı uygulamasının olmaması ve bakteriyel bir hastalık olması nedeniyle antibiyotik ile sağaltımı ön plana çıkmaktadır. Ancak kültür balıkçılığında yaygın olarak görülen bakteriyel hastalıkların tanı ve sağaltımında etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılmadan, bilinçsiz ve yaygın bir şekilde antibiyotik kullanımı, dirençli suşlarının gelişmesine neden olmakta ve sonuçta hastalıkların sağaltımında güçlüklerle karşılaşmaktadır (Midtlyng 2002).

Farklı ülkelerden izole edilen *F. psychrophilum* suşları arasında proteolitik ve lipolitik enzim üretimi bakımından farklılıklar olduğundan, antibiyotik duyarlılıklarının da farklılıklar gösterebileceği bildirilmiştir (Madetoja ve ark 2001). Bu tez kapsamında ülkemizde kültür balıkçılığı yapılan işletmelerde yaygın olarak görülen ve ekonomik kayıplara neden olan *F. psychrophilum* suşunun izolasyonu ve identifikasyonu, antibakteriyel duyarlılığı ve etkili antibakteriyel ilaç/ilaçlarla sağaltım seçeneklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 1.1. Tanım

Su sıcaklığının özellikle 4-10 °C arasında seyrettiği dönemlerde ortaya çıkan RTFS başta gökkuşaağı alabalıkları olmak üzere diğer balık türlerinde de görülen, etiolojisinde *F. psychrophilum*'un rol oynadığı (Bruun ve ark 2003, Cipriano ve Holt 2005), deride gittikçe artan pigmentasyon, spiral tarzda yüzme, iştah kaybı, asites, ekzoftalmus, solungaçlar ve iç organlarda anemi, deride ülserasyon, pedunkul bölgede ülser ve nekroz odakları, vertebralarda deformasyonlar, dalak ve böbreklerde hipertrofi gibi bulgularla belirgin ve özellikle gökkuşaağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde ağır kayıplar sonucu büyük ekonomik kayıplara neden olan bakteriyel bir enfeksiyondur (Branson 1998, Bowser 1999, Ekman 2003, Shotts ve Starliper 2003, Nematollahi ve ark 2003, Cipriano ve Holt 2005).

### 1.2. Tarihçe

RTFS ilk olarak 1941-1960 yılları arasında, Amerika Birleşik Devletleri'nde, *Salmonidae* familyasında yer alan gökkuşaağı alabalıkları ve gümüş salmon balıklarında (*Oncorhynchus kisutch*) pedunkul ve kaudal yüzgeçlerde meydana gelen lezyonlar nedeniyle Pedunkul Hastalığı (Peduncle Diseases) olarak isimlendirilmiştir. Enfeksiyonun yüksek mortaliteyle seyrettiği ve bölgedeki su sıcaklığının 6-10 °C olduğu bildirilmiştir. Enfeksiyon düşük su sıcaklığına bağlı olarak meydana geldiğinden, hastalık Bakteriyel Soğuk Su Hastalığı (Bacterial Cold Water Disease) olarak literatürdeki yerini almıştır (Cipriano ve Holt 2005, LaFrentz ve Cain 2004). Hastalığın Amerika Birleşik Devletleri'nden sonra 1984-1986 yılları arasında Almanya'da görüldüğü rapor edilmiştir. Bundan sonra İngiltere, Fransa, Danimarka, İspanya, İtalya ve Finlandiya gibi Avrupa'nın

birçok ülkesinde gökkuşuğu alabalığı yavrularında yüksek mortaliteyle seyrettiği ve birçok işletmede büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Wiklund ve ark 1994, Branson 1998). Hastalık Avrupa'da gökkuşuğu alabalığı yavrularında ölümlere neden olduğundan Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS) olarak adlandırılmıştır (LaFrentz ve Cain 2004). Bakteriyel Soğuk Su Hastalığı ve RTFS enfeksiyonlarında görülen klinik bulguların benzer olmasıyla birlikte, enfeksiyona neden olan etkenlerin fenotipik özellikleri, *F. psychrophilum* referans suşunun (NCIMB 1947<sup>T</sup>) fenotipik özellikleri ile de benzerlik gösterdiği ifade edilmiştir (Lorenzen ve ark 1997).

Ülkemizde de 1993 yılından bu yana Ege, Marmara, Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki gökkuşuğu alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerden de etken izole edilmiştir (Çağırğan ve ark 1997, Korun ve Timur 2001, Diler ve ark 2003, İspir ve ark 2004, Didinen ve ark 2007).

### 1.3. Etiyoloji

Hastalığın etkeni *Myxobacterium* orjinli *F. psychrophilum*'dur. Sporsuz, kapsülsüz, flagellasız, aerobik veya fakültatif anaerobik, uçları yuvarlak ve ince uzun çomak şeklinde Gram negatif bir bakteridir. Süzülerek hareket etme yeteneğine sahip olan bakteri hücresi 0,3-0,75 µm çapında ve 1,25-6,25 µm uzunluğundadır (Bowser 1999, Erer 2002, Nematollahi ve ark 2003, LaFrentz ve Cain 2004).

Literatür bilgileri *F. psychrophilum*'un fenotipik sınıflandırılmasının, birçok kere gözden geçirilerek değiştirildiğini göstermektedir. Etken ilk olarak 1941-1960 yılları arasında, Amerika Birleşik Devletleri'nde izole edildiğinde *Myxobacterium* orjinli *Cytophaga psychrophila* olarak isimlendirilmiştir (Ekman 2003). Büyüme yeteneğine sahip olmadığından ve polisakkarid kompleksine indirgenmediğinden, *Cytophagaceae* ailesi, *Flexibacter* genusu ve *Cytophagales* türüne ait olarak sınıflandırılmış ve *Cytophaga psychrophila* olarak tanımlanmıştır (Cipriano ve Holt 2005).

Daha sonra yapılan araştırmalar sonucunda, *Flexibacter psychrophilus* olarak isimlendirilmiş ve filogenetik olarak *Cytophaga-Flexibacter-Flavobacterium* sınıfında yer aldığı belirtilmiştir. Fakat bu sınıflandırma da daha sonra uygun bulunmamış, hastalığa neden olan izolatların DNA yapısının *Flexibacter* genusundaki bakterilerden farklı olduğu,

fakat *Flavobacterium* genusundaki bakterilere benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Ekman 2003, Cipriano ve Holt 2005). Bernardet ve Kerouault (1989), etkenin süzülerek hareket etme yeteneğinin zayıf olduğunu ve bu özelliğinin diğer *Cytophagales* etkenleri ile karşılaştırıldığında önemli bir karakteristik bulgu olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra *Flavobacterium* genusu ile ilgili düzeltmeler yapılarak bakteriyel soğuk su hastalığı veya RTFS'ye neden olan tüm izolatlar *Flavobacterium psychophilum* olarak isimlendirilmiştir. Koneman ve ark (1997) *F. psychophilum* ile birlikte *F. columnare* ve *F. branchiophilum*'un *Flavobacteriaceae* ailesine ve *Flavobacterium* genusunda bulduklarını bildirmiştir.

#### 1.4. Epizootiyoloji

RTFS'nin epizootiyolojisinde su sıcaklığının 4-10 °C'ye kadar düşmesi önemli rol oynamaktadır. Hastalığın ılık suda şekillendiğine dair bilgiler mevcut olmamakla birlikte, mortalite oranı su sıcaklığının 15-18 °C'de seyretmesiyle azalmaktadır (Nematollahi ve ark 2003, LaFrentz ve Cain 2004, Cipriano ve Holt 2005). Enfeksiyonun 0,5-5,0 g'lık balıklarda, 10 °C'nin altındaki su sıcaklığında ve yaklaşık olarak balık yemlemeye başladıktan beş hafta sonra görüldüğü bildirilmiştir (Cipriano ve Holt 2005). Decostere ve ark (2001), yaptıkları çalışmada *F. psychrophilum*'un genç gökkuşacağı alabalıklarında mortalite oranını arttırdığını, klinik bulguların ve mortalitenin 1 g'lık balıklarda (10 haftalık) görüldüğünü, 25 g'lık (20 haftalık) ve 300 g'lık (15 aylık) balıklarda görülmediğini vurgulamışlardır.

Etken coğrafik olarak Kuzey Amerika'da yaygınlık göstermektedir. Ancak günümüzde tatlı su kültür balığı yetiştiriciliği yapılan tüm yerlerde ortaya çıkmaktadır. Etkenin Fransa, Almanya, Danimarka, İngiltere, İspanya, İtalya, Finlandiya, Belçika gibi Avrupa ülkeleri ile Japonya, Avustralya, Şile ve Kore'de izole edildiği rapor edilmiştir. Özellikle gökkuşacağı alabalıkları ve gümüş salmon balıkları başta olmak üzere, etkene bütün salmon balığı türleri duyarlılık göstermektedir. Hastalığın rapor edildiği diğer salmon balığı türleri kızıl (sokeye) salmon balığı (*Oncorhynchus nerka*), kral salmon balığı (*Oncorhynchus tshawytscha*), köpek salmon balığı (*Oncorhynchus keta*), masu salmon balığı (*Oncorhynchus masou*), göl alası (*Salvelinus namaycush*), kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*), cutthroat alabalığı (*Oncorhynchus clarki*), amago salmon balığı

(*Oncorhynchus rhodurus*), somon-atlantik salmon balığı (*Salmo salar*), deniz alası (*Salmo trutta*) ve alp alası (*Salvelinus alpinus*)'dır (Nematollahi ve ark 2003, Ekman 2003, LaFrentz ve Cain 2004, Cipriano ve Holt 2005).

Etkenin enfeksiyona neden olduğu diğer balık türleri ise avrupa yılan balığı (*Anguilla anguilla*), sazan (*Cyprinus carpio*), havuz balığı (*Carassius carassius*), kadife balığı (*Tinca tinca*), ayu balığı (*Plecoglossus altivelis*), tatlı su levreği (*Perca fluviatilis*) ve kızılöz balığı (*Rutilus rutilus*)'dır. Bu bulgular birçok balık türünün taşıyıcı olduğunu göstermektedir (Nematollahi ve ark 2003, Ekman 2003, LaFrentz ve Cain 2004, Cipriano ve Holt 2005). Etkenin son yapılan bir araştırmada bofa (deniz taş-emeni) balığından (*Petromyzon marinus*) izole edildiği rapor edilmiştir (Elsayed ve ark 2006).

Hastalık bazı salmon balığı türlerinde diğer bakteriyel, viral veya paraziter balık patojenleri ile birlikte görülebilmektedir. Furunkulozise neden olan *Aeromonas salmonicida* (*A. salmonicida*) RTFS ile birlikte görülebilen bakteriyel bir enfeksiyondur. RTFS ile birlikte görülebilen viral enfeksiyonlar ise enfeksiyöz pankreatik nekrozis (Infectious Pancreatic Necrosis, IPN) ve enfeksiyöz hematopietik nekrozis (Infectious Hematopietic Necrosis, IHN)'dir. Ayrıca heksamita hastalığına neden olan *Hexamita salmonis* ve kostiazis hastalığına neden olan *Costia necatrix* (*Ichthyobodo*) ile *Gyrodactylus derjavi* ektoparazitinin gökkuşağı alabalıklarında RTFS ile birlikte miks enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmiştir (Cipriano ve Holt 2005).

### 1.5. Patogenezis

Etken dokularda hasara yol açabilecek kadar yüksek proteolitik enzim üretimine sahiptir ve etkenin virulensi ekzotoksin, endotoksin, adezyon (yapışma) ve proteaz aktivitesine bağlıdır (Ekman 2003). Çevresel faktörlerde meydana gelen değişim *F. psychrophilum*'un proteolitik aktivitesini arttırmaktadır (Nematollahi ve ark 2003).

Etken proteolitik enzimler ile lipaz ve nükleaz gibi ekstrasellüler enzimler salgılayarak konakçının hücrelerinde lizise neden olur. Bu özellikler diğer bakteriyel balık patojenlerine göre *F. psychrophilum*'un patojenitesini artırır (Nematollahi ve ark 2003).

Ekstrasellüler proteazlar etkenin patojenitesini etkilemekte ve kas dokudaki elastin miktarını azaltmaktadır. Balıkların deneysel olarak *F. psychrophilum* ile enfekte edildiği

bir çalışmada, ekstrasellüler sıvıda 55 kilodalton (kDa) psikrofilik metalloproteaz (Fpp1) aktivitesine bakılmıştır. Metalloproteaz enzimi jelatin, laminin, fibrinektin, fibrinojen, kollojen ve kollojen tip IV'ü parçalamaktadır. Dolayısıyla kaslardaki aktin ve miyozin aktivitesini engellemekte ve sonuçta etkenin patojenitesini arttırmaktadır (Cipriano ve Holt 2005).

Adezyon, etkenin konakçı hücre ve dokuya invazyonunu arttırmaktadır. Etkenin fimbria gibi hareket organellerinin olmadığı fakat ekstrasellüler polisakkarid bir tabakanın var olduğu ve bu yapının hareket etme ve konakçı hücreye adezyonda görev aldığı bildirilmiştir (Ekman 2003, Nematollahi ve ark 2003, Cipriano ve Holt 2005). Kondo ve ark (2002), *F. psychrophilum*'un 24 saat içinde özellikle balıkların kaudal pedunkul ve çene altı dokusuna yerleşim gösterdiğini belirtmişlerdir.

Plazmid varlığı etkenin hastalık yapabilme yeteneğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, izole edilen *F. psychrophilum* suşuna ait plazmid büyüklüğünün 2,9 kilobyte (kb) olduğu ve NCIMB 1947<sup>T</sup> suşuna benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Nematollahi ve ark 2003). Ancak Madsen ve Dalsgaard (2000), etkene ait plazmid büyüklüğünün 3,3 kb olduğunu ve plazmid varlığı ile etkenin virulensi arasında bir ilişki olmadığını ifade etmişlerdir.

Etkenin ozmotik değişime karşı oldukça duyarlı olduğu, ancak nehir suyundan ve nehir kenarındaki kayalarda bulunan alglerden de izole edildiği bildirilmiştir. Ayrıca sterilize edilmiş 15 °C'lik su sıcaklığında da canlılığını koruduğu rapor edilmiştir (Cipriano ve Holt 2005). *F. psychrophilum*'un sekiz aydan daha fazla bir süre virulensini koruduğu, uygun koşullarda liyofilize edilerek veya (-) 80 °C'de dondurularak daha uzun süre saklanabildiği ifade edilmiştir (Michel ve Garcia 2003).

## **1.6. Bulaşma**

Etken alabalıkların deri ve solungaçlarına ait aerobik floranın bir kısmını oluşturmakta ve aynı zamanda yüzgeç, solungaç ve operkulum bağ dokusunda doğal olarak bulunmaktadır. Doğal yolla *F. psychrophilum* ile enfekte olmuş gökkuşuğu alabalık yavrularının mide lumeni ve mukozasında da etkene rastlandığı ve etkenin gastro-intestinal sistem aracılığıyla da bulaşabildiği belirtilmiştir (Nematollahi ve ark 2003).



Enfeksiyonun diğerk bir bulaşma yolu da, etkenin enfekte balıklardan yumurtalara geçmesidir (vertikal veya transovairan yol). Mortalite oranını artıran bu bulaşma yolunda etkenin ovarial akıntı, balık sperması ve döllenmiş yumurtanın dış tarafından izole edildiği bildirilmiştir (Dalsgaard ve Madsen 2006). Taşıyıcı (portör) balıkların yumurtları döllemesi sonucunda yumurta kalitesinde düşme ve ilerleyen dönemlerde yavrularda enfeksiyon şekillenebilmektedir. Bu yüzden taşıyıcı damızlık dişi ve erkeklerden elde edilen yumurtalar veya spermalar da enfeksiyonun oluşumunda rol oynamaktadır (Rangdale ve ark 1996, Atlantik Salmon Federation 1999, Nematollahi ve ark 2003). Etken vitellus kesesinde inkübasyonunu tamamlayarak yumurtaların yaşama şansını azaltır ve intraovum enfeksiyona neden olur. Bu yüzden kontamine olmuş balık yumurtalarına iyot solüsyonlarının etki etmediği bildirilmiştir (Cipriano ve Holt 2005).

## **1.7. Bulgular**

### **1.7.1. Makroskobik Bulgular**

Enfeksiyondan etkilenen balıklarda iştahsızlık, g ve denge kaybı, letarji, havuzun tabanına doğru spiral tarzda ve su yüzeyinde yüzme, bilateral ekzoftalmus ve asitese bağlı abdomende şişkinlik görülür (Ostland ve ark 1997, Branson 1998).

Enfekte gökkuşağı alabalık yavrularının sırt yüzgeci ve kuyruk yüzgecinde beyaz renklenmelerin şekillendiği, beyaz renklenmelerin daha sonra kendini nekroz odaklarına bıraktığı, ilerleyen dönemlerde bölgede şekillenen nekroz odaklarından kas dokusuna kadar yayılan dejenerasyonların oluştuğu ve dejenerasyonların vertebral kolonu da etkileyecek derecede ilerlediği belirtilmiştir (Erer 2002, Ekman 2003, Timur ve ark 2004).

Madsen ve ark (2001) tarafından etkenin spinal deformasyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Spinal kolondaki deformasyonların nedeni burada meydana gelen küçük ve sert yapıdaki kistik oluşumların kaudal vertebraya baskı yapmalarıdır.

Enfekte balıklarda beyin normal anatomik yapısından daha küçük olup baş bölgesindeki kıkırdaklarda lizis görülür (Ostland ve ark 1997). LaFrentz ve Cain (2004) meningeitise bağlı olarak spiral tarzda yüzme hareketlerinin var olduğunu bildirmişlerdir.

Etken solungaç yüzeyinde veya plaklarında bulunmamasına rağmen solungaç kapillar damarlarında bulunmaktadır. Akut septisemi olgularında etken yoğun miktarda vasküler dokudan da izole edilebilmektedir. Solungaç yayları ve sekonder lamellalarda etkene rastlanabilmektedir. Tipik olmayan durumlarda solungaç yüzeyindeki etkenin solungaç filamentlerine kadar ilerlediği bildirilmiştir (Cipriano ve Holt 2005).

Enfekte balıkların dalak, karaciğer, bağırsak, hava kesesi, periton ve kalp gibi iç organlarında septisemi görülür (LaFrentz ve Cain 2004). Solungaç, karaciğer ve böbrekler anemiktir ve splenomegali görülür. Böbrekler hafif şişkin olup, böbrek glomerülleri ve kapillarlarında meydana gelen nekroz, böbrek fonksiyonunda bozukluklara neden olmaktadır. Bağırsaklar konjesyonludur ve çevresi sarı-beyaz renktedir. Etken kalp kasında da yerleşim göstererek, burada yangıya ve sonuçta ölüme neden olabilmektedir (Nematollahi ve ark 2003, Branson 1998).

### **1.7.2. Mikroskopik Bulgular**

Deride kas dokusuna kadar ilerleyen nekrotik lezyonlarla birlikte lenfosit infiltrasyonunun şekillendiği ve aynı bulguların 10 g'lık gökkuşağı alabalıklarında da olduğu bildirilmiştir. Karaciğerin bazen beyazımsı bir renk aldığı, hepatosit ve eozinofillerde vasküler dejenerasyonla birlikte nekroz odaklarının şekillendiği ayrıca hemosiderin miktarında artış olduğu belirtilmiştir (LaFrentz ve Cain 2004, Cipriano ve Holt 2005).

Timur ve ark (2004), hastalıklı gökkuşağı alabalık yavrularında böbreklerde tubuler nekroz ve dalağın beyaz pulpa hücrelerinde azalma olduğunu, Korun ve Timur (2001) ise, dorsal yüzgeç bölgesinde ülseratif nekroz ile nekrotik kas hücreleri arasında sellüler infiltrasyon ve böbreğin haemopoietik dokusunda azalma olduğunu ifade etmişlerdir.

Enfekte balıklarda dalak kapsülü zarar görmüş olup, asiner hücrelerce zengindir. Etkilenen yerlerde eozinofilik hücreler, eritrositler, fibrin, intrasellüler ödem, makrofaj ve çok sayıda etkenin varlığına rastlanmaktadır. Konjesyonla birlikte dalak zarında vakuol oluşumu gözlenmektedir. Dalaktaki bu değişikliklerin patognomonik olduğu belirtilmektedir (Branson 1998, Rangdale ve ark 1999).

İntrasellüler bir etken olan *F. psychrophilum*, yavru alabalıkların dalak dokusundaki fagositlerinde görülürken, ergin balıkların dalak dokusundaki fagositlerinde görülmemektedir (Docostere ve ark 2001, Cipriano ve Holt 2005).

Enfeksiyonun şekillendiği gökkuşağı alabalıklarında gözün retina katmanına yerleşen etkenin, burada ve koroid bezinde (*glandula choroidae*) polimorfik granülosit artışına ve görme bozukluğuna neden oluşu ifade edilmiştir (Evensen ve Lorenzen 1996). Doğal yolla *F. psychrophilum* ile enfekte olmuş gökkuşağı alabalığı ve atlantik salmon balığı yavrularında, etkenin intraokular hemoraji ve nekrotik skleritise neden olduğu belirtilmiştir (Ostland ve ark 1997).

### 1.8. Tanı

Tanı hastalığın sağaltımı yönünden oldukça önemlidir. *F. psychrophilum*, izolasyonu ve identifikasyonu en zor olan bakterilerden biridir (Lorenzen ve ark 1997). Etkenin tanısında genellikle morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin ortaya konulduğu mikrobiyolojik izolasyon ve identifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bunun dışında *F. psychrophilum* antiserumunun kullanıldığı aglütinasyon testi, moleküler yöntem olan polymerase chain reaction (PCR) ile enzyme-liked immunosorbent assay (ELISA) ve immunfluorescence antibody technique (IFAT) gibi serolojik yöntemler de tanı amacıyla kullanılmaktadır (Dalsgaard 2000, Madetoja ve Wiklund 2002, Ekman 2003, Nematollahi ve ark 2003, Cipriano ve Holt 2005). Ayrıca etkenin identifikasyonunda API ZYM enzim test kitleri de kullanılabilir (Patricio ve ark 1995, Ostland ve ark 1997, Madetoja ve ark 2001, Didinen ve ark 2007)

Mikrobiyolojik etken izolasyonu ve identifikasyonunda spesifik besiyeri olarak *Cytophaga* agar kullanılmaktadır (Wiklund ve ark 1994, Evensen ve Lorenzen 1996, Daskalov ve ark 1999, Dalgaard 2001, Shotts ve Starliper 2003). *Cytophaga* agar besiyeri, Anacker Ordal agar besiyeri olarak da tanımlanmaktadır (Cipriano ve Holt 2005). Dalsgaard (2001), *Flavobacterium* suşlarının spesifik besiyerine ihtiyaç duyduğunu bildirmiştir. Bruun ve ark (2000), *F. psychrophilum*'un izolasyonunda Mueller-Hinton agarın da kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

İzolasyon genellikle dalak, böbrek ve zarar görmüş ise beyinden yapılmaktadır. Ancak etkenin karaciğer ve kalpte de yerleşim gösterdiği rapor edilmiştir. Etkenin inkübasyon süresi 48-96 saat ve inkübasyon derecesi 15-20 °C'dir. Gram negatif bir bakteri olup, 0,3-0,75 µm çapında ve 1,25-6,25 µm uzunluğundadır. Katı besiyerinde açık sarı parlak, konveks, ince, yaygın ve sınırları belli belirsiz koloniler oluşturur. Bu koloniler “tavada pişmiş yumurta” görünümünü andırır. Etkenin fenotipik karakterizasyonu Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir (Wiklund ve ark 1994, Lorenzen ve ark 1997, Bowser 1999, Dalsgaard ve Madsen 2000, Korun ve Timur 2001, Nematollahi ve ark 2003, Diler ve ark 2003, İspir ve ark 2004, Cipriano ve Holt 2005).

Çizelge 1.1. *F. psychrophilum*'un fenotipik karakterizasyonu.

Test	Sonuç	Test	Sonuç
Albümin sindirimi	pozitif	Metil kırmızısı-voges Proskauer	negatif
Tributrin hidrolizi	pozitif	ONPG testi	negatif
<i>E. coli</i> otolizi	pozitif	Kongo kırmızısı testi	negatif
Kitin hidrolizi	negatif	Üre hidrolizi (ürez)	negatif
Agar hidrolizi	negatif	Nitrat redüksiyonu	negatif
Kazein hidrolizi	pozitif	Jelatin hidrolizi	pozitif
Nişasta hidrolizi	negatif	Fleksirubin pigment	pozitif
Ksantin hidrolizi	negatif	Simmons sitrat kullanımı	negatif
Sukroz	negatif	Süzülerek hareket etme	zayıf pozitif
Galaktoz	negatif	Tirozin agarda pigment	negatif
Arabinoz	negatif	Mueller-Hinton agarda üreme	pozitif
Sorbitol	negatif	TYE agarda üreme	pozitif
Lizin	negatif	TYES agarda üreme	pozitif
Ornitin dekarboksilaz	negatif	TSA'da üreme	pozitif/negatif
Tirozin hidrolizi	pozitif/negatif	Kanlı agar	pozitif/negatif
Selluloz dekompozisyonu	negatif	Vibriostat O/129	negatif
Glukoz oksidasyonu	negatif	5 °C'de üreme	pozitif
Sellobioz oksidasyonu	negatif	15 °C'de üreme	pozitif
Glukoz fermentasyonu	negatif	20 °C'de üreme	pozitif
Laktoz fermentasyonu	negatif	25 °C'de üreme	pozitif/negatif
Mannitol fermentasyonu	negatif	30 °C'de üreme	negatif
Sellobioz fermentasyonu	negatif	37 °C'de üreme	negatif
Katalaz	zayıf pozitif	% 0,0 NaCl'de üreme	pozitif
Hidrojen sülfür	negatif	% 0,5 NaCl'de üreme	pozitif
Sitokrom oksidaz	zayıf pozitif	% 1,0 NaCl'de üreme	pozitif/negatif
İndol (TSIA'da)	negatif*	% 2,0 NaCl'de üreme	pozitif/negatif

\* Seyrek olarak üreme şekillenebilir.

Oligonükleotid primerler ile termostabil polimerazın eşleştirilerek hedef DNA dizilimine aktarılmasıyla (amplifikasyon), etkenin PCR ile analiz edildiği rapor edilmiştir. *F. psychrophilum*'un moleküler tanısında PSY1 ve PSY2 veya FP1 ve FP2 primerleri kullanılarak spesifik 16S ribozomal RNA gen dizilimine aktarılırlar. Svedberg (=S) ünitesi bir maddenin ultrasantrifüjde çökme hızı olarak tanımlanır. DNA çift sarmalının oluşumunda rol oynayan *gyrB* geninin sıralanmasından sonra, yüksek nükleotidli 16S rekombinant DNA oluşumu için, PSY-G1F ve PSY-G1R primerlerinin geliştirildiği bildirilmiştir. Subklinik enfeksiyonların PCR ile teşhisinde kullanılan iki universal primerlerden 20F ve 1500R, PCR'ın birinci basamağını oluştururken, PSY1 ve PSY2 primerleri PCR'ın ikinci basamağını oluşturmaktadır. Bu yöntem diğer kültür veya indirect immunofluorescence assay (IFA) yöntemlerine göre su örneklerindeki *F. psychrophilum*'un belirlenmesinde daha etkilidir. Multipleks PCR yöntemiyle, *F. psychrophilum* ile birlikte diğer bakteriyel balık patojenlerinden *A. salmonicida* ve *Yersinia ruckeri*'nin de identifiye edildiği bildirilmiştir (Cipriano ve Holt 2005).

IFA yöntemi hastalıklı balıkların dalağında bulunan etkenin belirlenmesinde etkili bir yöntemdir. Ancak *F. psychrophilum* ile birlikte *F. columnare*'nin absorpsiyonuna veya ortaya çıkabilecek çapraz reaksiyonlara dikkat edilmesi gerektiği ifade edilmektedir (Cipriano ve Holt 2005).

### 1.9. Seroloji

Farklı *F. psychrophilum* suşlarının ortak bir antijenik yapıya sahip olduğu bildirilmiştir. İlk kez Holt'un Amerika Birleşik Devletleri'nde iki ayrı serotip izole ettiği, daha sonra Wakabayashi ve ark ile Izumi ve Wakabayashi'nin Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde O-1, O-2 ve O-3 olmak üzere üç ayrı serotip izole ettikleri rapor edilmiştir. NCMB 1947<sup>T</sup> referans suşu O-1 serotipinin bir üyesi olup, bu üç serotip sırasıyla gümüş salmon balığı, ayu balığı ve gökkuşacağı alabalığından izole edilmiştir. Lorenzen ve Olesen'in ise, Th (alt serotipleri Th-1 ve Th-2'dir), Fd ve Fp<sup>T</sup> olarak isimlendirdikleri üç farklı serotip identifiye ettikleri rapor edilmiştir. Fp<sup>T</sup> serotipi balıklarda enfeksiyona yol açmakta ve gökkuşacağı alabalığı dışındaki balıklardan da izole edilebilmektedir (Ekman 2003, Cipriano ve Holt 2005). Dalsgaard ve Madsen (2000) Danimarka'da gökkuşacağı alabalığı yavrularında Th ve Fd serotipinin enfeksiyona yol

açtığını rapor etmişlerdir. Ancak gökkuşuğu alabalıklarında en çok enfeksiyona yol açan Th serotipinin olduğu belirtilmiştir. Mata ve ark ise, daha geniş bir serolojik analiz ile *F. psychrophilum*'un yedi ayrı serotipini (1: salmon; 2a: alabalık; 2b: alabalık; 3: alabalık; 4: avrupa yılan balığı; 5: sazan; 6: kadife balığı ve 7: ayu balığı) izole ettiklerini ifade etmişlerdir (Ekman 2003, Cipriano ve Holt 2005).

### **1.10. Aşılama**

Diğer bakteriyel balık patojenleri ile kıyaslandığında, *F. psychrophilum* ile ilgili olarak spesifik antijen immunitesi ve deneysel aşı geliştirme bilgilerinin yetersiz kaldığı bildirilmiştir. Balık serumundaki komplement sistem humoral savunmada rol oynamasına rağmen, *F. psychrophilum* ile doğal enfekte olmuş gökkuşuğu alabalık yavrularında etkene yanıtın yetersiz kaldığı ifade edilmiştir (Nematollahi ve ark 2003, Ekman 2003, Cipriano ve Holt 2005).

Dalsgaard (2000), biri periton içi ve diğeri de banyo tarzında olmak üzere aşılama çalışması gerçekleştirilmiştir. Periton içi aşılama ile alınan immun yanıtın banyo tarzında yapılan aşılama göre daha zayıf olduğu saptanmış fakat kesin sonuçlar elde edilememiştir. İmmunstimulan yemlemenin de non-spesifik immun sisteme etki etmediği belirtilmiştir.

Etkenin özellikle gökkuşuğu alabalık yavrularında bağışıklık sistemini baskı altına alarak enfeksiyona yol açtığı bilinmektedir. Etkene yönelik lisanslı aşı bulunmamaktadır. Deneysel olarak periton içine uygulanan bakterin aşılarının, yavrularda bağışıklık sağlamadığı belirtilmiştir (Nematollahi ve ark 2003, Ekman 2003, Cipriano ve Holt 2005).

Son yapılan bir çalışmada formalin veya yüksek sıcaklıkta inaktive edilmiş *F. psychrophilum* içeren mineral yağlı aşının deri mukozası ve plazmada antikor titresini yükselttiği rapor edilmiştir (Madetoja ve ark 2006).

### **1.11. Koruma ve Kontrol**

Kültür balıkçılığında meydana gelen bir hastalık çok kısa zamanda diğer balıklara bulaşıp yayılarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır. RTFS enfeksiyonunda su

sıcaklığının 4-10 °C arasında seyretmesi hastalığı tetiklediğinden ve *F. psychrophilum* doğal bir bakteriyel balık patojeni olduğundan enfeksiyonun önlenmesi güçtür. Bu yüzden stres faktörlerinin azaltılması enfeksiyonunun önlenmesinde önemli rol oynar (Dalsgaard ve Madsen 2000, Erer 2002, Nematollahi ve ark 2003).

Elle yakalama, az yemleme, havuz veya su değişikliği, havuzlar arası aktarmayı yavaş yapma, keseli yavrularda mekanik hasara yol açabilecek ağların kullanımı gibi stres faktörlerinden kaçınılmalıdır. Ayrıca yaşa göre sınıflandırma yapılmalı, havuz hacmine, su sıcaklığına ve su değişimine göre m<sup>3</sup>'e düşen balık miktarı ayarlanmalıdır (Robert ve Shepherd 2001, Branson 1998). Nematollahi ve ark (2003), *F. psychrophilum*'un gökkuşağı alabalıklarında solungaç dokusuna adezyonunda, sudaki yüksek nitrit veya organik madde varlığının etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu yüzden sudaki nitrit miktarı 0,2 mg/l, nitrat miktarı ise 10 mg/l'ye kadar olmalıdır (Robert ve Shepherd 2001).

Su sıcaklığı ile değişmekle beraber sudaki oksijen (O<sub>2</sub>) miktarı 10-15 °C'de 6,4-7,9 mg/l arasında olmalıdır. Çünkü sudaki oksijen azlığı ölümlere, fazlalığı gaz embolilerine neden olur. Ortamın sıcaklığı arttıkça oksijenin erime oranı da artmaktadır. Suyun pH'sı ise 6,5-8,5 arasında olmalıdır (Erer 2002). Suyun kirliliği, suda bulunan mikroorganizmaların organik maddeleri ayrıştırarak hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) oluşturmalarına neden olur. H<sub>2</sub>S miktarının litrede 1 mg'ı aşması ölümlere neden olmaktadır. Fazla yem dibe çökerek mantarların (*Saprolegnia spp.*) üremesine sonuçta hastalıkların ortaya çıkmasına neden olacağından fazla yemleme yapılmamalıdır (Robert ve Shepherd 2001, Erer 2002).

Havuzlar stoklama yapılmadan önce ortalama bir ay boş bir şekilde kurumaya bırakılmalıdır. Havuzlar ve kafesler üzerinde önemli bir dezenfektan etkiye sahip güneş ışınları bu amaçla kullanılabilir. Ayrıca dezenfeksiyon amacıyla sönmemiş kireç (kalsiyum oksid, 0,5 kg/m<sup>2</sup>), kalsiyum siyanamid (1 kg/m<sup>2</sup>) veya potasyum permanganat (10-30 mg/l) kullanılabilir (Robert ve Shepherd 2001).

Balık yumurtaları yetkili bir laboratuvar yazısı ile sertifikalandırılmış çiftliklerden temin edilmelidir. Yumurtalar satın alınan çiftliğe getirilmeden önce dezenfekte edilmelidir. Bu amaçla sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) ile nötrale edilmiş %1'lik iyonofor solüsyonu içerisinde 10 dakika süre ile dezenfeksiyon sağlanabilir (Robert ve Shepherd 2001).

Yumurtaların iyodofor solüsyonlarıyla dezenfeksiyonu enfeksiyonun bulaşma riskini azaltmaktadır. Yüzeysel dezenfeksiyonlarda iyot solüsyonları 50 mg/l dozda ve 30 dakika süreyle veya 100 mg/l dozda ve 10 dakika süreyle uygulanmaktadırlar (LaFrentz ve Cain 2004). Ancak etkenin perivitellus boşluğuna yerleşmesi iyodofor defenfektanların etkisini azaltır (Cipriano ve Holt 2005). Branson (1998) ile Cipriano ve Holt (2005), yumurtaların dezenfeksiyonunda hidrojen peroksitin 100 mg/l dozda ve 10 dakika süreyle veya glutraldehitin 200 mg/l dozda ve 20 dakika süreyle başarılı bir şekilde kullanıldığını bildirmişlerdir.

Kuluçkahanelerde bulunan taşıyıcı balıklar enfeksiyonun yayılmasında önemli rol oynarlar (Cipriano ve Holt 2005). Bu yüzden hasta, taşıyıcı ve latent enfekte balıklar ile sağlıklı balıklar arasındaki ilişki kesilmelidir. Hastalık çıkan işletmelerde suyun, kuluçkahanelerin ve havuzların temizliği ve bakımı yapılmalı, hasta balıklar ayrılmalı ve kullanılan malzemeler kontrol edilmelidir (Erer 2002). Dalsgaard ve Madsen (2000), herhangi bir klinik belirti göstermeyen gökkuşuğu alabalığı yavrularından *F. psychrophilum* izole etmişler, hastalık öncesi ve sonrasında da balıkların taşıyıcı olduğunu bildirmişlerdir.

Araç ve gereçlerin dezenfeksiyonunda % 1-2'lik formalin 10 dakika süreyle, % 0,5-1'lik klor 2 dakika süreyle veya pH'sı 13 olan alkali bileşikler 2 dakika süreyle kullanılabilir (Branson 1998).

Eksternal bakteriyel balık patojenlerinin sağaltımında banyo solüsyonlarına katılan ayrıca Gıda ve İlaç Dairesi Merkezi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanan sodyum klorür (NaCl) etkilidir. Bu amaçla % 3'lük NaCl 10-30 dakika süreyle uygulanabilmektedir (LaFrentz ve Cain 2004).

### **1.12. Sağaltım**

RTFS enfeksiyonu da dahil diğer bakteriyel balık hastalıklarında, birçok antibiyotiğin tek başına veya kombine edilerek kullanılması ve bunların hastalıkların kesin teşhisi yani etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılmadan bilinçsizce ve yaygın bir şekilde kullanılması dirençli bakteri suşlarının gelişmesine (Bowser 1999, Midtlyng 2002) ve kullanımını takiben yasal bekletme sürelerine tam olarak uyulmaması sonucu



balık ve diğere su ürünlerinde kalıntıya neden olduğu vurgulanmaktadır (Björklund ve ark 1990, Tarım ve Köyüşleri Bakanlığı 2003).

Hayvanlarda kullanılan ilaçlar konusunda tüm ülkelerin dikkate aldığı bir birim olan FDA'nın balıklarda kullanılmak üzere onayladığı çok az sayıda antibiyotik bulunmaktadır. Bu bağlamda antibiyotiklerin kullanıldığı balık türleri, hastalıklar, sağaltım dozları ve aralığı ile kalıntı bırakabilme sürelerinin belirtilmesi, insan sağlığı açısından da büyük önem taşımaktadır. FDA'nın balık hastalıklarında onay verdiği başlıca antibiyotikler; penisilinler, oksitetrasiklin, sülfadimetoksin-ormetoprim, sülfamerazin ve sülfadiazin-ormetoprimdir. Ancak farklı ülkelerde bakteriyel balık hastalıklarında bunlara ek olarak kullanılmasına izin verilen antibiyotikler de (florfenikol, kloramfenikol, sarafloksasin, eritromisin, ampisilin gibi) bulunmaktadır (Schnick ve ark 1997, Griffith 1999, Wildish ve ark 2004, Serrano 2005, Storey 2005, Yanong 2006).

#### **1.12.1. RTFS Enfeksiyonunda Kullanılan Antibiyotikler**

Bakteriyel bir enfeksiyon olması nedeniyle, RTFS'nin sağaltımında en etkili ve en çok kullanılan ilaçlar antibiyotiklerdir. Fakat sağaltımdan önce antibiyogram testlerinin yapılması zorunludur (Kaya 2002, Nematollahi ve ark 2003). Çünkü etken antibiyotiklerin çoğuna direnç göstermektedir ve dirençlilik coğrafik bölgelere göre değişmekle birlikte, beklenmedik zaman ve koşullarda ortaya çıkabilmektedir. Hastalığın sağaltımında çeşitli ülkelerde onaylanmış lisanslı antibiyotik uygulamalarının yapıldığı rapor edilmiştir. Diğer antibiyotik uygulamalarında olduğu gibi RTFS'nin sağaltımında da uygulanacak antibiyotiklerin veteriner hekim gözetiminde olması gerekmektedir (LaFrentz ve Cain 2004, Cipriano ve Holt 2005).

Yeme antibiyotik katılması en sık kullanılan ilaçlama yöntemidir (Ekman 2003). Ancak oral antibiyotik uygulamasının hastalığın sağaltımında tam olarak etki sağlayamadığı, bunun da nedeninin yavru balıkların havuzlara konulduktan birkaç hafta sonra veya yemlemeye başladıktan sonra birçok patojen balık bakterisinin ortama katılması olduğu ifade edilmiştir. Su sıcaklığının düşmesi sağaltım başarısını azalttığından, sağaltımın tekrarlanması veya balıklardaki sağaltıcı dozun yakalanması gerekmektedir. Sağaltım süresince balıklar gözlenmeli ve yemi red eden veya iştahsız olan balıklar varsa sağaltım yenilenmelidir (Cipriano ve Holt 2005).

Etken sülfadiazin-trimetoprim doğal dirençli olmakla birlikte, oksitetrasiklin, doksisisiklin, amoksisilin, oksolinik asit, fosfomisin, penisilin, gentamisin, kloramfenkol, polimiksin B ve neomisine sonradan direnç kazanmıştır. Etkenin duyarlı olduğu ve bazıları yeni olan antibiyotikler ise enrofloksasin, sarafloksasin ve florfenikoldür. Ancak bu antibiyotiklere karşı da zaman zaman dirençlilik durumuyla karşılaşılabilir (Rangdale ve ark 1997, Dasgaard ve Madsen 2000, Bruun ve ark 2000, Ekman 2003, Nematollahi ve ark 2003, Michel ve ark 2003).

Antibiyotik kullanımıyla birlikte banyo tarzında kuarterner amonyum bileşikleri (2 mg/l), potasyum permanganat (2 mg/l), kloramin-T veya sodyum klorür ile yapılan sağaltımın hastalığı ılımlı bir şekilde baskıladığı bildirilmiştir (Ekman 2003). Ancak etken sistemik enfeksiyonlara yol açtığından kimyasal banyo uygulamalarına sınırlama getirilmiştir (Cipriano ve Holt 2005).

#### **1.12.1.1. Beta-laktamlar**

Beta-laktam antibiyotikler 1990'lı yıllardan beri balık yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır. Bu grupta yer alan antibiyotikler bakterilerde hücre duvarının sentezini engelleyerek etki gösterirler. Dokulara hızlı bir şekilde yayılırlar ve vücuttan çabuk bir şekilde atılırlar (Kaya 2002).

Literatür bilgileri RTFS'nin sağaltımında beta-laktam antibiyotiklerden amoksisilinin kullanıldığını göstermektedir. Su ürünlerinde kalıntı kontrolü yapılacak antibiyotikler içerisinde yer alan amoksisilin genişçe etki spektrumludur ve kimyasal formülü  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  (Şekil 1.1.)'dir. Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmalara karşı bakterisid etkilidir (Kaya 2002, TKB 2003).

Diğer memeli hayvanlara göre amoksisilin balıkların intestinal sisteminden daha zor emilir. Bu yüzden etkili kan yoğunluğunun sağlanabilmesi için, diğer memeli hayvanlara uygulanan dozdan 2-5 kat daha fazla uygulanır. Amoksisilin bu amaçla 80 mg/kg dozda oral yolla uygulanarak kullanılır. (Burka ve ark 1997, Arda ve ark 2002, Storey 2005). Branson (1998), Avrupa'da meydana gelen RTFS'nin sağaltımında amoksisilinin 80-100 mg/kg/gün dozda ve 7 gün süreyle kullanılmasına rağmen etkinliğinin azaldığı veya bazı balık üretim çiftliklerinde etkili olmadığını belirtmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda

amoksisiline karşı direnç şekillendiği rapor edilmiştir (Rangdale ve ark 1997, Madsen ve Dalsgaard 2000, Bruun ve ark 2000).

### 1.12.1.2. Nitrofuranlar

Nitrofuranlar, furan halkasındaki beşinci karbon atomu üzerinde nitro grubu taşıyan sentetik ve etki spektrumu geniş kemoterapotiklerdir. Gram pozitif ve bazı Gram negatif bakterilere etkilidirler. Nitrofuran grubu antibiyotikler içerisinde nitrofurazon, furazolidon ve nifurpirinol önemli bir yer tutar. Etki şekli belirsiz olan nitrofuranların, metabolitleriyle bakteri DNA'sında hasara yol açtıkları veya bakterilerde pruvattan *asetil koenzim-A*'nın şekillenmesini engelledikleri düşünülmektedir (Orer 2000, Kaya 2002). Kimyasal formülü  $C_{12}H_{10}N_2O_4$  ve molekül ağırlığı 246,06 olan nifurpirinol (Şekil 1.1.) suya uygulandığında balık dokusu tarafından hızla absorbe edilmektedir. Geçmiş yıllarda haftada iki kere 0,5 mg/ml dozda 3 gün arayla ve 60 dakika süreyle banyo tarzında nifurpirinol uygulamasıyla RTFS'nin kontrol altına alındığı, fakat 24 saat arayla 10-15 mg/l dozda ve 60'ar dakikalık iki banyo uygulaması ile daha etkin sonuç alındığı bildirilmiştir. Ancak karsinojenik ve mutajenik olmaları nedeniyle, birçok Avrupa ülkesinde, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve ülkemizde 90/2377 sayılı AB yönetmeliğinin IV nolu ekinde su ürünleri de dahil, gıda değeri olan hayvanlarda yasaklanmış maddeler grubunda yer aldıklarından, nitrofuranların kullanılmaları yasaklanmıştır (Kaya 2002, TKB 2003, Cipriano ve Holt 2005).

### 1.12.1.3. Fenikoller

Fenikoller grubunda yer alan florfenikol beyaz renkte tozudur. Grubun diğer üyeleri arasında kloramfenikol ve tiamfenikol bulunmaktadır. Kloramfenikol molekülüne nitro grubunun yerine metilsülfonil ( $CH_3-SO_2-$ ) grubu ve flor atomunun gelmesiyle florfenikol oluşur. Kloramfenikolün kemik iliğini baskı altına alması nedeniyle, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından Nisan-1993 tarihinde gıda değeri olan hayvanlarda kullanımı yasaklanmıştır. Kemik iliğini baskı altına almaması ve aplastik anemiye yol açmaması nedeniyle, florfenikol gıda değeri olan hayvanlarda güvenle kullanılabilir (Kaya 2002). Florfenikol ve tiamfenikol, ülkemizde 31.12.2003 tarihi itibarı ile su ürünleri yetiştiriciliğinde bakanlıktan ruhsat alınmasına ve reçeteye tabi antibiyotikler içerisinde yer

almaktadırlar. Florfenikol aynı zamanda su ürünlerinde kalıntı kontrolü yapılacak antibiyotikler içerisinde de yer almaktadır (TKB 2003).

Suda çözülebilir bir antibiyotik olan florfenikolün kimyasal formülü  $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$  (Şekil 1.1.), kalıntı limiti 0,8 ppm (mg/kg) ve molekül ağırlığı 358,22'dir (Wildish ve ark 2004). Atlantik salmon balıklarında ağızdan verildiğinde biyoyaralanımı % 95 ve yarı ömrü 12 saat olan florfenikolün dokularda birikme ve burada melanin bağlama özelliğine sahiptir (Inglis ve Richards 1991, Burka ve ark 1997, Park ve ark 2006).

Bakteri hücresinde protein sentezini engelleyerek etkisini gösteren florfenikol bakteriyostatik bir antibiyotiktir. Florfenikol bakterilerde ribozomlar ile birleşerek, mesajcı RNA (mRNA) ile yönetilen protein sentezini engeller. Bakterilerde 50S ve 30S ribozomal alt birimlerden oluşan tek ribozomun çökme sabitesi 70S ( $10^{-13}$  sn)'tir. Memeli hücrelerindeki ribozomun çökme sabitesi 80S olduğundan, florfenikol memeli hücre ribozomlarında protein sentezini engellememektedir. Florfenikol 50S ribozomunu etkileyerek *peptidil transferaz* enziminin etkinliğini azaltır. Böylece peptid bağının şekillenmesi ve ribozomun mRNA üzerinde kayması engellenir (Kaya 2002).

Geniş etki spektrumlu olan florfenikol hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere etkilidir. Molekülde flor atomunun bulunması florfenikolün *asetilaz* salgılayan bakterilere karşı direncini artırır ve etkisine karşı daha zor direnç şekillenir (Kaya 2002).

Uygulama dozu 10 mg/kg/gün olan ve 10 gün süreyle uygulanan florfenikol, oral yolla uygulandığında dokulardan daha iyi absorbe edilmektedir. Yüksek su sıcaklıklarında vücuttan daha çabuk atılmaktadır. Hoşa giden bir lezzeti olduğundan balıklar tarafından kolayca tüketilir. Gerek tatlı sularda gerekse tuzlu sularda etkilidir (Shering-Plough 2006).

Florfenikolün Kanada, Norveç ve Japonya'da salmon balıklarında görülen ve *F. psychrophilum*'un neden olduğu RTFS ile *A. salmonicida*'nın neden olduğu furunkulozis enfeksiyonlarının sağaltımında kullanıldığı (Lunden ve ark 1998, FDA 2006), bununla birlikte Avrupa'da meydana gelen RTFS'nin sağaltımında 10 mg/kg/gün dozda ve 10 gün süreyle uygulandığında etkili olduğu belirtilmiştir (Branson 1998). Lunden ve Bylund (2000), 10 mg/kg/gün dozda ve 10 gün süreyle uygulanan florfenikolün dalak dokusunda lenfosit proliferasyonuna bağlı olarak gökkuşağı alabalıklarında immun sistemi baskıladığını belirtmişlerdir.

#### 1.12.1.4. Kinolonlar

Kinolon grubu antibiyotiklerin bazı türevlerinin yapılarında flor atomu bulunduğundan, bu grup antibiyotikler florokinolonlar olarak da bilinirler. Sentetik yollarla hazırlanmış olan kinolon grubu antibiyotikler içerisinde nalidiksik asit, oksolinik asit, enrofloksasin, sarafloksasin ve flumequin yer almakla birlikte, oksolinik asit ve flumequin 1980'lerden beri Avrupa'da balık hastalıklarında en sık kullanılan iki antibiyotiktir (Burka ve ark 1997). Su ürünlerinde kalıntı kontrolü yapılacak antibiyotikler içerisinde yer alan flumequin ve oksolinik asit, ülkemizde 31.12.2003 tarihi itibarı ile su ürünleri yetiştiriciliğinde bakanlıktan ruhsat alınmasına ve reçeteye tabi antibiyotikler içerisinde de yer almaktadırlar (TKB 2003).

Enrofloksasinin ve siprofloksasinin kimyasal formülleri sırasıyla  $C_{19}H_{22}FN_3O_3$  ve  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$  (Şekil 1.1.), molekül ağırlıkları ise sırasıyla 359,5 ve 331,36'dır. Kinolon grubu antibiyotiklerin farmakokinetiği su sıcaklığına ve suyun tuzluluk oranına göre değişkenlik gösterir. Sudaki katyonik iyonların fazla olması kinolon grubu antibiyotiklerin bağırsaklardan emilimini engelleyerek balıklardaki biyoyararlanım oranını düşürmektedir (Burka ve ark 1997). Enfloksasinin alabalıklarda dağılım hacmi (Vd) 3.2 l/kg ve yarılanma ömrü 24 saattir (Kaya 2002). Tuzlu su atlantik salmon balıklarına tek doz olarak oksolinik asit ve flumequin 25 mg/kg, sarafloksasin ve enrofloksasin 10 mg/kg konsantrasyonlarında yeme ilave edildikten sonra, biyoyararlanımlarının sırasıyla %30.1, %44.7, %2.2 ve %55.5 olduğu ve yarılanma ömürlerinin ise sırasıyla 18.2, 24, 24 ve 34.2 saat olduğu ifade edilmiştir (Martinsen ve Horsberg 1995). Martinsen ve ark (1993) sarafloksasinin formülasyonuna bağlı olarak biyoyararlanımının % 4-24 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Ayrıca farmakokinetik çalışmalarda kinolon grubu antibiyotiklerin balık dokusunda iyi penetre oldukları ve flumequin ile enrofloksasinin kinetik parametre sonuçlarının oksolinik aside göre daha iyi olduğu ifade edilmektedir (Martinsen ve Horsberg 1995, Storey 2005).

Enrofloksasin vücutta oksidatif dietilasyon sonucunda metaboliti olan siprofloksasine dönüşmektedir (Serrano 2005). Vaccaroo ve ark (2003), levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) enrofloksasinin 3 gün süreyle 1 mg/kg dozda periton içi yolla veya tek dozda (3 mg/kg) aynı yolla uygulanmasıyla, enrofloksasinin biyotransformasyonunda rol oynayan sitokrom P450 enzim sisteminin sırasıyla % 23 ve % 25 oranında baskılandığını ve metaboliti olan siprofloksasine dönüşüm oranının azaldığını belirlemişlerdir.

Araştırmacılar benzer olgunun diğer balık türlerinde de meydana gelebileceğini bildirmişlerdir.

Kinolonlar Gram negatif bakterilere de etki eden geniş spektrumlu antibiyotikler olup bakterilerde DNA *jiraz* enziminin etkinliğini engelleyip, DNA sentezi ve kopyasının çıkarılmasını ve dolayısıyla nükleik asit sentezini engelleyerek etkinlik gösterirler (Kaya 2002). Kinolon grubu antibiyotikler hücre içi yerleşim göstererek, etkenin direnç kazanma mekanizmasını gerilettiklerinden gerek tatlı ve tuzlu su, gerekse de düşük ve yüksek su sıcaklıklarında sıkça kullanılmaktadırlar (Burka ve ark 1997).

Kinolonlar balık hastalıklarında banyo tarzında, yeme katılarak oral yolla veya enjeksiyon tarzında uygulanırlar. Ancak *F. psychrophilum*'un oksolinik asite karşı direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Rangdale ve ark 1997, Madsen ve Dalsgaard 2000, Bruun ve ark 2000). Enrofloksasin 0.8-1 mg/l, oksolinik asit 1 mg/l ve flumequin 10 mg/l dozda suya katılarak 24 saat süreyle banyo şeklinde uygulanırken oksolinik asit 5-10 mg/kg/gün, enrofloksasin ve siprofloksasin 10 mg/kg/gün dozda hesaplanıp yeme katılarak 10 gün süreyle uygulanır (Martinsen ve Horsberg 1995, Burka ve ark 1997, Roberts ve Shepherd 2001).

#### **1.12.1.5. Tetrasiklinler**

Balık yetiştiriciliğinde geniş kullanım alanı bulan tetrasiklin grubu antibiyotiklerin başlıcaları oksitetrasiklin, klortetrasiklin ve doksisiklidir. Ancak bunlardan oksitetrasiklin hidroklorür tuzu, toksisitesinin düşük olması, ucuz olması ve birçok bakteriyel hastalığa karşı etkili olması nedeniyle balık hastalıklarında en çok tercih edilen antibiyotikler arasında yer almaktadır (Burka ve ark 1997). Tetrasiklinler ülkemizde su ürünlerinde kalıntı kontrolü yapılacak antibiyotikler içerisinde bulmaktadırlar (TKB 2003).

Suda çözünen oksitetrasiklinin kimyasal formülü  $C_{22}H_{24}N_2O_9$  (Şekil 1.1.), kalıntı limiti 0,1 ppm, yarı ömrü 60,3 saat ve molekül ağırlığı 460,44'dür (Wildish ve ark 2004). Damar içi yolla 60 mg/kg dozda alabalıklara uygulanan oksitetrasiklinin biyolojik yarı ömrü 81 saat, dağılım hacmi 2,1 l/kg ve klirensi (Cl) 0,27 ml/dk.kg'dır (Kaya 2002).

Geniş etki spektrumlu olan oksitetrasiklin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere etkili bakteriyostatik bir antibiyotiktir. Bakterilerde 30S ve 50S ribozomal alt

birimin aminoasil taşıyıcı RNA (tRNA)'ya bağlanmasını dolayısıyla protein sentezini engelleyerek etki gösterir (Kaya 2002).

Tetrasiklinler balıklarda başlıca karaciğerde metabolize edilmektedirler. Vücuttaki biyolojik yarı ömürleri su sıcaklığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Örneğin, 16 °C'de  $t_{1/2}$ = 4,8 gün, 10 °C'de  $t_{1/2}$ = 6,1 gün ve 5 °C'de  $t_{1/2}$ = 8,9 gündür (Björklund ve ark 1990). Su sıcaklığı arttıkça, metabolizma hızının artışına bağlı olarak yarılanma süresinde azalma gözlenmektedir. Tetrasiklinlerin vücuttaki atılımı tatlı su balıklarında daha hızlıdır. Tatlı su atlantik salmon balıklarında 7-8 °C'deki su sıcaklığında tetrasiklinlerin biyolojik yarı ömürleri 2,1 gün dolayında olduğu belirtilmektedir (Burka ve ark 1997). Buna karşılık Namdari ve ark (1999)'larının yaptıkları bir araştırmada, 10 °C su sıcaklıklarında bulunan tatlı su alabalıkları ve tuzlu su salmon balıklarına oksitetrasiklinin aynı dozda uygulanması sonucu, her iki balık türündeki farmakokinetik parametrelerin birbirine yakın olduğunu vurgulamışlardır.

Oksitetrasiklinin tatlı su gökkuşuğu alabalıklarındaki biyoyararlanımı % 8 iken, tuzlu su atlantik salmon balıklarındaki biyoyararlanımı % 2'dir. Oksitetrasiklinin oral yolla kullanılan sağaltım dozu, insanlarda ve diğer sıcak kanlı hayvanlarda kullanılan sağaltım dozundan 2-5 kat daha fazladır. Bunun nedeni balık bağırsağında emiliminin az olmasıdır (Burka ve ark 1997, Storey 2005). Bu amaçla oksitetrasiklin genellikle 75-150 mg/kg/gün dozda yeme katılarak 5-10 gün süreyle veya 10 mg/l dozda suya katılarak 10 gün süreyle banyo tarzında veya 250-500 mg/kg/gün dozda yeme katılarak 5-7 gün süreyle kullanılabilir (Kaya ve ark 1997). Ayrıca bakteriyel balık hastalıklarının sağaltımında oksitetrasiklin hidroklorürün 250 mg/kg/gün dozda 4 gün süreyle kullanılabileceği bildirmiştir (FDA 2000).

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda, pedunkul ve kaudal yüzgeçte erozyonla seyreden RTFS'nin sağaltımında 10-50 mg/l dozda oksitetrasiklinin etkili olduğu bildirmiştir (Cipriano ve Holt 2005). Bruun ve ark (2003), oksitetrasiklinin (OTC) 75 mg/kg/gün dozda ve 10 gün süreyle uygulanmasıyla RTFS'ye karşı daha etkili olduğunu belirtmişler, ancak OTC'nin en küçük etkin yoğunluk (EKEY) değerinin izolatlara göre farklılık gösterdiğini ve bunun sağaltım etkinliği açısından önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bruun ve ark (2000), Danimarka'da yaptıkları bir çalışmada, RTFS enfeksiyonunda kullanılan oksitetrasiklinin kalıntıya da neden olduğunu ifade etmişlerdir.

Lunden ve Bylund (2000), 75 mg/kg/gün dozda ve 10 gün süreyle uygulanan oksitetrasiklinin dalak dokusunda lenfosit proliferasyonuna bağlı olarak gökkuşağı alabalıklarında immun sistemi baskıladığını bildirmişlerdir. Ayrıca oksitetrasiklinin serum immunglobülin düzeyinin azalmasına bağlı olarak immun sistemi baskıladığı ve lökosit üretimini geciktirdiği ancak tamamen azaltmadığı bildirilmiştir (Rijkers ve ark 1981, Grondel ve ark 1985).

#### 1.12.1.6. Sülfonamidler

Sentetik olarak hazırlanan sülfonamidlerin bakteriler üzerinde etkinlik oluşturabilmeleri için yapılarında N<sup>4</sup>-para-amino grubunun olması gereklidir. Bakteriyostatik etkili olan sülfonamidler dar etki spektrumludurlar. Ancak trimetoprim veya ormetoprim gibi 2,4-diaminoprimidin (DAP) ile birlikte kombine edilerek kullanıldıklarında etki spektrumları genişler (Kaya 2002). Alavi ve ark (1993), diğer sülfonamidlere göre 60 mg/kg dozda uygulanan sülfaklorpidazinin Gram negatif bakteriyel etkenlere oldukça etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bakteriyel balık hastalıklarında kullanılan sülfonamidlerin başlıcaları sülfadiazin, sülfadimidin, sülfisoksazol ve sülfametazin ile sülfadimetoksin-trimetoprim, sülfadiazin-trimetoprim olmakla birlikte, molekül ağırlığı 267,30 olan sülfisoksazol (C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S) ve molekül ağırlığı 277,34 olan sülfametazinin (C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S) kimyasal yapıları Şekil 1.1.'de gösterilmiştir (Kaya 2002). Sülfonamidler ülkemizde su ürünlerinde kalıntı kontrolü yapılacak antibiyotikler içerisinde bulunmaktadır (TKB 2003).

Sülfonamidler bakterilerde para-aminobenzoik asit (PABA) ve dihidropterin arasındaki tepkimeyi gerçekleştiren *dihidropteroat sentetaz* enziminin etkinliğini önleyerek ve böylece folik asit üretimini azaltarak ve sonuçta ara metabolizmayı engelleyerek etkinlik gösterirler (Kaya 2002).

Sülfadimidinin alabalıklara damar içi yolla 100 mg/kg dozda ve 10 °C'de uygulanmasıyla yarılanma ömrü 20,6 saat, dağılım hacmi 1,2 l/kg ve klirensi 41 ml/saat.kg olarak bulunmuş iken, aynı doz ve yolla 20 °C'de uygulanmasıyla yarılanma ömrü 14,7 saat, dağılım hacmi 1,83 l/kg ve klirensi 39,9 ml/saat.kg olarak bulunmuştur. Aynı doz ve yolla uygulanan sülfadiazinin ise 10 °C'deki yarılanma ömrü 47 saat, dağılım hacmi

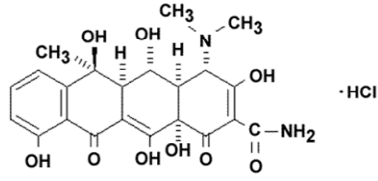


0,53 l/kg ve klirensi 7,9 ml/saat.kg iken, 20 °C'deki yarılanma ömrü 33 saat, dağılım hacmi 0,6 l/kg ve klirensi 12,2 ml/saat.kg'dır (Kaya 2002).

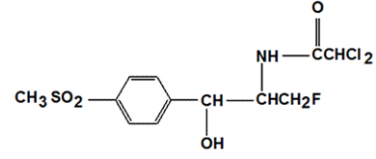
Atlantik salmon balıklarında trimetoprim ve ormetoprim bağırsaklardan tamamen emilmesine ve etkili kan yoğunluğuna ulaşmasına rağmen, trimetoprim ve ormetoprimin sistemik biyoyararlanımları % 40'tır (Burka ve ark 1997).

Skjølstrup ve ark (2000), yaptıkları çalışmada oksolinik asit, oksitetrasiklin, florfenikol ve sülfadiazin-trimetoprim (5:1) kombinasyonunun sırasıyla 35, 75, 10 ve 30 mg/kg/gün dozda yeme katılarak 10 gün süreyle verildikten sonra, hematopoietik bir organ olan anterior böbrekte lenfoid hücre proliferasyonunun oluştuğunu ve sülfadiazin-trimetoprim kombinasyonu dışındakilerin anterior böbrekte mitoz bölünmeyi baskıladığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca Lunden ve Bylund (2000), 30 mg/kg/gün dozda ve 10 gün süreyle uygulanan sülfadiazin-trimetoprim kombinasyonunun dalak dokusunda lenfosit proliferasyonuna bağlı olarak gökkuşağı alabalıklarında immun sistemi baskıladığını bildirmişlerdir.

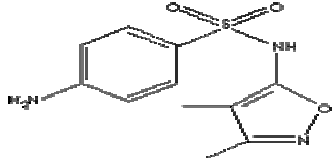
Sülfonamid grubu antibiyotiklerden sülfisoksazol ve sülfametazin, bakteriyel balık hastalıklarının sağaltımında ilk kullanılan antibiyotikler arasında yer almaktadır. Sülfisoksazolün, *F. psychrophilum* sağaltımında 220 mg/kg/gün dozda 10 gün süreyle, profilaktik olarak 88 mg/kg/gün dozda 26 gün süreyle yeme katılarak uygulandığı rapor edilmiştir (Cipriano ve Holt 2005). Buna rağmen Lorenzen ve ark (1997), Rangdale'nin bildirdiğine göre, uygulama dozu 50-60 mg/kg'ın üzerinde olan sülfonamidlerin, RTFS enfeksiyonunun görüldüğü alabalık yavrularında etkili olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca *F. psychrophilum*'un sülfadiazin-trimetoprim karşı doğal direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Rangdale ve ark 1997, Madsen ve Dalsgaard 2000, Bruun ve ark 2000).



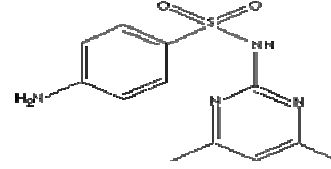
Oksitetrasiklin



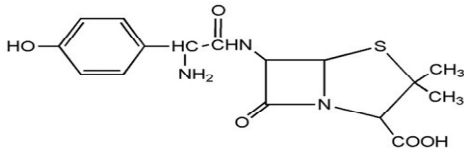
Florfenikol



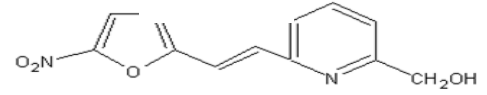
Sülfisoksazol



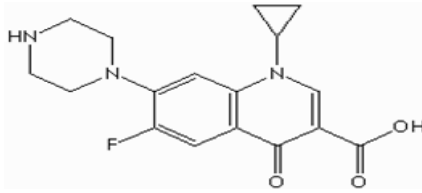
Sülfametazin



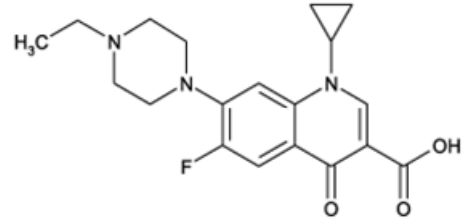
Amoksisilin



Nifurpirinol



Siprofloksasin



Enrofloksasin

Şekil 1.1. RTFS enfeksiyonunda kullanılan bazı antibiyotiklerin kimyasal yapısı (Kaya 2002, Kayaalp 2002).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2. 1. Gereç

#### 2.1.1. Hayvan Materyali

Çalışma, merkezi Aydın'da bulunan, Muğla iline bağlı Beyobası - Köyceğiz mevkiindeki üretim tesisinde gerçekleştirildi ve hayvan materyali bu işletmeden temin edildi. Doğal yolla *F. psychrophilum* ile enfekte olduğu tahmin edilen yavruhane bölümünde (Şekil 2.1. ve 2.2.) meydana gelen enfeksiyon sonucunda, canlı balık sayısı ve ölüm oranları birbirine yakın havuzlar değerlendirmeye alındı. Rastgele seçilen ve canlı ağırlıkları 1-2 g arasında değişen 10-12 haftalık 50 adet hastalıklı gökkuşağı alabalık yavrusu laboratuvara işletme suyu içerisinde canlı olarak getirildi. Etken izolasyonu ve identifikasyonunu takiben antibiyogram testleri yapıldı (Furones 2001). Antibiyotik duyarlılık testleri sonuçlarına göre etkenin en duyarlı olduğu dört antibiyotik seçildi ve biri kontrol olmak üzere beş ayrı havuz kullanılarak sağaltıma başlandı. Bu amaçla her bir havuzda yaklaşık 25 000 adet olmak üzere toplam 125 000 doğal enfekte gökkuşağı alabalık yavrusu kullanıldı.



Şekil 2.1. Yavruhane bölümünden bir görünüm.



Şekil 2.2. Yavruhane bölümünden diğer bir görünüm.

## 2.1.2. Besiyerleri

### 2.1.2.1. İzolasyon besiyerleri

RTFS'ye neden olan *F. psychrophilum*'un izolasyonunda *Cytophaga* agar (Kusuda 1982, Wiklund ve ark 1994, Soltani ve ark 1995, Daskalov ve ark 1999, Dalsgaard ve Madsen 2000, Nematollahi ve ark 2003, Cipriano ve Holt 2005) besiyerinden yararlanıldı. *Cytophaga* agar besiyerinin hazırlanmasında 0,5 g tripton (DIFCO-211705), 0,5 g yeast extract (MERCK-103753), 0,2 g beef (meat) extract (MERCK-103979), 0,2 g sodyum asetat (MERCK-106264), 9,0 g agar (MERCK-101613) ve 1000 ml distile su kullanıldı (pH 7,2-7,4). Karışım hazırlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve yaklaşık 45-50 °C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı.

### 2.1.2.2. İdentifikasyon besiyerleri

Etkenin identifikasyonunda kullanılan başlıca besiyerleri;

#### 1. *Cytophaga* Broth

*Cytophaga* broth besiyerinin hazırlanmasında 0,5 g tripton (DIFCO-211705), 0,5 g yeast extract (MERCK-103753), 0,2 g beef (meat) extract (MERCK-103979), 0,2 g

sodyum asetat (MERCK-106264) ve 1000 ml distile su kullanıldı (pH 7,2-7,4). Karışım hazırlandıktan sonra tüplere 4'er ml aktarıldı ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Kusuda 1982, Wiklund ve ark 1994, Soltani ve ark1995, Daskalov ve ark 1999, Dalsgaard ve Madsen 2000, Nematollahi ve ark 2003, Cipriano ve Holt 2005).

## 2. Lassen'in Üçlü Tüp Besiyeri

Lassen'in üçlü tüp besiyerlerinden olan I. tüpün hazırlanmasında triple sugar iron agar (MERCK-103915) kullanıldı. Karışımdan 65 g tartılarak 1000 ml distile suda eritildi. Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlandı ve daha sonra tüplere aktararak 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Tüpler otoklavdan çıkarıldıktan sonra 45° eğimli olacak şekilde soğutuldu (Lassen 1975).

Lassen'in üçlü tüp besiyerlerinden olan II. tüpün hazırlanmasında 5,0 g pepton (MERCK-107228), 5,0 g neopepton, 2,0 g mannitol (MERCK-105982), 2,5 g agar (MERCK-101613), 1,7 g potasyum nitrat (MERCK-105065), 20 ml fenol kırmızısı ayırıcı (% 0,2'lik) ve 1000 ml distile su kullanıldı. Karışımın pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanarak tüplere 4'er ml aktarıldı ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi (Lassen 1975).

Lassen'in üçlü tüp besiyerlerinden olan III. tüpün hazırlanmasında ise üre broth (MERCK-108483) kullanıldı. Karışımdan 17 g tartılıp 1000 ml distile suda eritildi. Daha sonra 0,22 µm steril milipore filtrelerden (MACHEREY-NAGEL Lot No: 603-001) süzülerek steril tüplere 4'er ml aktarıldı (Lassen 1975).

## 3. Nitrat Broth

Nitrat brothun hazırlanmasında 3,0 g beef (meat) extract (MERCK-103979), 5,0 g pepton (MERCK-107228), 1,0 g potasyum nitrat (MERCK-105065) ve 1000 ml distile su kullanıldı. Karışım hazırlandıktan sonra tüplere 4'er ml aktarıldı ve 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Bilgehan 1995).

## 4. Oksidasyon- Fermentasyon Besiyeri (O/F Basal Medium) (MERCK-110282)

Karışımdan 11 g tartıldı ve 1000 ml distile suda eritildi. Daha sonra tüplere 4'er ml aktararak 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

#### 5. Jelatin (MERCK-104070)

*Cytophaga* agara % 4 oranında jelatin ilave edilerek homojenize edildi ve pH'sı 7,2-7,4'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Daha sonra 45-50 °C'ye kadar soğutulup steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Bilgehan 1995, İnce 2005).

#### 6. Metil Kırmızısı - Voges Proskauer (MRVP) Medium (OXOID-CM0043B)

Karışımdan 17 g tartılarak 1000 ml distile suda eritildi ve tüplere 4'er ml aktarıldıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

#### 7. Kongo Kırmızısı (Galaktozamin Glikan) Testi

Hazırlanacak *Cytophaga* agar besiyeri içersine % 0,003 kongo kırmızısı ilave edildi. Karışım hazırlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve yaklaşık 45-50 °C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Lorenzen 1994, Lorenzen ve ark 1997).

#### 8. Simmons Sitrat Agar (OXOID-CM155)

Karışımdan 23 g tartılarak 1000 ml distile suda eritildi ve tüplere 4'er ml aktarıldı. Daha sonra tüpler 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve otoklavdan çıkarıldıktan sonra 45° eğimli olacak şekilde soğutuldu.

#### 9. Tryptic Soy Agar (MERCK-105458)

Karışımdan 40 g tartılarak 1000 ml distile suda eritildi ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Daha sonra steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı.

#### 10. Plate Count Agar (MERCK-105463)

Karışımdan 22,5 g tartılarak 1000 ml distile suda eritildi ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Yaklaşık 45-50 °C'ye kadar soğutuldu ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı.

### 11. Mueller-Hinton Agar (MERCK-105437)

Karışımdan 34 g tartılarak 1000 ml distile suda eritildi ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Daha sonra steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı.

### 12. Kanlı (Blood) Agar (MERCK-110886)

Karışımdan 40 g tartılarak 1000 ml distile suda eritildi ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Yaklaşık 45-50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra % 5 steril defibrine koyun kanı ilave edildi ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı.

### 13. NaCl içeren *Cytophaga* agar besiyerleri

Hazırlanacak *Cytophaga* agar besiyeri içersine sırasıyla % 0, % 0,5, % 1,5 ve % 3 NaCl (MERCK-106400) ilave edildi. Karışım hazırlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi ve yaklaşık 45-50 °C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Bilgehan 1995, Lorenzen ve ark 1997, Ekman 2003, Cipriano ve Holt 2005).

### 2.1.2.3. Ayıraçlar

1. Kovac's İndol Ayıracı (MERCK-109293)
2. Nitrat A Ayıracı (DIFCO-BD261197)
3. Nitrat B Ayıracı (DIFCO-BD261198)
4. O'Meara's Ayıracı (FLUKA-07689)
5. Metil Kırmızısı Ayıracı

Metil kırmızısı ayıracının hazırlanmasında 0,05 g metil kırmızısı, 150 ml etil alkol (MERCK-100986) ve 100 ml distile su kullanıldı. Metil kırmızısı etil alkolde eritildikten sonra üzerine distile su eklendi (Bilgehan 1995).

### 6. Fenol Kırmızısı Ayıracı (% 0,2'lik)

Bir havanda 0,2 g fenol kırmızısı üzerine 23,5 ml 20 Normal sodyum hidroksit (MERCK-106482) eriği azar azar eklenerek eritildi. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak balon jodede çalkalandıktan sonra renkli şişeler içerisinde oda ısısında saklandı (Bilgehan 1995).

#### **2.1.2.4. Boyalar**

1. Gram Boya (MERCK-111885)
2. Metil Kırmızısı (DIFCO-611812)
3. Fenol Kırmızısı (MERCK-107241)
4. Kongo Kırmızısı (Reidel-de Haen-818134)

#### **2.1.3. API ZYM Enzim Testi**

Şüpheli bakteri kolonilerinin enzim üretimi API ZYM stripleri (bioMerieux sa, 69280, Marcy l'Etoile, Fransa) aracılığı ile belirlendi. API ZYM testi üretici firma talimatlarına göre yapıldı.

#### **2.1.4. Referans Bakteri Suşu**

Bakteri suşlarının morfolojik, biyokimyasal ve enzim testleri ile antibiyotik duyarlılık testlerinin değerlendirilmesinde, Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Hastalıklar Anabilim Dalı'ndan temin edilen *F. psychrophilum* NCIMB 1947 suşu karşılaştırılarak kullanıldı.

#### **2.1.5. Antibiyotik Tanı Diskleri**

Çalışma kapsamında kullanılan antibiyotik tanı diskleri amoksisilin/klavulanik asit (OXOID-CT0223B), ampisilin (OXOID-CT0003B), enrofloksasin (OXOID-CT0639B), eritromisin (OXOID-CT0020B), florfenikol (OXOID-CT1754B), gentamisin (OXOID-CT0024B), oksitetrasiklin (OXOID-CT00413), penisilin G (OXOID-CT0043B), siprofloksasin (OXOID-CT0425B) ve sülfametoksazol-trimetoprim (OXOID-CT0052B)'dir.

Tanı disklerinin içerdiği antibiyotik miktarları ise amoksisilin/klavulanik asit (AMC; 2:1) 30 µg, ampisilin (AMP) 10 µg, enrofloksasin (ENR) 5 µg, eritromisin (E) 15 µg, florfenikol (FFC) 30 µg, gentamisin (CN) 10 µg, oksitetrasiklin (OT) 30 µg, penisilin G (P) 10 ünite, siprofloksasin (CIP) 5 µg ve sülfametoksazol-trimetoprim (SXT; 23,75 µg + 1,25 µg) 25 µg'dır.



### **2.1.6. İlaç Standartları**

Bakteri izolasyonu ve identifikasyonunun ardından yapılan antibiyogram testleri sonucuna göre, etkenin en duyarlı olduğu antibiyotiklerden oksitetrasiklin (Terramycin, Pfizer, Türkiye), enrofloksasin (Baytril, Bayer Türk, Türkiye), siprofloksasin (Ciprobiotik, Eczacıbaşı, Türkiye) ve florfenikol (Florocol, Schering-Plough, İngiltere) kullanılarak sağaltıma başlandı.

### **2.1.7. Cihazlar**

Çalışma kapsamında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda bulunan derin dondurucu (Philco, Merloni Elettrodomestici), su banyosu (Nüve, NM 402), distile su cihazı (Nüve, NS 112), etüv (Nüve, FN 500), soğutmalı inkübatör (Nüve, ES 110), vortex (Nüve, NM 110), ısıtmalı manyetik karıştırıcı (Nüve, MK 418), terazi (Shimadzu, EB-2200 HU) ve hassas terazi (Shimadzu, AX120) ile Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan otoklav (Nüve, OT4060) ve pH metre (Hana instrument, pH 211) ayrıca Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan ışık mikroskobu (Leica DMLB) ve görüntü analiz programından (Leica Q Win Standart) yararlanıldı.

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Bakteri İzolasyonu**

Hastalıklı gökkuşuğu alabalık yavruları, bakteriyolojik ekim örnekleri için laboratuvara işletme suyu içerisinde canlı olarak getirildi. Aynı gün steril pens, bistüri ve makas yardımıyla steril ortamda solungaç yayları kesilerek steril öze yardımıyla *Cytophaga* agara ekim yapıldı (Diler ve ark 2000, Furones 2001).

Bağırsak ve iç organlardan etken izolasyonu için alabalık yavrularının vücut yüzeyi % 70'lik etil alkolle (MERCK-100986) silindi. Aseptik koşullarda anüsten başa doğru ventral ensizyon yapılarak abdominal boşluk açıldı. Solungaç, karaciğer, böbrek, beyin, dalak, bağırsak ve lezyonlu bölgelerden steril öze yardımıyla *Cytophaga* agara ekimler yapıldı (Patrico ve ark 1995, Diler ve ark 2000, Furones 2001, Madsen ve ark 2001, LaFrentz ve Cain 2004). Ekimi yapılan besiyerleri 15-20 °C'de 48-96 saat saat inkübe

edildi (Wiklund ve ark 1994, Lorenzen ve ark 1997, Dalsgaard ve Madsen 2000, LaFrentz ve Cain 2004, Cipriano ve Holt 2005).

### **2.2.2. Bakteri Suşlarının İdentifikasyonu**

İnkübasyondan sonra farklılık gösteren koloniler seçilerek saflaştırıldı. Kültürlerin saflığı koloni tiplerinin kontrolü ile belirlendi. Saf kültürlerin Gram reaksiyonu, genel morfoloji, hareketlilik gibi morfolojik karakterleri ile kolonilerin görünümü, pigmentasyonu, şekli, büyüklüğü gibi kültürel özellikleri ve ayrıca katalaz aktivitesi, oksidaz testi, karbonhidratların fermentasyonu, fleksirubin pigment üretimi, oksidasyon-fermentasyon (O/F) testi ile jelatin hidrolizi, kongo kırmızısı testi, sitrat testi gibi biyokimyasal testleri gerçekleştirildi (Bilgehan 1995, Lorenzen 1994, Lorenzen ve ark 1997).

#### **2.2.2.1. Gram boyama**

Etken izolasyonu için laboratuvara işletme suyu içerisinde canlı olarak getirilen hastalıklı gökkuşaklı alabalık yavrularının solungaç, iç organlar ve lezyonlu bölgelerinden *Cytophaga* agara ekimler yapıldıktan sonra 15-20 °C’de 48-96 saat inkübe edildi. Daha sonra üreyen kolonilerin Gram boyama sonucuna göre, Gram negatif olarak belirlenen suşlara diğer identifikasyon testleri uygulandı.

#### **2.2.2.2. Katalaz testi**

Katı besiyerinde üreyen şüpheli koloniler steril öze ile alınıp bir lamın üzerine bırakıldı. Üzerine 1-2 damla % 30’luk hidrojen peroksit (MERCK-108597) damlatılıp bir kürdan ile karıştırıldı. Lam üzerinde oksijen açığa çıkışına bağlı olarak gaz oluşturan koloniler katalaz pozitif olarak değerlendirildi. Katalaz negatif bakterilerde herhangi bir gaz oluşumu gözlenmedi (Bilgehan 1995).

### **2.2.2.3. Oksidaz (sitokrom oksidaz) testi**

Oksidaz testi ile solunumlarında oksidatif fosforilasyon yapan bakterilerin sitokrom oksidaz etkinliği saptandı. Katı besiyerinde üreyen şüpheli koloniler steril öze ile alınarak oksidaz test çubuklarına (MERCK-113300) temas ettirildi. Renk değişimini gözlemlemek amacıyla 25-30 saniye beklendi. Çubuğun eflatun-mor renk alması pozitif reaksiyon, herhangi bir renk değişikliğinin olmaması negatif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan 1995).

### **2.2.2.4. Glikoz, laktoz, gaz, H<sub>2</sub>S testi**

Şüpheli bakteri kolonisi steril iğne uçlu öze yardımıyla alındıktan sonra, öze Lassenin I. tüpüne dik bir şekilde batırıldı. Daha sonra besiyerinin yatık kısmının yüzeyine zik-zak çizilerek ekim yapıldı ve 15-20 °C'de 24-72 saat inkübe edildi. Tüpün uç kısmında sarı renk oluşumu laktoz pozitif, dip kısmında sarı renk oluşumu glikoz pozitif, herhangi bir renk değişikliğinin olmaması glikoz ve laktoz negatif, besiyerinin üzerinde siyah renk oluşumu H<sub>2</sub>S pozitif ve fermantasyon esnasında gaz kabarcıklarının oluşumu gaz pozitif olarak değerlendirildi (Lassen 1975).

### **2.2.2.5. Mannitol ve hareket testi**

Şüpheli bakteri kolonisi steril iğne uçlu öze yardımıyla alındıktan sonra Lassenin II. tüpüne dik bir şekilde batırıldı ve 15-20 °C'de 24-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tüpte sarı renk oluşumu mannitol pozitif olarak değerlendirildi. Lassenin I. ve II. tüpündeki iğne uçlu öze ile yapılan ekim hatları değerlendirilerek şüpheli bakterilerin hareketli olup olmadıkları belirlendi (Lassen 1975).

### **2.2.2.6. Üreaz (üre hidrolizi) ve indol testi**

Lassen'in III. tüpüne şüpheli bakteri kolonileri ekilerek 15-20 °C'de 24-72 saat inkübe edildi. Üreaz testi için, inkübasyondan sonra besiyerinin kırmızı renge dönmesi üreaz pozitif olarak değerlendirildi. İndol testi için, inkübasyondan sonra Kovac's indol ayırıcından 3-5 damla damlatılarak üst tarafta bir katman oluşması sağlandı. Besiyeri ve

ayıracağı arasında kırmızı bir renk oluşmaması negatif reaksiyon olarak değerlendirildi (Lassen 1975).

#### **2.2.2.7. Nitrat testi**

İçerisinde nitrat broth bulunan tüplere şüpheli bakteri kolonileri ekilerek 15-20 °C'de 48-72 saat inkübe edildi. Daha sonra tüplere sırasıyla nitrat ayıracağı (Nitrat A ve Nitrat B ayıracağı) damlatıldı. Besiyeri renginin kırmızı renk alması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan 1995).

#### **2.2.2.8. Oksidasyon/fermentasyon (O/F) testi**

Şüpheli bakteri kolonilerinden herbir bakteri için iki adet deney tüpüne iğne uçlu öze yardımıyla dik bir şekilde ekimler yapıldı. Tüplerden birisi 5 mm'den az olmamak şartıyla steril parafin yağı ile kaplandı. Diğer bakteri kolonileri için de aynı işlem uygulandı ve 15-20 °C'de 24-72 saat inkübe edildi. Parafinli tüpte sarı renk oluşumu fermentasyon pozitif, parafinsiz tüpte sarı renk oluşumu oksidasyon pozitif, her iki tüpte de sarı renk oluşması oksidasyon/fermentasyon pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan 1995).

#### **2.2.2.9. Jelatin hidrolizi (jelatinaz üretimi)**

Şüpheli bakteri kolonisi steril iğne uçlu öze yardımıyla alındıktan sonra, % 4 jelatin içeren *Cytophaga* agara ekimi yapılarak 15-20 °C'de 24-72 saat inkübe edildi. Üreme olduktan sonra kolonilerin üzerine amonyum sülfat (MERCK-101216) çözeltisi döküldü. Amonyum sülfat çözeltisi 100 ml distile suda 53,1 g tartılarak hazırlandı. Jelatini hidrolize eden kolonilerin etrafında açık-şeffaf bir zon oluşumu, pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan 1995, İnce 2005).

#### **2.2.2.10. Metil kırmızısı - Voges Proskauer (MR-VP) testi**

Şüpheli bakteri kolonilerinden her bir bakteri için iki adet MR-VP besiyerine bakteri ekimi yapıldı ve 15-20 °C'de 24-72 saat inkübe edildi. Metil kırmızısı deneyi için, inkübe

edilmiş besiyerlerine 5-6 damla metil kırmızısı ayırıcı damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif, turuncu veya sarı renk oluşumu negatif reaksiyon olarak değerlendirildi. Voges proskauer deneyi için, inkübe edilmiş besiyerlerine O'Meara's ayırıcından damlatıldı ve kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu negatif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan 1995).

#### **2.2.2.11. Fleksirubin pigment testi**

*Cytophaga* agarda üreyen şüpheli bakteri kolonileri, steril öze ile, % 20'lik potasyum hidroksit (MERCK-105029) çözeltisi emdirilmiş kurutma kağıtlarına temas ettirilerek renk oluşumu gözlemlendi. Turuncu-kahverengi renk oluşumu, fleksirubin pigment üretimi pozitif olarak değerlendirildi (Lorenzen 1994, Lorenzen ve ark 1997).

#### **2.2.2.12. Kongo kırmızısı (galaktozamin glikan) testi**

Steril öze yardımıyla hazırlanan % 0,003'lük kongo kırmızısı içeren *Cytophaga* agar besiyerine şüpheli bakteri kolonilerinin ekimi yapıldı ve 15-20 °C'de 48-96 saat inkübe edildi. Üreyen bakteri kolonilerinin kırmızı renk alması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Lorenzen 1994, Lorenzen ve ark 1997).

#### **2.2.2.13. Simmons sitrat testi**

Şüpheli bakteri kolonileri steril iğne uçlu öze yardımıyla Simmons sitrat besiyerine dik olarak ekildi. Ekimi yapılan tüpler 15-20 °C'de 24-96 saat inkübe edildi. Ortamın orjinal yeşil renginin muhafaza edilmesi negatif, ekim hattı boyunca üreme ile birlikte koyu mavi rengin meydana gelmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan 1995).

#### **2.2.2.14. Tryptone Soya Agar (TSA), Plate Count Agar (PCA), Mueller-Hinton Agar (MHA) ve Kanlı (Blood) Agarda üreme**

Şüpheli bakteri kolonileri steril öze yardımıyla TSA, PCA, MHA ve kanlı agar besiyerlerine ekildi. Ekimi yapılan petripler 15-20 °C'de 48-96 saat inkübe edildi. Besiyerlerinde meydana gelen üremeler pozitif reaksiyon olarak değerlendirilirken, üremenin olmaması negatif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan 1995, Nematollahi ve ark 2003).

#### **2.2.2.15. NaCl içeren (% 0, % 0,5, % 1,5 ve % 3'lük) *Cytophaga* agarda üreme**

Şüpheli bakteri kolonileri steril öze yardımıyla sırasıyla % 0, % 0,5, % 1,5 ve % 3'lük NaCl (MERCK-106400) içeren *Cytophaga* agar besiyerlerine ekildi. Ekimi yapılan petripler 15-20 °C'de 48-96 saat inkübe edildi. Besiyerlerinde meydana gelen üremeler pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan 1995, Lorenzen ve ark 1997, Ekman 2003, Cipriano ve Holt 2005).

#### **2.2.2.16. *Cytophaga* agarda 5 °C ve 37 °C'de üreme**

Şüpheli bakteri kolonileri steril öze yardımıyla *Cytophaga* agar besiyerine ekildi. Ekimi yapılan petripler 5 °C ve 37 °C'de 48-96 saat inkübe edildi. Besiyerlerinde meydana gelen üremeler pozitif reaksiyon olarak değerlendirilirken, üremenin olmaması negatif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan 1995, Lorenzen ve ark 1997, Ekman 2003, Cipriano ve Holt 2005).

#### **2.2.2.17. API ZYM enzim testi**

*Cytophaga* agar besiyerinde üremiş şüpheli bakteri kolonileri tüp içerisinde bulunan 2 ml'lik *Cytophaga* broth besiyerine ekildi. *Cytophaga* broth besiyeri 15-20 °C'de inkübe edildi ve tüplerin yoğunluğu 5-6 McFarland standart (bioMerieux sa, 69280, Marcy l'Etoile, Fransa) yoğunluğuna eşit oluncaya kadar inkübasyona devam edildi. Daha sonra steril pipet aracılığı ile *Cytophaga* broth besiyerinden, API ZYM striplerinin herbir

gözenegine 0,65 µl ilave edildi. Stripler 15-20 °C'de 20-24 saat inkübe edildi. Renk oluşumunu gözlemek amacıyla sırasıyla ZYM A ve ZYM B ayıraçlarından (bioMerieux sa, 69280, Marcy l'Etoile, Fransa) birer damla ilave edildi. Renk oluşumuna göre enzim testleri pozitif, zayıf pozitif veya negatif olarak değerlendirildi.

Morfolojik, biyokimyasal ve enzim testlerinin sonuçlarına göre identifikasyona gidildi.

### 2.2.3. Antibiyogram Testleri

İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapıldı (Bauer ve ark 1966, Koneman ve ark 1997, Furones 2001). Diğer antibiyotik duyarlılık testlerine göre disk difüzyon testinin ucuz olması, özel gereçler gerektirmemesi ve çabuk sonuç alınması, bu testin seçilmesinin nedenleri arasında yer almaktadır. Bu amaçla izolasyonu ve identifikasyonu yapılan bakteri suşları, içinde 4 ml *Cytophaga* broth bulunan tüplere ekilerek 15-20 °C'de inkübe edildi. Tüplerin yoğunluğu 0,5 McFarland standart (bioMerieux sa, 69280, Marcy l'Etoile, Fransa) yoğunluğuna eşit oluncaya kadar inkübasyona devam edildi. İzole edilen her bir bakteri suşu için Mueller-Hinton agar besiyerine, *Cytophaga* broth besiyerlerinde üreyen kültürlerinden 0,1 ml steril pipet ucu aracılığı ile aktarılarak steril cam bagedle yayıldı. Standart antibiyotik diskleri steril bir pens yardımı ile eşit aralıklarla pipet üzerine yerleştirildi. Petriler 15-20 °C'de 48-96 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her diskin çevresinde bulunan inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçüldü ve standart zon çapları ile karşılaştırıldı (NCCLS 1993, 1994).

### 2.2.4. Antibakteriyel İlaç ve Doz Uygulaması

Yemleme sıklığı yavru yetiştiriciliğinde günde 3-4 defadır (Aydın 2004). Bu bağlamda balıklara canlı ağırlıklarının (CA) % 4'ü oranında yemleme yapıldı ve ilaç dozları günlük yemleme miktarı ile karıştırılarak verildi. Buna göre, *yem ihtiyacı (kg)=toplam CA (kg) x [(yemleme oranı-0,5/100] x ilaç uygulama süresi (gün)* dikkate alınarak ilaç uygulaması yapıldı (Roberts ve Shepherd 2001, Kaya ve ark 1997).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde işletme açısından en ekonomik olan ve en sık kullanılan antibiyotik uygulama şeklinin, antibiyotiğin yemle birlikte karıştırılarak verilmesi olduğu bildirilmiştir (Yanong 2006). Bu amaçla, ticari gökkuşığı alabalık yavru yemi peletleri (Bayem, Pro-feed, Türkiye) mısır yağı ile nemlendirildi ve daha sonra toz halindeki antibakteriyel ilaçlarla peletler homojen bir şekilde karıştırıldı. Böylece toz halindeki antibiyotiklerin peletlere bağlanması sağlandı (Lunden ve Bylund 2000). Antibiyotikli yem verilmeden önce balıklar 12 saat yemlemeden kesildi (Erer, 2002). Kontrol grubuna sadece mısır yağı ile nemlendirilmiş pelet yem verildi. Sağaltım gruplarına ise, peletler mısır yağı ile nemlendirildikten sonra, oksitetrasiklin 75 mg/kg/gün dozda (Kaya ve ark 1997, Lunden ve ark 2002), enrofloksasin 10 mg/kg/gün dozda (Martinsen ve Horsberg 1995), siprofloksasin 10 mg/kg/gün dozda (Martinsen ve Horsberg 1995, Roberts ve Shepherd 2001), florfenikol 10 mg/kg/gün dozda (Lunden ve ark 1998, FDA 2006) ve her biri 10'ar gün süreyle uygulandı.

Sağaltım etkinliği, antibiyotik uygulaması sonrası balıklarda gözlenen klinik bulgulara ve ölüm oranlarına göre belirlendi.

### **2.3. İstatistiksel Değerlendirme**

Uygulama gruplarında ilaç uygulama sonrası oluşan ölüm oranları, kontrol grubu ile ki-kare testi ( $\chi^2$ ) kullanılarak istatistiksel yönden değerlendirildi.



### **3. BULGULAR**

#### **3.1. İşletmeye Ait Bazı Bulgular**

Muğla iline bağlı Beyobası - Köyceğiz üretim tesisinin yavruhane bölümünde kullanılan havuz sayısı 26, her bir havuzdaki balık sayısı yaklaşık 25 000 ve yavru ağırlıkları 1-2 gr'dır. Her bir havuzun hacmi 6.4 m<sup>3</sup> olup, suyun oksijen miktarı 10,5 mg/l, sıcaklığı 12-13,5 °C, sertliği 7 Fransız sertlik derecesi, pH'sı 6,5-7,5, akış hızı (su debisi) 0,2-0,3 lt/sn ve günlük su değişimi 25-26'dır. Havuzlardaki stok yoğunluğu 15 kg/m<sup>3</sup>, yemleme oranı % 4 ve yem değerlendirme oranı (Food Conversion Rate, FCR) 0,7'dir.

İşletmede gökkuşacağı alabalık yavrularına verilen pelet yem 1-1,5 mm uzunluğunda olup, yemin bileşiminde % 52 ham protein, % 2,5 ham selüloz, % 13 ham kül, % 18 ham yağ, % 2 lizin, % 1,5 metionin, % 0,5 sistin, % 1,5 kalsiyum, % 1,5 fosfor, % 0,2 sodyum, 20 000 IU/kg vitamin A, 6 000 IU/kg vitamin D<sub>3</sub>, 700 IU/kg vitamin E, 90 mg/kg vitamin K, 500 mg/kg vitamin C, 30 mg/kg vitamin B<sub>2</sub>, 0,02 mg/kg vitamin B<sub>12</sub>, 640 mg/kg inositol ve 2 000 mg/kg kolin bulunmaktadır.

#### **3.2. Enfekte Balıklarda Gözlenen Klinik Bulgular**

Hastalıklı gökkuşacağı alabalık yavrularının buldukları havuzlarda yapılan incelemelerde iştahsız, durgun ve su yüzeyinde yüzdükleri, ayrıca bazı balıkların spiral tarzda yüzdükleri ve denge problemi yaşadıkları görüldü. Öte yandan bazı balıklarda asitese bağlı olarak abdominal bölgede şişkinlik, deride pigmentasyon artışı (deri renginde kararma) ve birkaç balığın sırt yüzgeci bölgesinde beyaz renklenmelere bağlı lezyonların şekillendiği gözlemlendi (Şekil 3.1. ve 3.2.).

Gruplarda sağaltım süresince gözlenen klinik bulgular, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, oksitetrasiklin grubunda başlangıçta belirgin olmayan bir azalmanın olduğu, bunun diğer gruplarla karşılaştırıldığında ise oldukça düşük düzeylerde kaldığı belirlendi. Enfrofloksasin ve siprofloksasin gruplarında klinik bulguların ilk üç gün azaldığı, ancak bu günden sonra tekrar arttığı, florfenikol grubunda ise klinik bulgularda ilaç uygulamasının ikinci günü ile başlayan ve sağaltım süresi boyunca devam eden belirgin bir azalmanın şekillendiği gözlendi.



Şekil 3.1. Enfekte balıklarda gözlenen klinik bulgular, A: Asitese bağlı olarak abdominal bölgesi şişkin hastalıklı gökkuşadı alabalık yavrusu, B: Sağlıklı gökkuşadı alabalık yavrusu.



Şekil 3.2. Enfekte balıklarda gözlenen diğer klinik bulgular, A: Hastalıklı gökkuşadı alabalık yavrusunda oluşan yoğun pigmentasyon, B: Sağlıklı gökkuşadı alabalık yavrusu.

### 3.3. Enfekte Balıklarda Gözlenen Otopsi Bulguları

Enfekte gökkuşuğu alabalık yavrularının karaciğer, böbrek ve solungaçlarının solgun olduğu ve dalağın normal anatomik yapısından daha büyük bir hal aldığı tespit edildi. Asites gözlenen balıkların abdominal boşluklarında sarı renkli jelatinimsi bir sıvı birikiminin olduğu gözlemlendi.

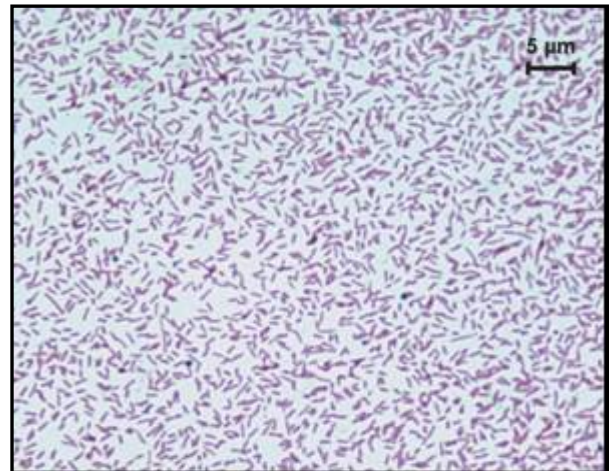
### 3.4. Bakteri Suşlarının Fenotipik ve Biyokimyasal Testleri

Bakteriyolojik ekim örnekleri için laboratuvara işletme suyu içerisinde canlı olarak getirilen hastalıklı gökkuşuğu alabalık yavrularının solungaç, karaciğer, böbrek, beyin, dalak, bağırsak ve lezyonlu bölgelerinden steril öze yardımıyla *Cytophaga* agara ekimler yapıldı. Ekimi yapılan besiyerleri 15-20 °C’de 48-96 saat inkübe edildi. İnkübasyon periyodu sonucunda “tavada pişmiş yumurta” görünümünü andıran sarı pigmentli koloniler elde edildi (Şekil 3.3.).

Üreyen kolonilerden Gram boyama yapıldı ve Gram boyama ile hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ve buna bağlı görüntü analiz sistemi yardımı ile incelendi. Ölçümler x100’lük objektif kullanılarak, görüntü analiz programı (Leica Q Win Standart) yardımıyla gerçekleştirildi. İncelenen preparattan uygun görülen kısımların fotoğrafları çekilerek 1,20-1,30 µm uzunluğunda, uçları yuvarlak ince çubuk tarzında Gram negatif *F. psychrophilum* etkenleri tespit edildi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.3. İnkübasyon sonucunda görülen sarı pigmentli koloniler.



Şekil 3.4. *F. psychrophilum* etkenlerinin ışık mikroskobik görüntüsü.

*F. psychrophilum* (NCIMB 1947) referans bakteri suşuna uygulanan identifikasyon testlerinde katalaz, sitokrom oksidaz ve fleksirubin pigment üretim testlerinin pozitif, O/F testi ile kongo kırmızısı ve sitrat testlerinin negatif olduğu, jelatini hidrolize ettiği ve karbonhidratlardan asit üretmediği tespit edildi. Etkenin % 0, % 0,5 ve % 1,5'lük NaCl içeren *Cytophaga* agarda ürettiği fakat % 3'lük NaCl içeren *Cytophaga* agarda üremediği, 5 °C'de gelişme gösterdiği fakat 37 °C'de gelişme göstermediği belirlendi. Çalışmada izole edilen ve Gram negatif olarak belirlenen suşlara identifikasyon testleri uygulandığında, katalaz ve sitokrom oksidaz testleri (Şekil 3.5. ve 3.6.) ile fleksirubin pigment üretim testlerinin pozitif olduğu belirlendi. Suşların jelatini hidrolize ettiği, karbonhidratlardan asit üretmediği, kongo kırmızısı ve sitrat testlerinin negatif olduğu ve O/F testi sonucunda beş suşun glikozu fermente ettiği, diğerlerinin ise glikozu kullanmadığı tespit edildi. Ayrıca izole edilen suşların % 0, % 0,5 ve %1,5'lük NaCl içeren *Cytophaga* agarda ürettiği fakat % 3'lük NaCl içeren *Cytophaga* agarda üremediği, suşların 5 °C'de gelişme gösterdiği fakat 37 °C'de gelişme göstermediği belirlendi (Çizelge 3.1.).



Şekil 3.5. Katalaz testinde meydana gelen gaz oluşumu.

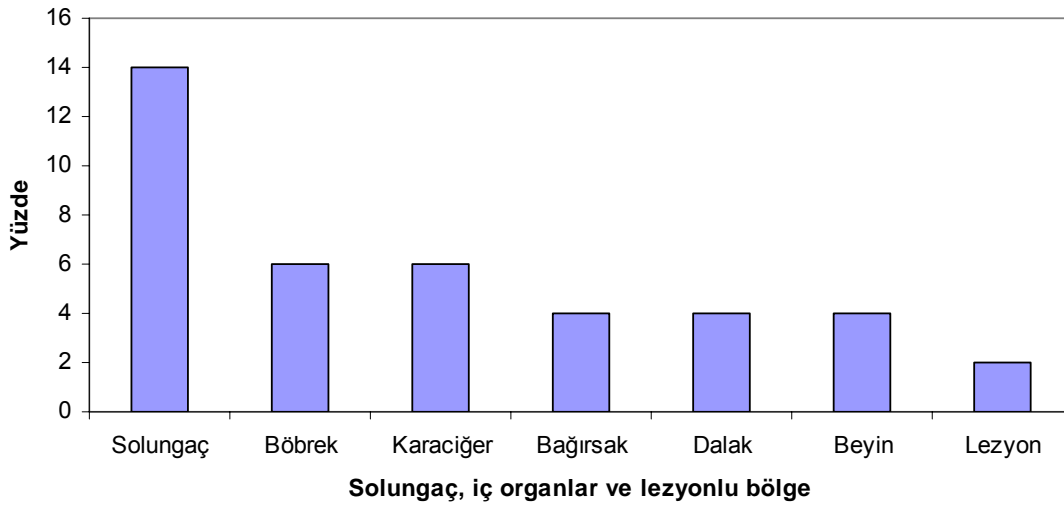


Şekil 3.6. Oksidaz test kitinde meydana gelen eflatun-mor renk oluşumu.

Suşların API ZYM enzim profiline bakıldığında alkalın fosfataz ve lökin arilamidaz testlerinin pozitif, esteraz lipaz ve valin arilamidaz testlerinin zayıf pozitif ve esteraz, lipaz, kistin arilamidaz, tripsin,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\beta$ -glukosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukozaminidaz,  $\alpha$ -mannosidaz ile  $\alpha$ -fukosidaz testlerinin negatif sonuç verdiği görüldü. Bununla birlikte asit fosfataz testinde 11 suşun pozitif ve naftol-AS-BI-fosfohidrolaz testinde iki suşun zayıf pozitif,  $\alpha$ -glukosidaz testinde 11 suşun

negatif sonuç verdiği belirlendi. *F. psychrophilum* referans bakteri suşunun ise asit fosfataz testinin pozitif, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz testinin zayıf pozitif ve  $\alpha$ -glukosidaz testinin negatif olduğu tespit edildi. Geriye kalan diğer testlerde, izole edilen bütün suşların referans bakteri suşu ile aynı sonucu verdiği belirlendi (Çizelge 3.2.).

Yapılan fenotipik ve biyokimyasal testlerin ardından, 50 adet hastalıklı gökkuşuğı alabalık yavrularının solungaçlarından yedi (% 14), böbrek ve karaciğer dokusundan üçer (% 6), bağırsak, dalak ve beyin dokusundan ikişer (% 4) ve lezyonlu bölgelerden bir adet (% 2) olmak üzere 20 (% 40) adet *F. psychrophilum* suşu izole edildi. Solungaçlardan izole edilenler A, böbrek dokusundan izole edilenler B, karaciğer dokusundan izole edilenler C, bağırsaklardan izole edilenler D, dalak dokusundan izole edilenler E, beyin dokusundan izole edilen suşlar F ve lezyonlu bölgeden izole edilen suş G grubunda bulunmak üzere sınıflandırdı (Çizelge 3.1. ve 3.2.). İzole edilen suşların yüzde dağılımı Şekil 3.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Solungaç, iç organlar ve lezyonlu bölgeden izole edilen *F. psychrophilum* suşlarının yüzde dağılımı.

Çizelge 3.1. İzole edilen suşların fenotipik ve biyokimyasal test özellikleri.

Fenotipik ve Biyokimyasal Özellikler	İzolatlar																					
	*	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	E	E	F	F	G
Gram reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz (sitokrom oksidaz)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S (hidrojen sülfür) üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat redüksiyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre hidrolizi (üreaz)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F testi	-	-	-/+	-/+	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-/+	-
Jelatin hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metil kırmızısı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fleksirubin tipi pigment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kongo kırmızısı testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat testi (Simmons)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSA'da üreme	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
PCA'da üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(\*); *F. psychrophilum* referans suşu, (+); pozitif, (-); negatif

Çizelge 3.1. *Devam* İzole edilen suşların fenotipik ve biyokimyasal test özellikleri.

Fenotipik ve Biyokimyasal Özellikler	İzolatlar																				
	*	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	E	E	F	F	G
MHA'da üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kanlı Agar'da üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5 °C'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37 °C'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 0'lık NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% 0,5'lik NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% 1,5'luk NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% 3'lük NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(\*); *F. psychrophilum* referans suşu, (+); pozitif, (-); negatif

Çizelge 3.2. İzole edilen suşların API ZYM enzim test sonuçları.

API ZYM profili	İzolatlar																				
	*	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	C	C	C	D	D	E	E	F	F	G
Alkalin fosfataz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esteraz (C 4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteraz lipaz (C 8)	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*
Lipaz (C 14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lökin arilamidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine arilamidaz	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	-	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*
Kistin arilamidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tripsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -kemotripsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	-
Asit fosfataz	+	+*	+*	+*	+	+	+	+	+	+*	+	+	+	+*	+*	+*	+	+	+*	+	+*
Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz	+*	+	+	+*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+*	+	+	-	+	+	+	+
$\alpha$ -galaktosidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -galaktosidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -glukuronidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -glukosidaz	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
$\beta$ -glukosidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-asetil- $\beta$ -glukosaminidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -mannosidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -fukosidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(\*); *F. psychrophilum* referans suşu, (+); pozitif, (+\*); zayıf pozitif, (-); negatif

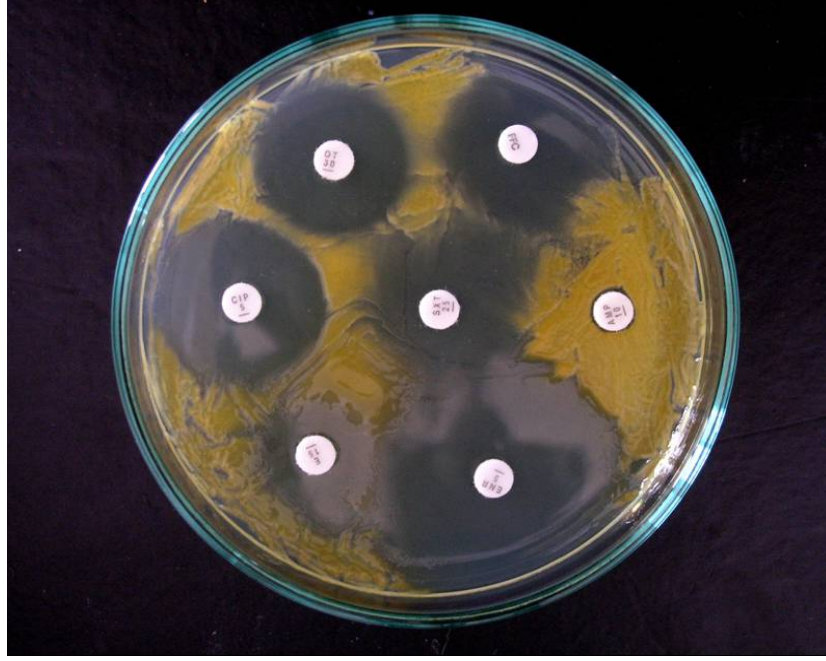


### 3.5. Bakteri Suşlarının Antibiyotik Duyarlılığı

İzole edilen *F. psychrophilum* suşlarının duyarlılık testinde Mueller-Hinton agar besiyeri kullanıldı (Bruun ve ark 2000, 2003) ve antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapıldı (Bauer ve ark 1966, Koneman ve ark 1997, Furones 2001). Antibiyogram testleri sonucu oluşan zon çapları (Şekil 3.8.), National Committee for Clinical Laboratory Standarts'ın (NCCLS 1993, 1994) belirlediği standartlara göre değerlendirildi (Çizelge 3.3.).

Etken izolasyonu ve identifikasyonunun ardından yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre, *F. psychrophilum* suşunun amoksisilin/klavulanik asite % 100, ampisiline % 95, gentamisine % 65, penisilin G'ye % 80 ve sülfametoksazol-trimetoprim % 95 direnç gösterdiği, eritromisine ise % 50 orta derecede duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen suşların oksitetrasikline % 55, enrofloksasin ve siprofloksasine % 100, florfenikole ise % 70 duyarlı olduğu belirlendi. *F. psychrophilum* referans suşunun ise amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, eritromisin, gentamisin, oksitetrasiklin, penisilin G ve sülfametoksazol-trimetoprim direnç gösterdiği, florfenikol, enrofloksasin ve siprofloksasine duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada solungaç, iç organlar ve lezyonlu bölgeden izole edilen mikroorganizmaların çeşitli antibakteriyallere karşı duyarlılık dereceleri Çizelge 3.4.'de ve izole edilen *F. psychrophilum* suşlarının antibakteriyallere karşı tespit edilen direnç durumlarının yüzde dağılımı Çizelge 3.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. İzole edilen *F. psychrophilum* suşlarının Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucu oluşan zon çapları.

Çizelge 3.3. Gram negatif mikroorganizmalara ait standart zon çapları (NCCLS 1993, NCCLS 1994).

Antibakteriyel ilaçlar ve disk içerikleri ( $\mu\text{g}$ /Ü)	İnhibisyon zon çapları (mm) / Gram negatif mikroorganizmalar		
	Dirençli $\leq$ mm (R)	Orta derece duyarlı mm (I)	Duyarlı $\geq$ mm (S)
Ampisilin (AMP) (10 $\mu\text{g}$ )	13	14-16	17
Amoksisilin/Klavulanik asit (AMC) (30 $\mu\text{g}$ )	14	15-19	20
Enrofloksasin (ENR) (5 $\mu\text{g}$ )	15	16-20	21
Eritromisin (E) (15 $\mu\text{g}$ )	13	14-22	23
Florfenikol (FFC) (30 $\mu\text{g}$ )	14	15-18	19
Gentamisin (CN) (10 $\mu\text{g}$ )	12	13-14	15
Oksitetrasiklin (OT) (30 $\mu\text{g}$ )	14	15-18	19
Penisilin G (P) (10 Ünite)	14	-	15
Siprofloksasin (CIP) (5 $\mu\text{g}$ )	15	16-20	21
Sülfametoksazol-Trimetoprim (SXT) (25 $\mu\text{g}$ )	10	11-15	16

R: Dirençli, I: Orta Derecede Duyarlı, S: Duyarlı

Çizelge 3.4. Solungaç, iç organlar ve lezyonlu bölgeden izole edilen *F. psychrophilum* şuşlarının antibakteriyallere karşı tespit edilen direnç durumları (n=20).

Antibakteriyeller	İzole edilen <i>F. psychrophilum</i> şuşlarının antibakteriyallere direnç durumları																				
	Solungaç (n=7)			Böbrek (n=3)			Karaciğer (n=3)			Bağırsak (n=2)			Dalak (n=2)			Beyin (n=2)			Lezyon (n=1)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
<b>Ampisilin</b>	7			3			3			2			2			1	1		1		
<b>Amoksisilin/klavulanik asit</b>	7			3			3			2			2			2			1		
<b>Enrofloksasin</b>			7			3			3			2			2			2			1
<b>Eritromisin</b>	4	3			2	1	1	2		1	1			2		2			1		
<b>Florfenikol</b>	2		5	1	1	1	3					2		1	1	1	1		1		
<b>Gentamisin</b>	6		1	2		1	3			1		1	2					2	1		
<b>Oksitetrasiklin</b>	2		5	1		2		2	1			2		1	1	1	1			1	
<b>Penisilin G</b>	5		2	3			3			1		1	2			1		1	1		
<b>Siprofloksasin</b>			7			3			3			2			2			2			1
<b>Sülfametoksazol-Trimetoprim</b>	7			2	1		3			2			2			2			1		

R: Dirençli, I: Orta Derecede Duyarlı, S: Duyarlı

Çizelge 3.5. İzole edilen *Flavobacterium psychrophilum* şuşlarının antibakteriyallere karşı tespit edilen direnç durumlarının yüzde dağılımı.

Antibakteriyeller	İzole edilen <i>F. psychrophilum</i> şuşlarının yüzde dağılımı (n=20)					
	R		I		S	
	sayı	yüzde	sayı	yüzde	sayı	yüzde
<b>Ampisilin</b>	19	95	1	5	0	0
<b>Amoksisilin/klavulanik asit</b>	20	100	0	0	0	0
<b>Enrofloksasin</b>	0	0	0	0	20	100
<b>Eritromisin</b>	9	45	10	50	1	5
<b>Florfenikol</b>	6	30	0	0	14	70
<b>Gentamisin</b>	13	65	1	5	6	30
<b>Oksitetrasiklin</b>	4	20	5	25	11	55
<b>Penisilin G</b>	16	80	0	0	4	20
<b>Siprofloksasin</b>	0	0	0	0	20	100
<b>Sülfametoksazol-Trimetoprim</b>	19	95	1	5	0	0

R: Dirençli, I: Orta Derecede Duyarlı, S: Duyarlı

### 3.6. Antibakteriyel İlaç Uygulaması

Enfeksiyonun etken izolasyonu ve identifikasyonunun ardından yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre, *F. psychrophilum* suşunun amoksisilin/klavulanik asite % 100, ampisiline % 95, gentamisine % 65, penisilin G'ye % 80 ve sülfametoksazol-trimetoprim % 95 direnç gösterdiği, eritromisine ise % 50 orta derecede duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen suşların oksitetrasikline % 55, enrofloksasin ve siprofloksasine % 100, florfenikole ise % 70 duyarlı olduğu belirlendi. Bu yüzden sağaltım grupları bu dört antibiyotik seçilerek oluşturuldu. Bu amaçla biri kontrol olmak üzere beş ayrı havuz ve her bir havuzda yaklaşık 25 000 adet olmak üzere toplamda da yaklaşık 125 000 doğal enfekte gökkuşuğu alabalık yavrusu kullanılarak sağaltıma başlandı. Kontrol grubuna sadece mısır yağı ile nemlendirilmiş pelet yem verildi. Sağaltım gruplarına ise, peletler mısır yağı ile nemlendirildikten sonra, enrofloksasin, siprofloksasin ve florfenikol 10'ar mg/kg/gün dozda, oksitetrasiklin ise 75 mg/kg/gün dozda ve her biri 10'ar gün süreyle uygulandı.

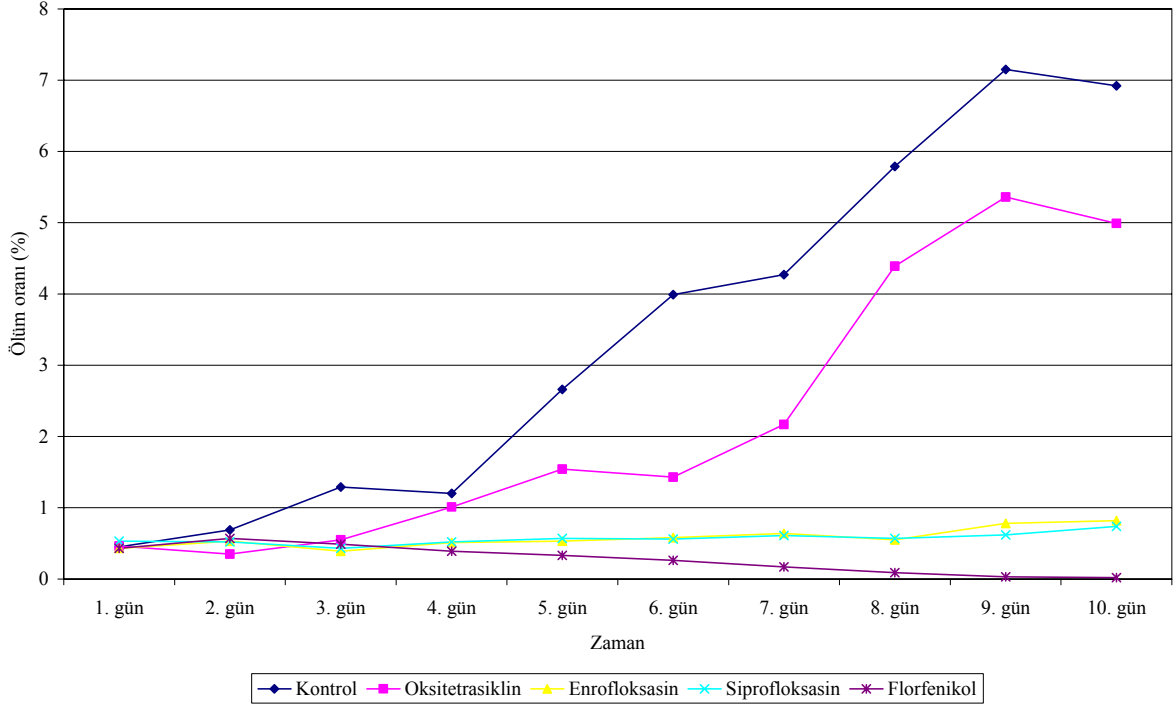
Çalışma kapsamında, antibiyotik uygulama sonrası şekillenen gökkuşuğu alabalık yavrularının ölüm sayıları ve yüzde oranları Çizelge 3.6.'da ve zamana bağlı değişim grafiği de Şekil 3.9.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Gökkuşacağı alabalık yavrularında antibiyotik uygulama sonrası şekillenen ölüm sayıları ve yüzde oranları.

Zaman		Gruplar									
		Kontrol		Oksitetrasiklin		Enrofloksasin		Siprofloksasin		Florfenikol	
		ÖS	yüzde*	ÖS	yüzde*	ÖS	yüzde*	ÖS	yüzde*	ÖS	yüzde*
Uygulama sonrası	1. gün	112	0,45	114	0,46	106	0,43	130	0,53	106	0,43
	2. gün	168	0,69	86	0,35	132	0,53	129	0,52	142	0,57
	3. gün	312	1,29	135	0,55	96	0,39	106	0,43	121	0,49
	4. gün	286	1,20	243	1,01	126	0,51	126	0,52	96	0,39
	5. gün	615	2,66	367	1,54	130	0,53	137	0,57	81	0,33
	6. gün	887	3,99	335	1,43	140	0,58	136	0,56	63	0,26
	7. gün	911	4,27	496	2,17	156	0,64	146	0,61	41	0,17
	8. gün	1167	5,79	963	4,39	133	0,55	137	0,57	22	0,09
	9. gün	1346	7,15	1114	5,36	187	0,78	148	0,62	8	0,03
	10. gün	1217	6,92	988	4,99	195	0,82	174	0,74	6	0,02
Toplam Ölümler		<b>7021</b>	<b>28,08</b>	<b>4841</b>	<b>19,36</b>	<b>1401</b>	<b>5,60</b>	<b>1369</b>	<b>5,47</b>	<b>686</b>	<b>2,74</b>

ÖS; Ölü sayısı

Yüzde\*; O günkü canlı alabalık sayısı üzerinden hesaplanan yüzdeler.



Şekil 3.9. Gökkuşacağı alabalık yavrularında antibiyotik uygulama sonrası şekillenen ölüm oranlarının zamana bağlı değişim grafiği.

Çalışmada ölüm oranları dikkate alındığında sağaltımının ikinci gününde oksitetrasiklin grubu dışındaki diğer gruplarda ölüm sayısının oldukça yüksek olduğu ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı bir fark yarattığı belirlenmiştir ( $\chi^2_{yates}=14,57$ ,  $SD=3$ ,  $P<0,005$ ). Sağaltımın üçüncü gününde oksitetrasiklin uygulanan grupta da ölümlerin artmasına rağmen kontrol grubunun diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir ( $\chi^2=209,616$ ,  $SD=4$ ,  $P<0,001$ ). Antibiyotik sağaltımının dördüncü gününde ise florfenikol grubu dışındaki diğer gruplarda ölüm sayıları artmasına rağmen, sadece kontrol ( $\chi^2=160,685$ ,  $SD=3$ ,  $P<0,001$ ) ve oksitetrasiklin uygulanan gruplardaki ( $\chi^2_{yates}=85,17$ ,  $SD=3$ ,  $P<0,001$ ) ölüm sayılarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Uygulama sonrası meydana gelen toplam ölümler değerlendirildiğinde, enrofloksasin ve siprofloksasin uygulanan gruplardaki ölüm sayıları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $\chi^2_{yates}=0,36$ ,  $SD=1$ ,  $P>0,05$ ). Diğer gruplarda ise öncelikle kontrol grubu ( $\chi^2=11200,55$ ,  $SD=4$ ,  $P<0,001$ ), daha sonra oksitetrasiklin uygulanan grup ( $\chi^2_{yates}=5534,4$ ,  $SD=3$ ,  $P<0,001$ ) ve son olarak da florfenikol uygulanan gruptaki ( $\chi^2_{yates}=296,04$ ,  $SD=2$ ,  $P<0,001$ ) ölüm sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır (SD: serbestlik derecesi).

Antibiyotik uyulama öncesi meydana gelen toplam ölüm sayıları ve oranları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda 397 (% 1,58), oksitetrasiklin grubunda 372 (% 1,48), enrofloksasin grubunda 373 (% 1,49), siprofloksasin grubunda 434 (% 1,73) ve florfenikol grubunda 365 (% 1,46)'tir. Gökkuşuğu alabalık yavrularında klinik bulgular ve ölüm oranları göz önüne alındığında, sağaltımın birinci gününde uygulama gruplarındaki antibiyotiklerin meydana gelen ölümleri baskılayamadığı, kontrol grubuyla kıyaslandığında oksitetrasiklin uygulamalarının sağaltımın ikinci gününde ölüm oranını düşürmesine rağmen (% 0,35) etkin bir sağaltım için yeterli düzeyde olmadığı, enrofloksasin ve siprofloksasin uygulamalarının başlangıçta belirgin bir sağaltım etkinliği sağladıkları, fakat dördüncü günden itibaren (% 0,51 ve % 0,52) bu etkilerinin azaldığı tespit edilmiştir. Florfenikol uygulamalarının ise diğer gruplara göre enfeksiyonu kontrol altına almada oldukça etkin olduğu ve üçüncü günden itibaren ölüm oranlarını belirgin bir şekilde düşürdüğü (% 0,49) tespit edilmiştir. Sağaltım süresi sonunda meydana gelen toplam ölümler değerlendirildiğinde oksitetrasiklin uygulanan gruptaki ölümlerin kontrol grubuyla kıyaslandığında oldukça yüksek olduğu, enrofloksasin ve siprofloksasin uygulanan gruptaki ölümlerin birbirine yakın ve düşük olduğu, florfenikol uygulanan gruptaki ölümlerin ise tamamen azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 3.6. ve Şekil 3.9.).

## 4. TARTIŞMA

### 4.1. Enfekte Balıklarda Gözlenen Klinik Bulgular ve Otopsi Bulguları

Hastalıklı gökkuşığı alabalık yavrularında görülen iştahsızlık, durgunluk, havuz tabanına doğru spiral tarzda ve su yüzeyinde yüzme, asites ve deri renginde meydana gelen kararma Wiklund ve ark (1994), Ostland ve ark (1997) ile Branson (1998)'un bildirdiği klinik bulgularla aynıdır. Hastalıktan etkilenen balıkların sırt yüzgeci ve kuyruk yüzgecinde beyaz renklenmelerin şekillendiği, beyaz renklenmelerin burada nekroz odaklarına ve kas dejenerasyonlarına neden olduğu belirtilmiştir (Erer 2002, Ekman 2003, Timur ve ark 2004). Bu çalışmada da birkaç alabalık yavrusunun sırt yüzgecinde beyaz renklenmelere bağlı lezyonların şekillendiği tespit edilmiş ve buradan da etken izolasyonuna gidilmiştir.

Madsen ve ark (2001) *F. psychrophilum*'un balıklarda spinal deformasyonlara neden olduğunu bildirmiş, bu çalışmada da etkenin izole edildiği bazı enfekte alabalık yavrularında aynı bulgu gözlenmiştir. Ayrıca Ostland ve ark (1997) ile LaFrentz ve Cain (2004), spiral tarzda yüzme hareketlerinin meningitis sonucu oluştuğunu bildirdiklerinden, beyin dokusundan ve bununla birlikte solungaç yayları ile sekonder lamellalarda etkene rastlanabildiğinden (Cipriano ve Holt 2005) solgun olan solungaç dokusundan da etken izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Enfekte gökkuşığı alabalık yavrularında görülen karaciğer, böbrek ve dalak dokusundaki solgunluk ile splenomegali ve asites Wiklund ve ark (1994), Branson (1998) ile Nematollahi ve ark (2003)'nın belirttiği otopsi bulgularıyla uyumaktadır. İç organlardan da belirtilen bulgulara bağlı olarak etken izolasyonuna gidilmiştir. Alabalık yavrularının otopsisinde bağırsakların konjesyonlu ve çevresinin sarı-beyaz renkte olduğu gözlemlenmiş, bu yüzden bağırsaklardan da etken izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



## 4.2. Bakteri Suşlarının Fenotipik ve Biyokimyasal Özellikleri

Mikrobiyolojik etken izolasyonu ve identifikasyonunda spesifik besiyeri olan *Cytophaga* agara ekimler yapılmıştır (Wiklund ve ark 1994, Evensen ve Lorenzen 1996, Daskalov ve ark 1999, Dalgaard 2001, Shotts ve Starliper 2003). Bruun ve ark (2000), *F. psychrophilum*'un izolasyonunda Mueller-Hinton agarın da kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Bunun dışında etkenin kanlı agar, TSA, tryptone yeast extract (TYE) ve tryptone yeast extract salts (TYES) besiyerlerinde de ürediği bildirilmiştir (Wiklund ve ark 1994, Dalgaard ve Madsen 2000, Korun ve Timur 2001, Madetoja ve ark 2001, Diler ve ark 2003, Bruun ve ark 2003, LaFrentz ve Cain 2004, Madsen ve ark 2005). Ancak etkenin TSA'da ve kanlı agarda üremediğine dair literatürler de bulunmaktadır (Nematollahi ve ark 2003). Etkenin plate count agar (PCA)'da ürediğinde dair literatür bilgisine ulaşamamıştır. Bu çalışmada identifikasyon amacıyla 20 suşun hepsinin *Cytophaga* agar, PCA, Mueller-Hinton agar ve kanlı agarda ürediği, beş tanesinin ise TSA'da üremediği tespit edilmiştir. *F. psychrophilum* referans suşunun ise identifikasyon amacıyla kullanılan beş agar ortamında ürediği belirlenmiştir.

Etkenin 48-96 saat ve 15-20 °C'de inkube edildikten sonra katı besiyerinde açık sarı parlak, konveks, ince, yaygın ve sınırları belli belirsiz koloniler oluşturduğu ve 1,20-1,30 µm uzunluğunda Gram negatif bakteri olduğu belirlendi. Bu bulgular Wiklund ve ark (1994), Lorenzen ve ark (1997), Bowser (1999), Dalsgaard ve Madsen (2000), Korun ve Timur (2001), Nematollahi ve ark (2003), Diler ve ark (2003), İspir ve ark (2004), Cipriano ve Holt (2005)'un elde ettiği bulgularla uyum sağlamaktadır.

Hasta gökkuşağı alabalık yavrularından izole edilen suşların “tavada pişmiş yumurta” görünümünde tipik koloniler oluşturması, jelatin hidrolizinin ve fleksirubin tipi pigment üretiminin pozitif, kongo kırmızısı testi ve karbonhidratlardan asit üretiminin negatif olması gibi başlıca ayırt edici testler, *F. psychrophilum*'un identifikasyonunda önemli rol oynamıştır (Wiklund ve ark 1994, Rangdale ve ark 1996, Lorenzen ve ark 1997, Madetoja ve ark 2001, Korun ve Timur 2001, Cipriano ve Holt 2005).

Cipriano ve Holt (2005) ile Didinen ve ark (2007), *F. psychrophilum*'un identifikasyonunda O/F testinin negatif olduğunu, İspir ve ark (2004) ise oksidasyon testinin negatif ve fermantasyon testinin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Bu yüzden yapılan çalışmada glikozu fermente eden beş suş ile glukozu fermente etmeyen diğer suşlar

değerlendirmeye alınmıştır. *F. psychrophilum* referans bakteri suşunun ise O/F testinin negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir. İzole edilen bütün suşların oksidaz testinin pozitif olduğu belirlenmiştir. Ancak yapılan çalışmalarla oksidaz testi negatif (Diler ve ark 2003, Korun ve Timur 2001, Didinen ve ark 2007), zayıf pozitif (Lorenzen ve ark 1997, Madetoja ve ark 2001, Ekman 2005) pozitif (Bernardet ve Kerouault 1989, Ostland ve ark 1997, Elsayed ve ark 2006) olarak rapor edilmiştir. Bu durum *F. psychrophilum* suşları arasında fenotipik farklılıklar gösterebileceği görüşünü desteklemektedir (Madetoja ve ark 2001).

Lorenzen ve ark (1997), izole ettikleri 32 suşun 25 °C'de ümediğini bildirmişlerdir. Bernardet ve Kerouault (1989) ise izole ettikleri etkenlerin aynı sıcaklıkta seyrek olarak ümediğini, 25 °C'nin üzerinde ümediğini ifade etmişlerdir. Lorenzen ve ark (1997), Holt'un izole ettiği 25 izolattan 18'inin 25 °C'de seyrek olarak ümediğini fakat 30 °C'de ümediğini, Schmidtke ve Carson (1995) ise 20 izolattan 18'inin 25 °C'de seyrek olarak ümediğini fakat 30 °C'de ümediğini bildirmişlerdir. Dalsgaard ve Madsen (2000) etkenin 5 °C, 15 °C, 20 °C ve 25 °C'de ümediğini tespit etmişlerdir. Bu durum *F. psychrophilum*'un 25 °C'nin üzerinde güç ümediği sonucunu göstermektedir. Bu çalışmada da izole edilen suşlar ile *F. psychrophilum* referans bakteri suşunun 5 °C'de ve 15-20 °C arasında ümediği, 37 °C'de üyemediği belirlenmiştir.

Çalışmada izole edilen suşlar ile *F. psychrophilum* referans suşunun % 0, % 0,5 ve % 1,5'lük NaCl'de ümediği, % 3'lük NaCl'de ümediği tespit edilmiştir. Lorenzen ve ark (1997), % 1'lik NaCl'de etkenin üremesine rağmen, % 2'lik NaCl'de ümediğini, Diler ve ark (2003) etkenin % 0,5'lik NaCl'de ümediğini, % 1'lik ve % 2'lik NaCl'de ümediğini bildirmişler, Nematollahi ve ark (2003) ise etkenin % 0,8-1'lik ve % 2'lik NaCl'de ümediğini rapor etmiştir.

RTFS'ye neden olan *F. psychrophilum* suşlarının API ZYM test sonuçlarına bakıldığında; alkalın fosfataz, esteraz, esteraz lipaz, lipaz, lökin arilamidaz, kistin arilamidaz, tripsin,  $\alpha$ -kemotripsin,  $\alpha$ -galaktosidaz,  $\beta$ -galaktosidaz,  $\beta$ -glukuronidaz,  $\alpha$ -glukosidaz,  $\beta$ -glukosidaz, N-asetil- $\beta$ -glukozaminidaz,  $\alpha$ -mannosidaz ile  $\alpha$ -fukosidaz testlerinin *F. psychrophilum* referans bakteri suşuna uygulanan testlerle ve yapılan çalışmalarla uyum gösterdiği belirlenmiştir (Ostland ve ark 1997, Madetoja ve ark 2001, Didinen ve ark 2007). Ancak naftol-AS-BI-fosfohidrolaz testi yönünden 17 suşun pozitif, iki suşun zayıf pozitif ve bir suşun negatif olduğu belirlendi. Madetoja ve ark (2001), *F. psychrophilum* suşlarının

naftol-AS-BI-fosfohidrolaz enzimini ürettiklerini, Ostland ve ark (1997) ise bu enzim yönünden negatif olduklarını, Didinen ve ark (2007) ise izole ettikleri suşların zayıf pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada valin arilamidaz testi yönünden, izole edilen suşlar ile *F. psychrophilum* referans bakteri suşunun zayıf pozitif oldukları belirlenmiştir. Ostland ve ark (1997) ile Didinen ve ark (2007) ise *F. psychrophilum*'un valin arilamidaz üretimi yönünden negatif olduğunu, Madejota ve ark (2001) ise pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte asit fosfataz ve  $\alpha$ -glukosidaz testinde 11, naftol-AS-BI-fosfohidrolaz testinde iki suşun *F. psychrophilum* referans bakteri suşuna uygulanan testlerle uyum gösterdiği tespit edilmiştir.

Belirtilen bazı sonuçların yapılan diğer çalışmalardan farklı olmasıyla birlikte, birçok bulgunun benzer olması, coğrafik bölgelere göre RTFS'ye neden olan *F. psychrophilum* suşları arasında biyokimyasal farklılığın olabileceği görüşünü desteklemekte (Lorenzen ve ark 1997, Madejota ve ark 2001) ve referans bakteri suşu ile karşılaştırıldığında izole edilen suşların *F. psychrophilum* olduğunu göstermektedir.

#### **4.3. Bakteri Suşlarının Antibiyotik Duyarlılığı**

Sağaltımda uygulanacak antibiyotiklerin farmakokinetikleri, etki şekilleri ve etki güçlerinin farklı olması, ayrıca etkenin direnç kazanabilme yeteneğinin olması RTFS'nin sağaltımında kullanılacak antibiyotik ve sağaltım yönteminin seçilmesi açısından önemli rol oynamaktadır. Güvenilir bir sağaltım, antibiyotik etkinlik testlerinin sonuçlarına göre yapılmaktadır (Kaya 2002). Bruun ve ark (2003), balık yetiştiriciliği yapılan işletmelerde meydana gelen salgın hastalıklar karşısında antibiyotik duyarlılık testlerinin önemli bir rol oynadığını, özellikle *F. psychrophilum*'un duyarlılık testinde besiyeri seçiminin de önemli olduğunu vurgulamıştır.

*F. psychrophilum*'un izolasyonunda ve antibiyotik duyarlılık testinde Mueller-Hinton agar besiyeri kullanılarak (Bruun ve ark 2000, 2003) Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine (Bauer ve ark 1966, Koneman ve ark 1997, Furones 2001) göre yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda, izole edilen 20 suşun amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, gentamisin, penisilin G ve sülfametoksazol-trimetoprima dirençli, eritromisine orta derece de duyarlı, oksitetrasiklin, enrofloksasin, siprofloksasin ve florfenikol duyarlı olduğu belirlendi.

İzole edilen suşların penisilin ve trimetoprime direnç göstermesi, oksitetrasiklin ve siprofloksasine duyarlılık göstermesi ülkemizde izole edilen *F. psychrophilum* suşlarına uygulanan antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir (Korun ve Timur 2001, Diler ve ark 2003, İspir ve ark 2004, Timur ve ark 2004, Didinen ve ark 2006). Araştırmacılar izole ettikleri etkenlerin amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, eritromisin ve gentamisine ise duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Bu durum ülkemizde coğrafik bölgelere göre izole edilen *F. psychrophilum* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıklarının farklı olabileceğini ya da izole edilen suşların antibiyotiklere direnç kazanmış olabileceğini göstermektedir. Hatta Didinen ve ark (2007) yaptıkları çalışmada, farklı işletmelerden izole edilen suşlar ile aynı işletmenin farklı havuzlarından izole edilen suşların da antibiyotiklere olan duyarlılıklarının farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir.

Wiklund ve ark (1994), *F. psychrophilum*'un tetrasikline duyarlı, trimetoprim ve sülfonamidlere dirençli olduğunu, Patricio ve ark (1995) sülfamometoprim ve penisiline duyarlı, Branson (1998) ise etkenin enrofloksasin, sarafloksasin ve florfenikole duyarlı olduğunu bildirmiştir. Akinbowale ve ark (2006) barramundi balığının (*Lates calcarifer*) solungaç ve sazan balığının (*Cyprinus carpio*) derisinden *Flavobacterium spp.* izole ederek, her iki izolatin siprofloksasin ve sefoperazona duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. İzolatlarından bir tanesinin amoksisilin, tetrasiklin, trimetoprim, sülfametoksazol ve sülfametoksazol-trimetoprime, her iki izolatin ampisilin, florfenikol, gentamisin, eritromisin ve oksitetrasikline dirençli olduğu belirtilmiştir. Antibiyogram sonuçlarının izole edilen suşlara göre değişkenlik göstermesi, suşların karakterizasyonunun izole edilen ülkelere göre değişebilmesine bağlı olabileceği gibi, etkenin sağaltımda uygulanan antibiyotiklere direnç kazanmış olmasına da bağlı olabilir.

#### **4.4. Antibakteriyel İlaç Sağaltımı**

Çalışmamızda yapılan antibiyogram testi sonucunda, izole edilen suşların oksitetrasiklin ve florfenikole olan duyarlılıklarının farklılıklar göstermesine ve enrofloksasin ile siprofloksasine olan duyarlılıklarının % 100 olmasına rağmen, florfenikol dışında sağaltımda kullanılan diğer antibiyotikler ile etkili bir sonuç alınamadığı belirlenmiştir (Çizelge 3.5.). Bu sonuç izole edilen suşların duyarlılıklarının, sağaltımda kullanılan antibiyotiklere göre değişebileceğini göstermektedir. Branson (1998), antibiyotik duyarlılık testinde

*F. psychrophilum*'un enrofloksasin, sarafloksasin ve florfenikole duyarlı olmasına rağmen, sağaltım yönünden etkin olan antibiyotiğin enrofloksasin olduğunu belirtmiştir. Lorenzen ve ark (1997) ile Rangdale ve ark (1997), elde edilen antibiyogram sonuçlarının *in vivo* uygulamalarda sağaltım etkinliği açısından aynı sonuçları yansıtmadığını bildirmişlerdir.

*In vitro* koşullarda gerek oksitetrasiklinin gerekse kinolon grubu antibiyotiklerin *F. psychrophilum*'a duyarlılık göstermesine rağmen, *in vivo* koşullarda bu antibiyotiklerin sağaltım etkinliğini sağlayamamasının nedeni, kelasyona veya etkenin uygulanan antibiyotiklere direnç kazanmış olmasına bağlı olabilir. Ayrıca, *in vitro* olarak hastalık etkenine karşı etkili olan bir antibiyotiğin *in vivo* olarak etkisiz kalması veya yeterince etkili olamamasının nedenleri; uygulanan antibiyotik miktarının yetersiz kalmasına bağlı olarak alabalık yavrularında sağaltım etkinliği oluşturmaması, alabalık yavrularında sağaltım dozunda uygulanan antibiyotiğin tüketilemeyecek derecede hastalığın ilerlemesi, birçok patojen balık bakterisinin ortama katılması veya immun sistemin baskı altına alınmış olması olabilir.

Antibiyogram sonuçlarına göre uygulanan oksitetrasiklinin, *in vivo* uygulamalarda etkin bir sağaltım gösterememesinin nedeni, oksitetrasiklinin gökkuşağı alabalıklarındaki farmakokinetik profili ve biyoyararlanımının farklı olmasıdır (Bruun ve ark 2003). RTFS ile birlikte diğer balık hastalıklarında da kullanılan oksitetrasiklinin ağızdan yapılan uygulamalarında suyun yapısına (sıcaklık, pH, sertlik derecesi gibi) bağlı olarak bağırsaklardan emiliminin oldukça düşük düzeylerde olabileceği bildirilmiştir (Grondel ve ark 1987, Björklund ve ark 1990).

Oksitetrasiklinin tatlı su gökkuşağı alabalıklarındaki biyoyararlanımı % 8 iken, tuzlu su atlantik salmon balıklarındaki biyoyararlanımı % 2'dir. Biyoyararlanımın tuzlu su balıklarında bu kadar düşük olmasının nedeni, ozmoregülasyona bağlı olarak balık bağırsağında  $Ca^{+2}$  (kalsiyum) ile  $Mg^{+2}$  (magnezyum) iyonlarının fazla olması ve tetrasiklinlerin iki ve üç değerlikli katyonlarla kelat oluşturabilmesinden kaynaklanmaktadır (Burka ve ark 1997, Storey 2005). Ayrıca  $Ca^{+2}$  ile  $Mg^{+2}$  iyonlarınca zengin olan sularda banyo tarzında yapılan oksitetrasiklin uygulamalarında, oksitetrasiklinin etkinliğinin azaldığı bildirilmiştir (Yanong 2006). Bu çalışmada oksitetrasiklinin sağaltımın ikinci gününde meydana gelen ölümleri düşürmesine rağmen, sağaltım etkinliğinin düşük düzeylerde kalması belirtilen nedenlerden kaynaklanıyor olabilir.

İntrasellüler bir etken olan *F. psychrophilum*, yavru alabalıkların dalak dokusundaki fagositlerinde görülebilmektedir (Docostere 2001, Cipriano ve Holt 2005). Dolayısıyla RTFS enfeksiyonunun sağaltımında hücre içi yerleşim gösteren enrofloksasin ve siprofloksasin gibi kinolon grubu antibiyotiklerin kullanılmasıyla etkili sonuç alınabileceği düşünülmüş ve yapılan antibiyogram testinde de izole edilen suşların her iki antibiyotiğe % 100 duyarlı oldukları görülmüştür. Ancak enrofloksasin ve siprofloksasinin başlangıçta belirgin bir sağaltım etkinliği sağlarken üçüncü günden sonra bu etkisinin azaldığı tespit edilmiştir. Uygulama sonrası meydana gelen toplam ölümler değerlendirildiğinde de enrofloksasin ve siprofloksasin uygulanan gruplardaki ölüm sayıları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $P>0,05$ ).

Kinolon grubu antibiyotiklerin sağaltım etkinliği sağlayamamasının nedeni, bu gruptaki antibiyotiklerin farmakokinetiklerinin suyun sıcaklığına ve tuzluluk oranına göre değişkenlik göstermesi olabilir. Çünkü ozmoregülasyona bağlı olarak, tuzlu su balıklarının sindirim sistemlerinde bulunan  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonları ile kinolon grubu antibiyotiklerin kelat oluşturması emilimlerini azaltır (Burka ve ark 1997, Storey 2005). Örneğin, oksolinik asitin tatlı su atlantik salmon balıklarındaki yarılanma ömrü tuzlu suda yaşayanlara göre 6 kat daha fazladır. Ayrıca aynı dozda uygulanan oksolinik asit ve difloksasinin serum konsantrasyonları tatlı su balıklarında, tuzlu su balıklarına göre 2-5 kat daha yüksek bulunmuştur (Burka ve ark 1997). Bununla birlikte farmakokinetik çalışmalarda kinolon grubu antibiyotiklerin balık dokusuna iyi penetre oldukları ve flumequin ile enrofloksasinin kinetik parametre sonuçlarının oksolinik aside göre daha iyi olduğu belirtilmektedir (Martinsen ve Horsberg 1995, Storey 2005). Bu yüzden suda yüksek düzeyde katyonik iyonların bulunduğu varsayılarak, bu iyonların enrofloksasin ve siprofloksasinin bağırsaklardan emilimini engellediği ve balıklardaki biyoyararlanım oranını ve sonuçta da sağaltım etkinliğini düşürdüğü söylenebilir.

Kinolon grubu antibiyotiklerin etkinliği ortamın pH'sına bağlı olarak da değişmektedir. Etki güçleri ortamın pH'sı düştükçe ( $<7,0$ ) azalır, pH yükseldikçe ( $>7,4$ ) artar (Kaya 2002). İşletmedeki su pH'sının 6,5-7,5 arasında olmasına rağmen, enrofloksasin ve siprofloksasinin sağaltım etkinliğinin florfenikole göre düşük kalmasının nedeni işletmenin su pH'sının 7,0'ın altında olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda izole edilen suşların % 70'inin florfenikole duyarlı olmasına rağmen, uygulanan diğer antibiyotiklere göre, enfeksiyonu kontrol altına almada oldukça etkin olduğu ve ikinci günden sonra meydana gelen ölümleri belirgin bir şekilde düşürdüğü tespit edilmiştir. Bunun nedeni florfenikolün hoş giden bir lezzeti olmasından dolayı balıklar tarafından kolayca tüketilmesine (Shering-Plough 2006) bağlı olabildiği gibi, direnç kazanma mekanizmasının henüz gelişmemiş olmasına da bağlı olabilir.

Oksitetrasiklinin tatlı su gökkuşağı alabalıklarında biyoyararlanımı % 7-8 (Cravedi ve ark 1994) ve enrofloksasinin % 25-45'tir (Bowser ve ark 1992). Çalışmada uygulanan diğer antibiyotiklere göre biyoyararlanımının yüksek olması (% 95) ve vücuttan atılımının yavaş olması ( $t_{1/2}$ = 12 saat), florfenikolün sağaltım etkinliğini arttıran unsurlar arasında gösterilebilir.

Florfenikolün sarıkuyruk balıklarında (*Seriola quinqueradiata*) psödötuberkülozis, kanal yayın balıklarında (*Ictalurus punctatus*) edwardsiellozis, altın balıklarında (*Carassius auratus*) vibriosis ve atlantik salmon balıklarında furunkulozis (Park ve ark 2006) sağaltımında kullanıldığı bildirilmiştir. Bu çalışma florfenikolün gökkuşağı alabalık yavrularında *F. psychrophilum*'un neden olduğu RTFS enfeksiyonunun sağaltımında da güvenle kullanılabilceğini göstermektedir.

#### 4.5. Antibakteriyel Direnç Gelişimi

Bakteriyel balık hastalıklarında birçok antibiyotik tek başına veya kombine edilerek kullanılması ve bunların hastalıkların kesin teşhisi yani etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılmadan bilinçsizce ve yaygın bir şekilde kullanılması, dirençli bakteri suşlarının gelişmesine neden olmaktadır (Bowser 1999, Midtlyng 2002).

Yapılan çalışmalar *F. psychrophilum*'un antibiyotik dirençliliğinin in vitro şartlarda ortaya koyulduğunu göstermektedir (Bruun ve ark 2003).

Kültür balıkçılığında bakteriyel enfeksiyonlara karşı oksitetrasiklinin yaygın olarak kullanıldığı ancak ilaca karşı direnç de gelişebileceği belirtilmiştir (Herman ve Bullock 1986, Supriyadi ve ark 1992). Danimarka'da meydana gelen RTFS enfeksiyonunda oksitetrasiklin uygulamaları sonucunda mortalite oranının düşmesine rağmen enfeksiyonun tekrar

şekillendiği, ayrıca 1994 ve 1998 yılları arasında meydana gelen RTFS enfeksiyonunda oksitetrasiklin ile yapılan sağaltımda, izole edilen *F. psychrophilum* suşlarının % 60-75'inde oksitetrasikline karşı direnç geliştiği bildirilmiştir (Bruun ve ark 2000, 2003). Branson (1998), Avrupa'da meydana gelen RTFS'nin sağaltımında oksitetrasiklinin 75-300 mg/kg/gün dozda ve 10-14 gün süreyle kullanılmasına rağmen sağaltım etkinliğinin azaldığı veya bazı balık üretim çiftliklerinde etkili olmadığını belirtmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda oksitetrasikline karşı direnç şekillendiği rapor edilmiştir (Rangdale ve ark 1997, Madsen ve Dalsgaard 2000, Bruun ve ark 2000). Burka ve ark (1997), tetrasiklinlere karşı oluşan direncin, patojen etkenlerin plazmidlerinde lokalize olmuş genlerin çoklu direnç oluşumuna yol açmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca tetrasiklin direncinden DNA'nın pCP1 plazmidinde yer alan *tetQ* geninin sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Alvarez ve ark 2004).

*F. psychrophilum* suşunda geniş plazmid varlığına rastlanmadığı ve R-plazmid varlığına dair herhangi bir bilginin olmadığı bildirilmiştir. *F. psychrophilum*'un oksitetrasikline karşı kazandığı direncin ya membran permeabilitesindeki spesifik olmayan bir değişmeden ya da tetrasikline direnç kazanmış transpozonun aktarılmasından kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Bruun ve ark 2003).

Kinolon grubu antibiyotiklerin bakterilerdeki öncelikli hedefi DNA *jiraz* enzimidir. DNA *jiraz* enziminin A alt birimi *gyr A* geni, B alt birimi ise *gyr B* geni tarafından kodlanmaktadır. Kinolon direncinin *gyr A* genindeki mutasyonlara bağlı olarak geliştiği ve kromozomal mutasyonlar sonucunda dış membranda meydana gelen değişimlerin de direnç oluşumuna neden olabildiği ifade edilmektedir (Bruun ve ark 2000, Kaya 2002). Izumi ve Aranishi (2004), *F. psychrophilum*'a karşı oluşan kinolon grubu antibiyotik direncinin DNA *jiraz* enziminde meydana gelen mutasyonla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Izumi ve ark (2007), PCR analizi ile *gyr A* genine bağlı QR ve QS genotiplerinden, QR genotipinin kinolon grubu antibiyotik direncinden sorumlu olduğunu belirtmişlerdir.

Florfenikole karşı direnç oluşumu, ilk olarak deniz balıklarından izole edilen ve psödötuberkülozise neden olan *Pasteuralla piscicida*'da tespit edilmiştir. Direncin *flo* isimli geni içeren plazmidlerin aktarılmasıyla oluştuğu bildirilmiştir (Serrano 2005). Literatürler, Danimarka ve Fransa'da tatlı su gökkuşağı alabalığı işletmelerinde su ve balık örneklerinden izole edilen *F. psychrophilum*'un florfenikole direnç kazanmadığını, ancak gelecekte direnç probleminin ortaya çıkabileceğini göstermektedir (Bruun ve ark 2000, Schmidt ve ark 2000,



Michel ve ark 2003). Ayrıca florfenikolün yapısında flor atomunun bulunmasına bağlı olarak, *asetilaz* salgılayan bakterilere karşı direncinin arttığı (Kaya 2002) göz önünde bulundurulduğunda, etkenin *asetilaz* enzimi salgılayabileceği ve bu yüzden daha zor direnç gelişebileceği sonucuna da varılabilir.

RTFS'ye neden olan *F. psychrophilum*'a karşı meydana gelebilecek direnç gelişimi, antibiyotiklerle yapılan sağaltım süresine ve prosedürüne uyulması, alternatif sağaltım yöntemlerinin belirlenmesi ve profilaksiye önem verilmesiyle engellenebilir.

## 5. SONUÇ

Hastalığın kontrolünde etkin bir aşı uygulamasının olmaması, farklı ülkelerden izole edilen *F. psychrophilum* suşlarının fenotipik ve biyokimyasal özellikleri ile antibiyotik duyarlılıklarının farklılıklar göstermesi, tez kapsamında ülkemizde kültür balıkçılığı yapılan işletmelerde yaygın olarak görülen ve ekonomik kayıplara neden olan RTFS enfeksiyonunun antibiyogram sonuçlarına göre etkili antibakteriyel ilaç/ilaçlarla sağaltım seçeneklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

İzole edilen suşlar arasında fenotipik ve biyokimyasal farklılığın olduğu ve yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda, izolatların amoksisilin/klavulanik asit, ampicilin, gentamisin, penisilin G ve sülfametoksazol-trimetoprima dirençli, eritromisine orta derecede duyarlı, oksitetrasiklin, enrofloksasin, siprofloksasin ve florfenikole duyarlı olduğu belirlendi.

Gökkuşuğu alabalık yavrularında klinik bulgular ve ölüm oranları dikkate alındığında; oksitetrasiklinin sağaltımın ikinci gününe kadar enfeksiyonu ılımlı düzeyde baskıladığı, ancak sağaltım için yeterli etkinlik gösteremediği, enrofloksasin ve siprofloksasinin ise başlangıçta belirgin bir sağaltım etkinliği sağladıkları, ancak sağaltımın üçüncü gününden sonra etkinliklerinin azaldığı tespit edilmiştir. Florfenikolün ise diğer sağaltım gruplarına göre enfeksiyonu kontrol almada önemli derecede etkin olduğu ve sağaltım sonunda enfeksiyondan kaynaklı ölüm oranlarını azalttığı belirlenmiştir.

Antibiyogram sonuçlarına göre sağaltımda kullanılan ancak etkinlik sağlayamayan antibiyotiklere karşı bakterilerde geliştiği düşünülen direnç veya suyun yapısı (sertlik derecesi, pH gibi), sağaltımdaki başarısızlığın en önemli nedenleri arasında gösterilebilir. Bakteriyel direnç mekanizmalarının önlenmesi için antibiyotik kullanım politikalarının düzeltilmesi ve yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi gereklidir. Direnç yayılımında en önemli faktör, direnç genlerinin plazmid ve transpozonlarda kodlanıp bakteriden bakteriye

aktarılmıştır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde antibiyotiklerin yaygın ve kontrolsüz kullanımı, dirençli suşların yararına bir seleksiyon oluşturmaktadır. Bakteri direncinin önlenmesinin en önemli koşulu, antibiyotiklerin uygun yerde ve uygun dozda, antibiyogram testinden sonra kullanımıdır.

Ülkemizde gökkuşuğu alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerden izole edilen *F. psychrophilum* suşlarının fenotipik ve biyokimyasal özellikleri arasında farklılıklar bulunduğundan, yapılacak antibiyogram testleri sonuçlarına göre, 10 mg/kg/gün dozda ve 10 gün süreyle fenikol grubu antibiyotiklerden florfenikolün RTFS enfeksiyonunda etkili olduğu ve enfeksiyonun sağaltımında öncelikli olarak tercih edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

## ÖZET

### **Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) RTFS'ye (Rainbow trout fry syndrome) neden olan *Flavobacterium psychrophilum* etkeninin izolasyonu ve antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi**

Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularında *Flavobacterium psychrophilum* (*F. psychrophilum*)'un neden olduğu Yavru Gökkuşığı Alabalığı Sendromu (Rainbow Trout Fry Syndrome, RTFS), günümüzde birçok ülkede yaygın olarak görülen ve ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır. Bu çalışmada *F. psychrophilum* suşunun izolasyonu ve identifikasyonu, antibakteriyel duyarlılığı ve etkili antibakteriyel ilaç/ilaçlarla sağaltım seçeneklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla Muğla iline bağlı özel bir işletmede, doğal yolla *F. psychrophilum* ile enfekte olduğu tahmin edilen yavruhane bölümünde meydana gelen enfeksiyon sonucunda, canlı ağırlıkları 1-2 g arasında hastalıklı gökkuşığı alabalık yavrusu kullanıldı. Bakteriyolojik ekim örnekleri için alabalık yavrularının solungaç, karaciğer, böbrek, beyin, dalak, bağırsak ve lezyonlu bölgelerinden *Cytophaga* agarına ekimler yapıldı. İdentifikasyon amacıyla bakterilerin fenotipik, biyokimyasal ve enzim testleri gerçekleştirildi.

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre etkenin amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, gentamisin, penisilin G ve sülfametoksazol-trimetoprim direnç gösterdiği, oksitetrasiklin, enrofloksasin, siprofloksasin ve florfenikole duyarlı olduğu belirlendi.

İn vitro olarak etkenin duyarlı olduğu dört antibiyotik seçildi. Sağaltım gruplarına oksitetrasiklin 75 mg/kg/gün dozda, enrofloksasin, siprofloksasin ve florfenikol 10 mg/kg/gün dozda ve her biri 10 gün süreyle uygulandı.

Gökkuşuğı alabalık yavrularında klinik bulgular ve ölüm oranları dikkate alındığında; okistetrasiklin, enrofloksasin ve siprofloksasinin sağaltım için yeterli etkinlik gösteremedikleri, florfenikolün ise diğer sağaltım gruplarına göre enfeksiyonu kontrol almada önemli derecede etkin olduğu ve sağaltım sonunda enfeksiyondan kaynaklı ölüm oranlarını azalttığı belirlendi.

**Anahtar kelimeler;** Antibakteriyel, duyarlılık, florfenikol, RTFS, sağaltım

## SUMMARY

### **Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* causing RTFS (Rainbow trout fry syndrome) and determination of an effective antibacterial treatment in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry**

*Flavobacterium psychrophilum* (*F. psychrophilum*) causes the septicemic diseases rainbow trout fry syndrome (RTFS) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. The infection is widespread in many countries and causes severe mortalities and economic losses. The aims of the present study are isolation of *F. psychrophilum*, and determination of antibacterial susceptibility and an effective antibacterial treatment in rainbow trout fry.

For this purpose, weighted 1-2 g fry were obtained from a private fish farm in Mugla. It was estimated that they were naturally infected with *F. psychrophilum* from fry department and used for the study. Bacteriological samples were taken from gill, kidney, liver, intestine, spleen, brain and parts of the lesions of the rainbow trout fry and were streaked onto *Cytophaga* agar plates. Following phenotypic, biochemical and enzyme tests aimed the identification of bacteria.

Kirby-Bauer disc diffusion method was used for determination of antibacterial susceptibility. According to antibiotic susceptibility tests, *F. psychrophilum* was resistant to amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, gentamicin, penicilin G and sulphamethoksazole-trimetrophim and was susceptible to oxytetracycline, enrofloxacin, ciprofloxacin and florfenicol.

Four antibiotic were selected according to the in vitro study. The antibiotic concentrations in the medicated feeds were to give a dose of 75 mg/kg/day oxytetracycline and 10 mg/kg/day enrofloxacin, ciprofloxacin and florfenicol each antibiotics for 10 days.

When considered the clinical signs and death rates among the infected rainbow trout fry, oxytetracycline, enrofloxacin and ciprofloxacin could not displayed enough efficacy. However, florfenicol showed much higher efficacy for controlling the infection and at the end of the treatment, the death rate caused by the infection was decreased significantly.

**Key words;** Antibiotics, florfenicol, RTFS, susceptibility, treatment

## KAYNAKLAR

**Akinbowale OL, Peng H, Barton MD** (2006) *Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia*, Journal of Applied Microbiology, 100: 1103-1113.

**Alavi FK, Rolf LL, Clarke CR** (1993) *The pharmacokinetics of sulfachlopyridazine in channel catfish, Ictalurus punctatus*, Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 16: 232-236.

**Alvarez B, Secades P, McBride MJ, Guijarro JA** (2004) *Development of genetic techniques for the psychrotrophic fish pathogen Flavobacterium psychrophilum*, Applied and Environmental Microbiology, 70 (1): 581-587.

**Arda M, Seçer S, Sarıeyüpoğlu M** (2002) *Balık Hastalıkları*, Medisan Yayınevi 1. Baskı, Ankara.

**Atlantik Salmon Federation** (1999) *Disease of wild atlantic salmon*, Erişim:[<http://www.asf.ca/Overall/diseases.html>], Erişim tarihi: 18.08.2004.

**Aydın F** (2004) *Alabalık biyolojisi ve yetiştirme teknikleri*, Erişim:[[http://www.tarim.gov.tr/arayuz/7/icerik.asp?efl=su\\_urunleri.htm&curdir](http://www.tarim.gov.tr/arayuz/7/icerik.asp?efl=su_urunleri.htm&curdir)], Erişim tarihi: 29.12.2004.

**Aydın F, Köksal G, Demir N, Bekcan S, Kırkağaç M, Gözğözoğlu E, Erbaş S, Deniz H, Matlaş Ö, Arpa H** (2006) *Su ürünleri yetiştiriciliği ve politikalar*, Erişim:[<http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/039fikriaydin.pdf>], Erişim tarihi: 15.12.2006.

**Bauer AU, Kirby WM, Sherris JC and Track M** (1966) *Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method*, Journal Clinical Pathology, 45: 493-494.

**Bernardet JF, Kerouault B** (1989) *Phenotypic and genomic studies of Cytophaga psychrophila isolated from diseased rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in France*, Applied and Environmental Microbiology, 55: 1796-1800.

**Bilgehan H** (1995) *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, 2. Baskı, Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları, s: 641-705, Ankara.

**Björklund H, Bindestam J, Bylund G** (1990) *Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms*, Aquaculture, 86: 359-367.



**Bowser PR, Wooster GA, Leger SJ, Babish JG** (1992) *Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 15: 62-71.

**Bowser PR** (1999) *Diseases of fish*, Erişim: [http://www.afip.org/vetpath/POLA/99/Diseases\_of\_Fish.htm], Erişim tarihi: 22.11.2006.

**Branson EJ** (1998) *Rainbow trout fry syndrome: an uptade*, Fish Veterinary Journal, 2: 63-66.

**Brown A** (2002) *Understanding Food, Fish and Shellfish*, Wadsworth/Thoömsen Learning, p:299-318, United States of America.

**Bruun MS, Schmidt AS, Madsen L, Dalsgaard I** (2000) *Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of Flavobacterium psychrophilum*, Aquaculture, 187: 201-212.

**Bruun MS, Madsen L, Dalsgaard I** (2003) *Efficiency of oxytetracycline treatment in rainw trout experimentally infected with Flavobacterium psychrophilum strains having different in vitro antibiotic susceptibilities*, Aquaculture, 215: 11-20.

**Burka JF, Hammel KL, Horsberg TE, Joohnson GR, Rainnie DJ, Speare DJ** (1997) *Drugs in salmonid aquaculture*, Journal of Veterineary Pharmacology and Therapeutics, 20: 333-349.

**Cagırgan H, Tanrikul TT, Balta F** (1997) *Characteristics of yellow pigmented bacteria isolated from diseased rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, Eight International Conference Diseases of Fish and Shellfish, 14-19 September 1997, Edinburg, Scotland European Association of Fish Pathologists.

**Cipriano RC, Holt RA** (2005) *Flavobacterium psychrophilum, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome*, Fish Disease Leaflet No. 86 United States Dept. of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV. Erişim: [http://www.lsc.usgs.gov/fhb/leaflets/FHB86.pdf], Erişim tarihi: 11.10.2006.

**Cravedi JP, Choubert G, Kristensen HG** (1994) *Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility*, Aquaculture, 60: 133-141.

**Dalsgaard I** (2000) *Prevention of trout diseases caused by Flavobacterium psychrophilum and Ichthyophthirius multifiliis*, AquaFlow News, Erişim: [http://www.aquainnovation.net/aquainnovation/knowledgebase/afshowarticle\_en.asp?aid=292&AFIlg=en], Erişim tarihi: 26.07.2007.

**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.

**Dalsgaard I** (2001) *Selction of media for antimicrobial susceptibility testing of fish pathogenic bacteria*, Aquaculture, 196: 267-275.

**Dalsgaard I, Madsen L** (2006) *Presence of Flavobacterium psychrophilum on eggs in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, Erişim: [www.vetmed.Isu.edu/web\_pdfs/ISAAH2002Abstracts.pdf], Erişim tarihi: 11.10.2006.

**Daskalov H, Austin DA, Austin B** (1999) *An improved growth medium for Flavobacterium psychrophilum*, Letters in Applied in Microbiology, 28: 297-299.

**Decostere A, D'Haese E, Lammens M, Nelis H, Haesebrouck F** (2001) *In vivo study of phagocytosis, intracellular survival and multiplication of Flavobacterium psychrophilum in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), spleen phagocytes*, Journal of Fish Diseases, 24: 481-487.

**Didinen BI, Diler Ö, Ekici S, Altun S** (2007) *Flavobacterium psychrophilum izolatlarının teşhisinde API ZYM kullanımı ve ATB VET ile antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1 (2): 62-68.

**Diler Ö, Altun S, Çalıkuşu F, Diler A** (2000) *Gökkuşığı alabalığı (Oncorhynchus mykiss)'nin yaşadığı ortam ile ilişkili kalitatif ve kantitatif bakteriyel florası üzerine bir araştırma*, Turk Journal Veterianry Animal Science, 24: 251-259.

**Diler Ö, Altun S, Işıklı BI** (2003) *Kültürü yapılan gökkuşığı alabalıkları (Oncorhynchus mykiss)'ndan izole edilen Flavobacterium psychrophilum'un fenotipik karakterleri*, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7(1): 1-8.

**DPT** (2001) *Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı*, Su Ürünleri ve Su Ürünleri Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Devlet Planlama Teşkilatı: 2575 - ÖİK: 588.

**DPT** (2006) *Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı*, 2005 Yılı Program Destek Çalışmaları, Ekonomik ve Sosyal Sektörlerdeki Gelişmeler, Devlet Planlama Teşkilatı s: 20-24, Ankara.

**Ekman E** (2003) *Natural and experimental infections with Flavobacterium psychrophilum in salmonid fish*, Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

**Elsayed EE, Eissa AE, Faisal M** (2006) *Isolation of Flavobacterium psychrophilum from sea lamprey, Petromyzon marinus L., with skin lesion in Lake Ontairo*, Journal of Fish Diseases, 29: 629-632.

**Erer H** (2002) *Balık Hastalıkları*, Selçuk Üniversitesi Basım Evi, 2. Baskı, Konya.

**Evensen O, Lorenzen E** (1996) *An immunohistochemical study of Flexibacter psychrophilus infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fry*, Diseases of Aquatic Organisms, 25: 53-61.

**FDA** (2000) *Drugs approved for use in aquaculture*, Food and Drug Administration, Erişim: [http://www.vietlinh.com.vn/tech/ssubjects/thuoc/us.htm], Erişim tarihi: 09.08.2004.

**FDA** (2006) *Assessment and management of seafood safety and quality*, Food and Drug Administration, [Erişim: <http://www.fao.org/docrep/006/y4743e/y4743e0e.htm>], Erişim tarihi: 16.08.2006.

**Furones MD** (2001) *Sampling for antimicrobial sensivity testing: a practical consideration*, Aquaculture, 196: 303-309.

**Griffth BR** (1999) *The status of aquaculture chemicals and drugs for disease control*, Aquaculture Magazine, 25:1-9.

**Grondel JL, Gludemans AGM, Van Muiswinkel WB** (1985) *The influence of antibiotics on the immune system. II. Modulation of fish leukocyte responses in culture*, Veterinary Immunology and Immunopathology, 9 (3): 251-260.

**Grondel LJ, Nouws MFJ, Dejong M, Schutte Ra, Driessens F** (1987) *Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp, Cyprinus carpio L., following different routes of administration*, Journal of Fish Diseases, 10: 153-163.

**Herman RL, Bullock GL** (1986) *Antimicrobials and fish; a review of drugs used to treat bacterial disease of channel catfish and rainbow trout*, Veterinary and Human Toxicology, 28 (1): 11-17.

**Inglis V, Richards RH** (1991) *The in vitro susceptibility of Aeromonas salmonicida and other fish-pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agents*, Journal of Fish Disease, 14: 641-650.

**Izumi S, Aranishi F** (2004) *Relationship between gyrA mutations and quinolone resistance in Flavobacterium psychrophilum isolates*, Applied and Environmental Microbiology, 70 (7): 3968-3972.

**Izumi S, Ouchi S, Kuge T, Arai H, Mito T, Fujii H, Aranishi F, Shimizu A** (2007) *PCR-RFLP genotypes associated with quinolone resistance in isolates of Flavobacterium psychrophilum*, Journal of Fish Disease, 30: 141-147.

**İnce H** (25.11.2005) *Balık hastalıklarında teşhis yöntemleri*, Erişim: [http://www.ziraatci.com/editor/yazigoster.asp?katid=30&editid=427&yaziid=1260&manual=off&kategori=Su%20%C3%83%C5%93r%C3%83%C2%BCnleri], Erişim tarihi: 30.01.2007.

**İspir Ü, Şeker E, Sağlam N, Dörücü M** (2004) *Doğu Anadolu Bölgesinde bazı Gökkuşığı alabalığı (Oncorhynchus mykiss) işletmelerinde Flavobacterium psychrophilum enfeksiyonunun araştırılması*, Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16 (4): 718-724.

**Kaya S, Baydan E, Özdemir M** (1997) *Balık hastalıklarının sağaltımında ilaç kullanımı*, Türk Veteriner Hekimliği Derneği Dergisi, 9: 34-42.

**Kaya S** (2002) *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji*, Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A (ed), Cilt 2, 3. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara.

**Kayaalp O** (2002) *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 10. Baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık, s: 185-209, Ankara.

**Kondo M, Kawai K, Kurohara K, Oshima SI** (2002) *Adherence of Flavobacterium psychrophilum on the body surface of the ayu Plecoglossus altivelis*, Microbes and Infeciton, 4: 279-283.

**Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC** (1997) *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5<sup>th</sup> Edition, Lippincott, Philadelphia.

**Korun J, Timur G** (2001) *Gökkuşluğu alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma*, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 12: 15-30.

**Kusuda R** (1982) *Development of intensive freshwater fish culture project, the Hungarian People's Republic fish disease research*, Erişim: [http://www.fao.org/docrep/field/003/P6713E/P6713E04.htm], Erişim Tarihi: 11.10.2006.

**LaFrentz BR, Cain KD** (2004) *Bacterial Cold Water Disease*, Department of Fish and Wildlife Resources and the Aquaculture Research Institute, University of Idaho, Moscow, ID 83844-1136.

**Lassen J** (1975) *Rapid identification of gram negative rods using three tube methods combined with dictiomic key*, Acta Pathology Microbiology Scandinavian (Seed-B), 83: 525-532.

**Lorenzen E** (1994) *Studies on Flexibacter psychrophilus in relation to rainbow trout fry syndrome (RTFS)*, National Veterinary Laboratory, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.

**Lorenzen E, Dalsgaard I, Bernardet JF** (1997) *Characterization of isolates of Flavobacterium psychrophilum associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I: phenotypic and genomic studies*, Diseases of Aquatic Organisms, 31: 197-208.

**Lunden T, Miettinen S, Lönnström LG, Lilius E M, Bylund G** (1998) *Influence of oxytetracycline and oxolinic acid on the immune response of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, Fish and Shellfish Immunology, 8: 217-230.

**Lunden T, Bylund G** (2000) *The influence of in vitro and in vivo exposure to antibiotics on mitogen-induced proliferation of lymphoid cells in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, Fish and Shellfish Immunology, 10: 395-404.

**Lunden T, Lilius EM, Bylund G** (2002) *Respiratory burst activity of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) phagocytes is modulated by antimicrobial drugs*, Veterinary Immunology and Immunopathology, 207: 203-212.

**Madetoja J, Hanninen ML, Koski VH, Dalsgaard I, Wiklund T** (2001) *Phenotypic and genotypic characterization of Flavobacterium psychrophilum from Finnish fish farms*, Journal of Fish Disease, 24: 469-479.

**Madetoja J, Wiklund T** (2002) *Detection of the fish pathogen Flavobacterium psychrophilum in water from fish farms*, Systematic and Applied Microbiology, 25: 259-266.

**Madetoja J, Lönnström LG, Björkblom C, Uluköy G, Bylund G, Syvertsen C, Gravningen K, Norderhus EA, Wiklund T** (2006) *Efficacy of injection vaccines against Flavobacterium psychrophilum in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss*, Journal of Fish Disease, 29: 9-20.

**Madsen L, Dalsgaard I** (2000) *Comparative studies of Danish Flavobacterium psychrophilum isolates: Ribotypes, plasmid profiles, serotypes, and virulence*, Journal of Fish Diseases, 23: 211-218.

**Madsen L, Arnbjerg J, Dalsgaard I** (2001) *Radiological examination of the spinal column in farmed rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum): experiments with Flavobacterium psychrophilum and oxytetracycline*, Aquaculture Research, 32: 235-241.

**Madsen L, Moller JD, Dalsgaard I** (2005) *Flavobacterium psychrophilum in rainbow trout, hatcheries: studies on broodstock, eggs, fry and environment*, Journal of Fish Disease, 28: 39-47.

**Martinsen B, Horsberg TE, Sohlberg S, Burke M** (1993) *Single dose kinetic study of sarafloxacin after intravenous and oral administration of different formulations to Atlantic salmon (Salmo salar) held in sea water at 8.5°C*, Aquaculture, 118: 37-47.

**Martinsen B, Horsberg TH** (1995) *Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequin, sarafloxacin and enrofloxacin, in Atlantic salmon (Salmo salar) held in seawater at 10 °C*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39 (5): 1059-1064.

**Michel C, Garcia C** (2003) *Virulence stability of Flavobacterium psychrophilum after storage and preservation according to different procedures*; Veterinary Research, 34: 127-132.

**Michel C, Kerouault B, Martin C** (2003) *Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standarts for fish bacteria*, Journal of Applied Microbiology, 95: 1008-1015.

**Midtlyng JP** (2002) *Aquaculture disease and health management*, Journal of Animal Science, 69: 4201-4208.

**Namdari R, Abedini S, Law FCP** (1999) *A comparative tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), and chinook salmon, Oncorhynchus tshawytscha (Walbaum)*, Aquaculture Research, 30: 279-286.

**NCCLS** (1993) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 5<sup>th</sup> Edition, Approved Standard, M2-A5, Volume 13, No:24, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.

**NCCLS** (1994) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 5<sup>th</sup> Informational Supplement, M100-S5, Volume 14, No:16, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.

**Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Haesebrouck F** (2003) *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish, *Journal of Fish Disease*, 26: 563-574.

**Orer HS** (2000) *Mosby'nin Hızlandırılmış Kursu*, 1. Baskı, Güneş Kitapevi, s: 196, Ankara.

**Ostland VE, McGrogan DG, Ferguson HW** (1997) *Cephalic osteochondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with Flexibacter psychrophilus*, *Journal of Fish Diseases*, 20: 443-451.

**Park BK, Lim JH, Kim MS, Yun HI** (2006) *Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine in the Korean catfish (Silurus asotus)*, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29: 37-40.

**Patricio A, Bustos JC, Montana J, Opazo B, Entrala P, Solervicens R** (1995) *First isolation of Flexibacter psychrophilus, as causativ agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) producing rainbow trout mortality in Chile*, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 15(5): 162-163.

**Rangdale RE, Richards RH, Alderman DJ** (1996) *Isolation of Cytophaga psychrophila, causalagent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) from reproductive fluids and egg surfaces of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16: 97-101.

**Rangdale RE, Richards RH, Alderman DJ** (1997) *Minimum inhibitory concentration of selected antimicrobial compounds against Flavobacterium psychrophilum the causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS)*, *Aquaculture*, 158: 193-201.

**Rangdale RE, Richards RH, Alderman DJ** (1999) *Histopathological and electron microscopical observations on rainbow trout fry syndrome*, *The Veterinary Record*, 144 (10): 252-254.

**Rijkers GT, Van Oosterom R, Van Muiswinkel WB** (1981) *The immune system of cyprinid fish, oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (Cyprinus carpio)*, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2 (3): 281-290.

**Roberts JR, Shepherd JC** (2001) *Handbook of Trout and Salmon Disease*, 3<sup>rd</sup> Ed., Fishing New Books, p: 205-207, London, United Kingdom.

**Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Pedersone K, Larsen JL** (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.

**Schmidtke LM, Carson J** (1995) *Characteristics of Flexibacter psychrophilus isolated from Atlantic salmon in Australia*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 21:157-161.

**Schnick RA, Alderman DT, Armstrong R, Gouvello RL, Ishihara S** (1997) *World Aquaculture Drug and Vaccine Progress*, Worldwide Aquaculture Drug and Vaccine Registration Progress, Erişim: [http://ag.ansc.purdue.edu/aquanic/jsa/aquadrugs/publication/world\_drug\_proress\_9-20-99.htm], Erişim tarihi: 01.10.2002.

**Serrano PH** (2005) *Responsible use of antibiotics in aquaculture*, Food And Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

**Shering-Plough** (2006) *Aquaflor*, Erişim: [http://www.spaquaculture.com/default.aspx?pageid=542], Erişim tarihi: 24.05.2006.

**Shotts EB, Starliper CE** (2003) *Flavobacterial Diseases: Columnaris Disease, Col-Water Disease and Bacterial Gill Disease*, Woo PTK and Bruno DW (Ed), Fish Diseases and Disorders, 3: 559-573.

**Skjølstrup J, McLean E, Nielsen PH, Frier JO** (2000) *The influence of dietary oxolinic acid on fluidised bed biofilter performance in a recirculation system for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, Aquaculture, 183: 255-268.

**Soltani M, Shanker S, Munday BL** (1995) *Chemotherapy of Cytophaga /Flexibacter-like bacteria (CFLB) infections in fish: studies validating clinical efficacies of selected antimicrobials*, Journal of Fish Diseases, 18: 555-565.

**Storey S** (2005) *Challenges with the development and aproval of pharmaceuticals for fish*, The American Association of Pharmaceuticals Scientists Journal, 7(2): 335-343.

**Supriyadi H, Rukyani A, Sharri MD, Subasinghe RP** (1992) *The use of chemotherapeutic agents for the treatment of bacterial disease of fish and shrimps in Indonesia*, Disease in Asian Aquaculture I, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p: 515-517, Philippines.

**TKB (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı)** (2003) *Su Ürünleri, Kanatlı Hayvan ve Etleri, Bal ve Çiğ Sütte Kalıntı İzleme Genelgesi*, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın 09.06.2003 tarih ve 2003/33 sayılı genelgesi, 23397 sayılı Resmi Gazete.

**Timur G, Timur M, Korun J** (2004) *Türkiye'de bir alabalık (Oncorhynchus mykiss) kuluçkahanesinde Flavobacterium psychrophilum enfeksiyonunun çıkışı üzerinde bir araştırma*, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 17: 21-27.

**TÜGEM** (2005) *Su ürünleri*, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Müdürlüğü, Erişim: [www.tugem.gov.tr], Erişim tarihi: 27.07.2007.

**Vaccaroo E, Giorgi M, Longo V, Mengozzi G, Gervasi PG** (2003) *Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (Dicentrarchus labrax)*, Aquatic Toxicology, 62: 27-33.

**Wiklund T, Kaas K, Lönnström L, Dalsgaard I** (1994) *Isolation of Cytophaga psychrophila (Flexibacter psychrophilus) from wild and farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in Finland*, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 14 (2): 44-46.

**Wildish DJ, Dowd M, Sutherland TF, Levings CD, Scott RJ** (2004) *A scientific review of the potential environmental effects of aquaculture in aquatic ecosystems*, Erişim: [<http://govdocs.aquake.org/cgi/reprint/2004/410/4100410.pdf>], Erişim tarihi: 12.06.2007.

**Yanong RPE** (2006) *Use of antibiotics in ornamental fish aquaculture*, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Erişim tarihi: [[edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA08400.pdf](http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA08400.pdf)], Erişim tarihi: 11.10.2006.



## ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Berlin’de doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi İzmir’de tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2002 yılında mezun oldu. 2003 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı’nda Doktora eğitimine başladı ve aynı yıl araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Evli olup, halen aynı Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım Prof. Dr. Ferda AKAR'a, ADÜ Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji ABD öğretim üyelerinden Doç. Dr. Cengiz GÖKBULUT, Yrd. Doç. Dr. Selim SEKKİN ve Yrd. Doç. Dr. Cavit KUM'a, çalışmanın özellikle deneysel aşamasında yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen Araş. Gör. Ümit KARADEMİR ve Araş. Gör. Dilek AKŞİT'e, ADÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Şükrü KIRKAN ve diğer öğretim elemanlarına, Bağcı Balık Gıda ve Enerji Üretimi San Tic. A.Ş. yetkilileri ve çalışanları ile Süleyman Demirel Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Behire Işıl DİDİNEN ve diğer öğretim elemanlarına sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren aileme ve en büyük destekçim olan eşim Nurcan BOYACIOĞLU'na sabır ve özverilerinden dolayı teşekkür ederim.