

***Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının te hisinde API ZYM kullanımı ve ATB VET ile antimikrobiyal duyarlılı ın belirlenmesi**

Behire I ıl D D NEN Öznur D LER Seçil EK C Soner ALTUN
Süleyman Demirel Üniversitesi, E irdir Su Ürünleri Fakültesi, E irdir, Isparta.

ÖZET

Bu çalı mada, 2006 yılı mart ve mayıs aylarında Akdeniz Bölgesi'nde bulunan i letmeden, hastalık salgınları esnasında 6 farklı i letmeye ait gökku a ı alabalı ı fry ve fingerlinglerinden 13 adet *Flavobacterium psychophium* izolatı tespit edildi. zolatlar konvansiyonel ve hızlı te his yöntemleri (API ZYM) ile identifiye edildi. Antimikrobiyal duyarlılıkları ATB VET ile belirlendi. Ara tırmada elde edilen izolatların fenotipik özellikleri homojen bulundu. API ZYM testleri sonucunda; izolatların proteolitik ve lipolitik enzimleri üretebilme yetene inde oldu u, ancak karbonhidrat metabolizması ile ilgili enzimleri üretmedi i görüldü. zolatların, tamamının doksisikline; % 92,3'nün gentamisin ve spektinomisin'e; % 84,6'sının tetrasiklin, flumekuın, amoksisillin/klavulanik asit ve gentamisin'e duyarlı olmasına kar ın, eritromisin, nitrofurantoin, oksasillin, kolistin, sulfamethizol ve metrodinazol'e yüksek oranda dirençli oldukları görüldü.

Anahtar kelimeler: *Flavobacterium psychrophilum*, API ZYM, antimikrobiyal duyarlılık

Identification of *Flavobacterium psychrophium* isolates using API ZYM and determination of antimicrobial susceptibilities with ATB VET

ABSTRACT

In this study, 13 *Flavobacterium psychophium* isolates was determined from rainbow trout fry and fingerlings in the fish farms in Mediterranean Region during march and may 2006. Isolates by conventionally, and rapid diagnosis test (API ZYM) were identified. Antimicrobial susceptibilities of strains was determined by ATB VET. Phenotypic characteristics of the strains was found homogenous. In the result of API ZYM test, isolates were determined to produced lipolytic and proteolytic enzymes, but not enzymes involved in carbohydrate metabolism. Although all of the strains to doxycycline; 92.3 % to gentamicin and spectinomycin; 84.6 % to tetracycline, flumequine, amoxicillin/clavulanic acid and gentamicin were sensitive, it was observed high rate resist to erythromycin, nitrofurantoin, oxacillin, colistin, sulfamethizole and metronidazole.

Key words: *Flavobacterium psychrophilum*, API ZYM, antimicrobial susceptibility

G R

Flavobacterium psychrophilum (*Cytophaga psychrophila*, *Flavobacterium psychrophilus*) özellikle salmonid balıklarda ve bazen de di er balık türlerinde görülen bakteriyel so uksu hastalı ı veya di er bir ismiyle gökku a ı alabalı ı fry sendromu'nun etkenidir (Capeda et al., 2004, Cipriano and Holt, 2005).

So uk su hastalı ı; yeti tiricili i yapılan gökku a ı alabalıklarının fry ve fingerling döneminde a ır kayıplara neden olan hastalıklardan biridir. Hastalık, daha çok 15 °C'nin altındaki su sıcaklıklarında görülür. Hastalı ın belirtileri, letarji, deri renginde koyula ma, i tah kaybı, ascites, ekzoftalmus, solungaçlarda ve iç organlarda anemi, dalakta ve arka böbrekte hipertrofi, ön böbrekte atrofi olarak bildirilmektedir (Cipriano and Holt, 2005).

Bu hastalık, günümüzde pek çok ülkede enzootiktir. Son 15 yıldır tüm dünyadaki gökku a ı alabalı ı kuluçkahanelerinde ciddi balık kayıplarına neden olmaktadır (Lorenzen et al., 1997; Cipriano and Holt, 2005). Ülkemizde, Ege, Marmara, Akdeniz, Karadeniz, ç Anadolu, ve Do u Anadolu Bölge'lerindeki gökku a ı alabalı ı i letmelerinden *F. psychrophilum* izole edilmi tir (Ça ırgan ve ark., 1997; Korun ve Timur, 2001; Diler ve ark., 2003; spir ve ark., 2004).

So uksu hastalı ına kar ı etkin bir a ı kullanımı olmaması nedeniyle, ilaçla korunma ve tedavi ön plandadır. Bu nedenle bakterinin hızlı identifikasyonu ve antimikrobiyallere duyarlılı ının belirlenmesi önemlidir. Bu ara tırma ile ülkemiz Akdeniz Bölgeleri 'nde yer alan 6 farklı çiftlikteki gökku a ı alabalı ı fry ve fingerliglerinden izole edilen *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının API ZYM testi ile proteolitik ve lipolitik enzimleri üretme özelliklerinin ilk kez incelenmesi suretiyle hızlı identifikasyonu ve ATB VET ile antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmı tir.

MATERYAL ve METOT

Bu ara tırmada, 2006 yılı mart-mayıs aylarında Akdeniz bölgesindeki 6 farklı gökku a ı alabalı ı i letmesinde 0.5-5 gr büyüklü ündeki gökku a ı alabalıklarında ortaya çıkan epizootilerden yapılan mikrobiyolojik incelemeler sonucunda *Flavobacterium psychrophilum* izolatları identifiye edildi.

zolatların biyokimyasal ve fizyolojik karakterizasyonu

Hasta balıkların böbrek ve karaci erlerinden alınan örnekler Anacker-Ordal Agar'a pasaj yapıldı ve 18 °C'de 4-7 gün inkübe edildi. Genellikle, pasaj edildikten 4-7 gün sonra Anacker-Ordal Agar'da olu an sarı-pigmentli koloniler izole edildikten sonra subkültürleri yapılarak safla tırıldı. zolatların identifikasyonunda; Gram boyama, sitokrom oksidaz, katalaz testi, asılı damla ile hareket muayenesi, ni asta hidrolizi, jelatin hidrolizi, Oksidasyon-Fermentasyon testi (O/F), Flexirubin pigmentin varlı ı tespit edildi. zolatların enzim üretimi API ZYM stripleri (bioMerieux, 25 200) yardımıyla test edildi. API ZYM testi üretici firma talimatlarına göre yapıldı ve stripler 18°C'de 20-24 saat inkübe edildi (Sarti et al., 1992; Dalsgard, 1993; Holt et al., 1994; Madetoja, 2002).

zolatların antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi

Tespit edilen *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıkları 28 farklı antimikrobiyal içeren MINI-API sistemde (ATB VET, bio Merieux, 14 289) belirlendi. Bunun için bakteri Anacker-Ordal Broth'da süspanse hale getirildi. Elde edilen bakteriyel süspanسیون, MC Farland 0,5 'e e it bulanıklıkta hazırlandı ve her birinde farklı bir antimikrobiyal içeren çukurlara 135µl bakteri süspanسیونu eklendi. Ekim yapılan MINI-API sistemi (ATB VET) 17 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. nkübasyon sonucunda bulanıklık olu an çukurlardaki antimikrobiyallere bakterinin dirençli, bulanıklık olmayan kutucuklardaki antimikrobiyallere bakterinin duyarlı oldu u göz önünde bulundurularak, her izolatu n antimikrobiyallere duyarlılı ı tespit edildi (Madetoja, 2002).

BULGULAR

letmelerde kullanılan su sıcaklı ı

letmelerde kullanılan su sıcaklı ının 12±2 °C arasında oldu u kaydedildi.

Enfekte balıklarda belirlenen hastalık belirtileri

nceedi imiz balıklarda dı belirti olarak deri renginde koyula ma, ekzoftalmus, gözde kanama, sırt yüzgecinde erime, yüzgeç

tabanlarında kanama, anüsde kızarıklık gözlemlendi. Ç belirti olarak ba ırsakta sarı renkli jelatinimsi bir sıvı birikimi, karaci erde solgunluk, dalakta büyüme ve arka böbrekte i kinlik gibi belirtiler tespit edildi.

zolatların fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonları

Anacker-Ordal Agar'a balıkların karaci er ve böbreklerinden yapılan pasajlar sonucu 4-7 gün sonra geli en sarı- pigmentli koloniler elde edildi. zolatların, gram(-) uzun çubuk ekinde, kayma hareketi gösteren, katalaz, sitokrom oksidaz testleri ve flexirubin pigment yönünden pozitif oldu u, jelatini hidrolize etti i; O/F testi sonucunda glukoz kullanmadı ı ve ni astayı hidrolize edemedi i belirlendi (Çizelge 1). zolatların, API ZYM profiline bakıldı ında alkalın fosfataz, lösin arilamidaz, esteraz, esteraz lipaz, fosfotaz asit ve naftol-AS-BI-fosfohidrolaz yönünden pozitif; lipaz, valin arilamidaz, sistin arilamidaz, tripsin, -Kymotripsin,

-Galaktosidaz, -Galaktosidaz, -Glukuronidaz, -Glukuronidaz, N-asetil- -glukosaminidaz, - Mannosidaz, -Fukosidaz yönünden negatif sonuç verdi i görüldü (Çizelge 2).

zolatların antibiyotiklere duyarlılıkları

Flavobacterium psychrophilum izolatlarının tamamının doksisisikline, % 92,3'ünün gentamisin ve spektinomisin'e, % 84,6'sının tetrasiklin, flumekuın, amoksisillin/klavulanik asit ve gentamisin'e, % 76,92'sinin apramisin, rifampisin ve enrofloksasin'e, % 69,23'ünün kanamisin ve tiylosin'e, % 61,53'ünün pristinamisin, kotrimaksazol ve linkomisin'e, % 53,'inin amoksisillin, sefoperazon, sephalotin ve fusidik asit'e, % 46,15'inin penisilin ve oksolinik asit'e, % 38,46'sının eritromisin, kloramfenikol, nitrofurantoin ve oksasillin'e, % 23,07'sinin kolistin'e, % 15'inin sulfamethizol'e, % 7,6'sının metrodinazol'e duyarlı oldu u belirlendi (Çizelge 3).

Çizelge 1. zole edilen *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının konvansiyonel test sonuçları

	zolatlar												
Karakter	A1	A2	B	C	D	E	F1	F2	F3	F4	G	H	I
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reaksiyon													
Hareket	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Koloni Rengi	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Fleksirubin													
Pigment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Üretimi													
Ni asta													
Hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatin Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* : Kayma hareketi var

Çizelge 2. 6 farklı i letmeden iz ole edilen *Flavobacterium pscrophilum* u larının API ZYM test sonuçları*

Enzim	İletmeler						
	1	2	3	4	5	6	
Alkaline fosfatase	+	+	+	+	+	+	+
	(Güçlü)	(Güçlü)	(Güçlü)	(Güçlü)	(Güçlü)	(Güçlü)	(Güçlü)
Esterase	+	+	+	+	+	+	+
	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)
Esterase lipase	+	+	+	+	+	+	+
	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)
Lipase	-	-	-	-	-	-	-
Leucine	+	+	+	+	+	+	+
arylamidase	(Güçlü)	(Güçlü)	(Güçlü)	(Güçlü)	(Güçlü)	(Güçlü)	(Güçlü)
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Cystine	-	-	-	-	-	-	-
arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
Tyripsin	-	-	-	-	-	-	-
-Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-
Phosphatase acid	+	+	+	+	+	+	+
	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)
Napthol-AS-BI-	+	+	+	+	+	+	+
phosphohydrolase	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)	(Zayıf)
-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-
-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-
-Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-
-Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl- -	-	-	-	-	-	-	-
glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-
-Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-
-Fucosidase	-	-	-	-	-	-	-

- Aynı i letmede izole edilen *Flavobacterium pscrophilum* su larının API ZYM test sonuçlarında farklılık olmaması nedeniyle Çizelge 'de izolatlar yerine numaraları verilmi tir.

Çizelge 3. zole edilen *Flavobacterium psychrophilum* u larının antimikrobiyallere kar ı duyarlılıkları

Antimikrobiyal ilaç	Konsan t. (mg/L)	zolatlar													
		A1	A 2	B	C	D	E	F1	F2	F3	F4	G	H	I	
Amoksisillin(AMO)	4	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	
Amoksisillin/klavulanik asit (AMC)	4/2	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	
Apramisin(APR)	16	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	
Sefoperazon (CFP)	4	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	
Sephalothin (CFT)	8	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S	
Kloramfenikol (CMP)	8	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	
Kolistin (COL)	4	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	
Kotrimoksazol (TSU)	2/38	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	R	
Doksisiklin (DOT)	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Enrofloksasin (ENR)	0.5	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	
Eritromisin (ERY)	1	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R	
Flumekuin (FLU)	4	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
Fusidik Asit (FUC)	2	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	
Gentamisin (GEN)	4	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Kanamisin (KAN)	8	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	
Linkomisin (LYN)	2	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	
Metronidazol (MTR)	4	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	
Nitrofurantoin (FUR)	25	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	
Oksasillin (OXA)	2	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	
Oksolinik Asit (OXO)	2	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	
Penisillin (PEN)	0.25	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	
Pristinamisin (PRI)	2	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	
Rifampisin (RFA)	4	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	
Spektinomisin (SPE)	64	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Streptomisin (STR)	8	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	
Sulfamethizol (SUL)	100	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	
Tetrasikline (TET)	4	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	
Tiylosin (TYL)	2	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	

R.Dirençli, S:Duyarlı

TARTI MA ve SONUÇ

Flavobacterium psychrophilum izolatlarının lipolitik ve proteolitik enzim akvititesine sahip oldu u, ancak karbonhidrat metabolizması ile ilgili enzimleri üretme yetene inde olmadı ı farklı ara tırmacılar tarafından bildirmektedir (Lorenzen et al., 1997; Ostland et al., 1997; Madetoja et al., 2001). Bu çalı mada da *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının lipolitik ve proteolitik enzimleri ürettikleri fakat karbonhidrat metabolizması ile ilgili enzimleri üretmedikleri görülmü tür.

Bu çalı madaki *F. psychrophilum* izolatlarının API ZYM profillerinin homojen oldu u belirlenmi tir. Madetoja et al., (2001)'nın yapmı oldukları çalı mada farklı ölkelerden 8 farklı salgın esnasında izole ettikleri *F. psychrophilum* su ları ve referans *F. psychrophilum* su unun API ZYM profillerini kar ıla tırdıklarında, su lar arasında esteraz, esteraz lipaz, lipaz, sistin arilamidaz ve tripsin üretimi yönünden farklılıklar görüldü ü belirtilmi tir. Ostland et al., (1997) gökku a ı alabalıklarında enfeksiyonlara neden olan *F. psychrophilum*'un esteraz reaksiyonunun su lar arasında farklı; esteraz lipaz, lipaz ve di er tüm testlerin homojen oldu unu ifade etmektedirler. Çalı mamızda izolatların API ZYM profillerinin homojen çıkması izole edildikleri i letmelerin aynı bölgede bulunmasından kaynaklanmaktadır.

Ara tırmada elde etti imiz izolatların ço unlu unun doksisisiklin, gentamisin, spektinomisin, tetrasiklin, flumekuini, amoksisillin/klavulanik asit, apramisin, rifampisin ve enrofloksasin, kanamisin, tiylosin, pristinamisin, kotrimaksazol, linkomisin, amoksisillin, sefoperazon, sephalotin ve fusidik asit'e kar ı duyarlı oldu u belirlenmi tir. Balta, (1997) *F. psychrophilum*'un nitrofuranlara duyarlı; flumekuini, sulfanamidler ve oksolinik asite dirençli oldu unu; spir ve ark., (2004) Do u Anadolu Bölgesi'ndeki i letmelerde görülen salgınlardan izole ettikleri *F. psychrophilum* su larının gentamisin, oksitetrasiklin, nitrofuran, amoksisillin /klavulanik asit ve eritromisine duyarlı; kloramfenikol ve penisile dirençli olduklarını bildirmektedirler. Ara tırmamız bulgularıyla kar ıla tırıldı ında görülen farklılıklar bakterinin antimikrobiyal maddelere direnç kazanma özelli i ve su lar arasındaki farklılıklardan

kaynaklanabilece i dü ünülmektedir. Çalı mada hem farklı i letmelerdeki balıklarda, hem de aynı i letmenin farklı havuzlarında bulunan balıklarda tespit edilen izolatlar arasında antimikrobiyallere duyarlılık bakımından farklılıkların bulunmasının sebebi de bakterinin direnç geli tirmesi ekinde açıklanabilir. Bruun et al., (2000) bir salgında antimikrobiyallere duyarlılıkları farklı bulunan izolatların varlı ı nedeniyle etkin tedavinin gerçekte emeyebildi i ve birbirini takip eden salgınlara ortaya çıkabilece ini ifade etmektedir. Bu nedenle, *F. psychrophilum*'un neden oldu u salgınlarda tek bir antimikrobiyal madde kullanımı ile etkin tedavi sa lanmayaca ı ve salgın süresince antimikrobiyallere duyarlılık testi ile incelemelerin yapılması gerekti i sonucuna varılmı tir.

KAYNAKLAR

- Balta, F., 1997, Kültürü yapılan alabalıklarda *Oncorhynchus mykiss* görülen *Flavobacterium psychrophila* enfeksiyonu, IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 19 Eylül 1997, Cilt : II, E irdir-Isparta, 621-648 s.
- Bruun, M.S., A.S. Schmidt, L. Madsen, I. Dalsgaard, 2000, Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*, Aquaculture, 187, 201-212.
- Capeda, C., Garcı ´a-Ma ´rquez, S., Santos, Y., 2004, Improved growth of *Flavobacterium psychrophilum* using a new culture medium, Aquaculture, 238: 75-2 pp.
- Cipriano, R.C., Holt, R.A., 2005, *F. psychrophilum*, cause of bacterial cold-water disease and rainbow trout fry sendrome, Fish Disease Leaflet, No. 86, 44 pp.
- Ça ırğan, H., Tanrıkul, T.T., Balta, F., 1997, Characteristics of yellow pigmented bacteria isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Eighth International Conference "Diseases of Fish and Shell fish 14-19 September 1997, Edinburg, Scotland European Association of Fish Pathologists.
- Dalsgaard, I., 1993. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish, Annu. Rev. Fish Dis., 1: 127-144 s.
- Diler, Ö., Altun, S., I ıklı, B.I., 2003, Kültürü yapılan gökku a ı alabalıkları(*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Flavobacterium*

- psychrophilum*'un fenotipik karakterleri, S.D.Ü., Fen Bilimleri Enst. Derg., 7-1: 1-8 s.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams. S.T., 1994. Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology, 485-487 s.
- spir, Ü., eker, E., Sa lam, N., Dörücü, M., 2004, Do u Anadolu Bölgesi 'nde bazı gökku a ı alabalı ı (*Oncorhynchus mykiss*) i letmelerinde görülen *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonunun ara tırılması, F.Ü., Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16 (4): 718-724
- Korun, J., Timur, G., 2001. Gökku a ı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalı ma, stanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 12: 15-30 s.
- Lorenzen, E., Dalsgard, I., Bernardet, J.F., 1997. Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I: phenotypic and genomic studies, Disaeses of Aquatic Oraganisms, 31:197-208 pp.
- Madetoja, J., 2002. *F. psycrophilum*: characterisation, experimental transmission and ocuurence in fish and fish farming enviroments, Academic Dissertation, Finland, 1-37 pp.
- Madetoja, J. Hanninen, M-L., Hirvela-Koski, V., Dalsgard, I., Wiklund, 2001, Phentypic and genotypic characterization of *Flavobactrum psychrophilum* from Finnish fish farms, Journal of Fish Diseases, 24: 469-479 pp.
- Ostland, V.E., McGrogan, D.G., Ferguson, H.W., 1997, Cephalic osteochrondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with *Flavobacterium psychrophilus*, Journal of Fish Diseseses, 20: 443-451 pp.
- Sarti, M., Giorgetti, G., Manfrin, A., 1992. Method for rapid diagnosis of visceral myxobacteriosis in reared trout in Italy, Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 12:53.