

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EGE DENİZİ DOĞAL VE KÜLTÜR (LEVREK VE
ÇİPURA) BALIKLARINDAN İZOLE EDİLEN *VİBRİO*
(*LİSTONELLA*) *ANGUILLARUM*, *V. ALGINOLYTICUS*
TÜRLERİNDE KİNOLON İLE TETRASİKLİN GRUBU
İLAÇ DİRENCİNİN PCR YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI

Farah Gönül AYDIN

FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Emine BAYDAN

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
14L0239005 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA

(2016)

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “ Ege Denizi Doğal ve Kültür (Levrek ve Çipura) Balıklarından İzole Edilen *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* Türlerinde Kinolon ile Tetrasiklin Grubu İlaç Direncinin PCR Yöntemiyle Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Farah Gönül AYDIN

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında
Farah Gönül AYDIN tarafından hazırlanan
“Ege Denizi Doğal ve Kültür (Levrek ve Çipura) Balıklarından İzole Edilen *Vibrio*
(*Listonella*) *anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* Türlerinde Kinolon ile Tetrasiklin
Grubu İlaç Direncinin PCR Yöntemiyle Araştırılması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul/ret
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Genetik Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Emine BAYDAN
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim
Dalı
Üye

İmza
Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
Üye

İmza
Doç. Dr. Ebru YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı
Üye

İmza
Doç. Dr. Fatma KOCASARI.
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı
Raportör

Tez hakkında alınan Jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
KABUL VE ONAY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş	1
1.2. Balıklarında Görülen Bakteriyel Hastalıklar ve Hastalık Tanı Yöntemleri	3
1.2.1. Vibriosis	5
1.2.2. Hastalık Tanı Yöntemleri	11
1.3. Balık Yetiştiriciliğinde Kullanılan Antibakteriyel İlaçlar	17
1.3.1. Tetrasiklinler	19
1.3.2. Kinolonlar	22
1.4. Sudaki Bakterilerde Direnç	24
1.5. Su Bakterilerine Yönelik Antibakteriyel Duyarlılık Testi	26
1.5.1. Disk Difüzyon Testi	27
1.5.2. Dilüsyon Testleri	28
1.5.3. Otomatik Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sistemi	29
1.5.4. Genotipik Metod	29
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Gereç	32
2.1.1. Örneklerin Toplanması	32
2.1.2. Besiyerleri	32
2.1.3. Ayıraçlar, Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	33
2.1.4. Antibiyotik Diskleri	34
2.1.5. Kullanılan Antibiyotikler	34
2.1.6. PCR'da ve GörüntülemeKullanılan Maddeler	34
2.1.7. DNA ve Plazmid İzolasyonunda Kullanılan Maddeler	34
2.1.8. PCR'da ve GörüntülemeKullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	35
2.1.9. Standart Suşlar	35
2.2. Yöntem	35
2.2.1. Bakteri İzolasyonu	35
2.2.2. Fenotipik (Biyokimyasal) Yöntemler	36
2.2.3 Moleküler Yöntemler	38
2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	50
2.2.5. DNA Dizi Analizi	53

3. BULGULAR	55
3.1. Klinik ve Otopsi Bulguları	55
3.2. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	58
3.2.1. Moleküler İdentifikasyon Bulguları	60
3.3. Antibakteriyel Maddelere Duyarlılık Testi Bulguları	61
3.3.1. Disk Difüzyon Testi Bulguları	61
3.3.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Bulguları	62
3.3.3. Moleküler Direnç Bulguları	63
4. TARTIŞMA	69
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	78
ÖZET	80
SUMMARY	82
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	101

ÖNSÖZ

Su ürünleri yetiştiriciliğinin en önemli problemi profilaktik önlemlere rağmen yaygın ve toplu ölümlere neden olan hastalıkların etkin şekilde önlenememesidir. Bunun pek çok sebebi olmakla birlikte, temel nedenlerden biri direnç gelişmesinden dolayı antibiyotiklere yeterli cevabın alınamamasıdır. Rutinde yapılan ilaca duyarlılık yöntemleri yetersiz olduğundan; hızlı ve güvenilir alternatif antibakteriyel ilaç seçenekleri hızlı uygulamaya konularak antibakteriyel ilaçlardan kaynaklanan direncin sağlık ve çevreye yönelik etkilerinin en aza indirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışma konusunu belirlemede, çalışmaların yürütülmesinde ve doktora eğitimimin süresince, yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Emine BAYDAN'a ve tez izleme komitesinde bulunan değerli hocalarım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ'a ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'nda görevli değerli hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Bengi ÇINAR KUL'a ve Öğretim Görevlisi Dr. Nüket BİLGİN'e, Doktora öğrencileri Mustafa Yenal AKKURT ve Özge Şebnem ÇILDIR'a, örnek toplamamda bana kapılarını açan Sayın Veteriner Hekim Özge OTGUCUOĞLU'na, Biyokimyasal analizlerimde yardımını esirgemeyen Etlik Veteriner Araştırma Enstitüsü Bakterioloji Şefi Sayın Selahattin ŞEN ve Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü Öğretim Görevlisi Dr. F. Sertel SEÇER'e, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Murat CENGİZ, TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Bakterioloji Şefi Sayın Seza ESKİİZMİRLİLER'e ve benden desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Ahmet CEYLAN'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Dr. Doğukan ÖZEN'e, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme

Anabilim Dalı'ndan Dr. Ali ÇALIK'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Gökben ÖZBAKIŞ'a, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'ndan Dr. Güzin İPLİKÇİOĞLU ÇİL'e, Veteriner Hekim S.Can GÜLOĞLU'na, lisans öğrencileri Mesut YILDIZ, Buket GÜL, Berfin KAHRAMAN'a ve en çok da gece- gündüz yanımda olan değerli Aileme ve arada ki mesafelere rağmen her zaman yanımda olan ablam S. Gizem AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.



SİMGELER VE KISALTMALAR

$^{\circ}\text{C}$	derece santigrat
μl	mikro litre
μg	mikro gram
bç	Baz çifti
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
MHA	Müeller Hinton agar
MHB	Müeller Hinton broth
MR	Metil Red
NaCl	Sodyum klorür
NA	Nutrient agar
O/F	Oksidasyon/Fermantasyon
ONPG	Orta nitrofenil beta galaktosidaz
RNA	Ribonükleik asit
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik asit
TCBS	Tiyosülfat sitrat safra tuzları sukraz agar
TILLING	Targeting Induced Local Lesions in Genomes
TSA	Triptik soy agar
TUIK	Türkiye İstatistik Kurumu
VAM	<i>Vibrio anguillarum</i> besiyeri
VP	Vogues-Proskauer

ŞEKİLLER

Şekil 2.1	Gram Negatif Bakteriler için Plazmid Purifikasyonu protokolü	41
Şekil 2.2.	PCR amplifikasyon şema	45
Şekil 2.3.	Disk Difüzyon Yöntemi	51
Şekil 2.4.	Antimikrobiyal İlaçların Dilüsyon	52
Şekil 2.5.	Dizi analizi	54
Şekil 3.1.	Levrek balığında görülen operkulum ve anüs etrafında görülen kızarıklıklar	55
Şekil 3.2.	Levrek balığında ağız etrafında ülseratif lezyon, gözde opaklaşma	56
Şekil 3.3.	Levrek balığında görülen ventralinde ve dorsalinde görülen ülser	56
Şekil 3.4.	Levrek balığında karaciğerde peteşiyal hemorajik kanamalar	56
Şekil 3.5.	Levrek balığında iç organlarda yağlanma	57
Şekil 3.6.	Çipura balığında (numune 2-9) karaciğerde hiperemi, bağırsak içi beyaz – opak, şeritler halinde mukoid madde ve bağırsağın sarı şeffaf bir sıvı ile dolu olduğu tespit edildi.	57
Şekil 3.7.	Levrek balığında (numune 30) yüzgeç etrafında peteşiyel kanama	57
Şekil 3.8	<i>V. anguillarum</i> ATCC 43305 ve <i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749 ait DNA agaroz jel görüntüleri.	60
Şekil 3.9.	<i>V. anguillarum</i> ATCC 43305 PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri. Vangu+: Pozitif kontrol, - Negatif kontrol, 7, 22,32, 44, 60, 69, 81, 91 ve 109 nolu örnekler	61
Şekil 3.10.	<i>V. alginolyticus</i> PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri. <i>V. alginolyticus</i> ATCC 17749 + Pozitif kontrol; - Negatif kontrol; 3, 9, 14, 17, 18, 55, 83 ve 97 nolu örnekler.	61
Şekil 3.11.	Disk difüzyonda testinde farklı zon çapları (Avlanan çipura balık örneği)	62
Şekil 3.12.	<i>V. anguillarum</i> suşlarında gyrA genine ait PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri. PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri.	64

Vangu+: *V. anguillarum* ATCC 43305 Pozitif kontrol, 4, 58,
78, 110 nolu örnekler

- Şekil 3.13.** *V. anguillarum* suşlarında parC genine ait PCR sonuçları 64
agaroz jel görüntüleri. PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri.
Vangu+: *V. anguillarum* ATCC 43305 Pozitif kontrol, - Negatif
kontrol, 7, 16, 18 nolu örnekler.
- Şekil 3.14.** *V. alginolyticus* suşlarında gyrA ve parC genlerine ait PCR 65
sonuçları agaroz jel görüntüleri. *V. alginolyticus* ATCC 17749-
Pozitif kontrol; V- Negatif kontrol; 3, 9, 14 ve 19 nolu örnekler
ait gyrA ve parC
- Şekil 3.15.** 83. kodon gyrA ve 85. kodon parC mutasyonuna ait dizi analiz 66
görüntüsü
- Şekil 3.16.** tetA gen jel görüntüsü 67
- Şekil 3.17.** tetB gen jel görüntüsü 67
- Şekil 3.18.** tetD gen jel görüntüsü 67
- Şekil 3.19.** tetM gen jel görüntüsü 68

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Su Ürünleri Üretim Miktar ve Değerleri	2
Çizelge 1.2.	Türkiye’de Yetiştiricilik En Çok Yapılan Türlerin Üretim Miktarları	2
Çizelge 1.3.	Balıklarda hastalık nedenlerinin sınıflandırılması	4
Çizelge 1.4.	Çipura ve levrek balıklarında tanımlanan Gram negatif bakteriyel enfeksiyonları	5
Çizelge 1.5.	Deniz balıklarında Vibriosis etkenleri ve coğrafik dağılımları	7
Çizelge 1.6.	Direnç mekanizmalarının ve gen belirteçleri	16
Çizelge 1.7.	Balık Yetiştiriciliğinde kullanılan Ruhsatlı Antibiyotik İlaç Etken Listesi	18
Çizelge 1.8.	Yetiştiricilikte kullanılan bazı antibakteriyel ilaçların dozları, uygulama yolları ve yarılanma ömürleri	20-21
Çizelge 2.1.	İncelenen balık sayısı	32
Çizelge 2.2.	<i>Vibrio (Listonella) anguillarum</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> biyokimyasal testleri	37
Çizelge 2.3.	Çalışmada identifikasyon için kullanılan primer dizileri.	43
Çizelge 2.4.	Kinolon İlaç direnci tespitinde kullanılan primer dizileri.	43
Çizelge 2.5.	Tetrasiklin İlaç direnci tespitinde kullanılan primer dizileri	43
Çizelge 2.6.	PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları- <i>V. anguillarum</i>	45
Çizelge 2.7.	PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları	45
Çizelge 2.8.	PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları - <i>V. alginolyticus</i>	46
Çizelge 2.9.	PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları.	46
Çizelge 2.10.	PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları – kinolon ilaç (<i>V. anguillarum</i> - <i>V. alginolyticus</i> gyrA) direnci	46
Çizelge 2.11.	PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları	47
Çizelge 2.12.	PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları – kinolon ilaç (<i>V. anguillarum</i> /parC) direnci	47
Çizelge 2.13.	PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları.	47

Çizelge 2.14.	PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları – kinolon ilaç (<i>V. alginolyticus</i> /parC) direnci	47
Çizelge 2.15.	PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları	48
Çizelge 2.16.	PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları – tetrasiklin ilaç (<i>V. anguillarum</i> - <i>V. alginolyticus</i> / tetA-tetB-tetD) direnci	48
Çizelge 2.17.	PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları.	48
Çizelge 2.18.	PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları – tetrasiklin ilaç (<i>V. anguillarum</i> - <i>V. alginolyticus</i> / tetM) direnci	48
Çizelge 2.19.	PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları.	49
Çizelge 2.20.	Antibakteriyel ilaçların stok çözeltilerinin hazırlanması için gerekli çözücü ve sulandırıcılar	52
Çizelge 3.1.	İzolatların biyokimyasal identifikasyon sonuçları	59
Çizelge 3.2.	Biyokimyasal testler	59
Çizelge 3.3.	İzolatların PCR ile belirlenen identifikasyon sonuçları	60
Çizelge 3.4.	<i>V. anguillarum</i> ve <i>V. alginolyticus</i> suşularının antibiyotik duyarlılık test sonuçları	62
Çizelge 3.5.	<i>Vibrio spp.</i> ait ilaç konsantrasyonları ve MİK değer aralıkları	63
Çizelge 3.6.	İdentifiye edilen 78 adet <i>V. anguillarum</i> ve <i>V. alginolyticus</i> suşu ortalama MİK ₅₀ değeri	63
Çizelge 3.7.	Dizi analiz ile tespit edilen amino asit değişimleri ve tespit edilen örnek sayıları	65
Çizelge 3.8.	Tetrasiklin direnç genlerinin suşlara ve balık türlerine göre dağılımı	66

1. GİRİŞ

1.1. Giriş

Bireylerin ve yaşadıkları toplumun gelişiminde beslenme alışkanlıkları ve tercihlerine dair farkındalık her geçen gün artmaktadır. Aminoasit yönünden zengin olan balık eti, et, süt, yumurta gibi diğer protein kaynaklarının yanında %67,5 oranında gerçek protein içeriği ile mükemmel bir besin olmaktadır. Ayrıca bu gıdalar içerisinde çoklu doymamış yağ asitleri yönünden zengin olan balık ve diğer su ürünlerinde bu yönden ilk sıralarda yer almaktadır (Kaldırım ve Yılmaz, 2013; Yazıcıoğlu, 2015). Son yıllarda nüfus artışıyla birlikte ihtiyaç duyulan protein alımı yetersiz olmakta ve ihtiyacın karşılanmasında doğal olarak elde edilen (avcılık) su ürünleri miktarı yetmemektedir. Bu durum ise su ürünleri yetiştiriciliğine verilen önemin artmasına neden olmaktadır (Erdoğan, 2012). Bu bağlamda su ürünleri yetiştiriciliği son yıllarda en hızlı büyüyen gıda üretim sektörüdür (FAO, 2011). Dünyada toplam kültür balıkçılığı üretimi 2009 yılı istatistiklerine göre 145,1 milyon tondur. Kültür balıkçılığı üretimi 2006 ile 2010 yılları arasında her sene % 2 artış göstermişken 2011 senesinde 148,5 milyon tondan 154 milyon tona yükselerek % 4 artış ile üretimin ivme kazandığı gözlenmiştir. Türkiye’de 2011 yılında üretim 703,545 ton (Çizelge 1.1) olmaktadır (BSGM, 2016).

Çizelge1.1’de görüldüğü üzere 2000 yılındaki toplam avcılık ve yetiştiricilik miktarlarını 2015 yılı rakamları ile karşılaştırdığımızda ise yetiştiriciliğin toplam üretim içerisindeki payı önemli düzeyde artmış olup gelecekte de avcılıktan sağlanan üretim miktarını geçebileceği görülmektedir. TÜİK verilerine göre 2015 yılında üretilen su ürünleri miktarı 672,241 ton olarak belirlenerek, bu üretimin 431,907 tonu avcılık; 240,334 tonu ise yetiştiricilik yolu ile elde edilmiştir. Türkiye’deki balık çiftlikleri deniz ve iç sularda faaliyet göstermekte olup, 138,879 ton balık denizlerde; 101,455 ton balık ise iç sularda faaliyet gösteren balık çiftliklerinden elde edilmektedir (BSMG, 2016).

Çizelge 1.1. Su Ürünleri Üretim Miktar ve Değerleri (TUİK, 2016).

Yıllar	AVCILIK		YETİŞTİRİCİLİK		TOPLAM	
	Miktar (ton)	Değer (₺)	Miktar (ton)	Değer (₺)	Miktar (ton)	Değer (₺)
2000	503.345	367.840.650	79.031	139.552.950	582.376	507.393.600
2001	527.733	490.719.350	67.244	173.890.600	594.977	664.609.950
2002	566.682	630.759.100	61.165	212.248.000	627.847	843.007.100
2003	507.772	878.154.800	79.943	415.575.800	587.715	1.293.730.600
2004	550.482	1.120.965.400	94.010	520.603.300	644.492	1.641.568.700
2005	426.496	1.574.988.300	118.277	704.283.000	544.773	2.279.271.300
2006	533.048	1.706.983.000	128.943	766.229.750	661.991	2.473.212.750
2007	632.450	1.323.151.750	139.873	839.762.500	772.323	2.162.914.250
2008	494.124	1.097.178.400	152.186	850.646.080	646.310	1.947.824.480
2009	464.233	837.387.880	158.729	952.935.500	622.962	1.790.323.380
2010	485.939	1.078.515.200	167.141	1.066.778.600	653.080	2.145.293.800
2011	514.755	1.143.272.172	188.790	1.270.028.140	703.545	2.413.300.312
2012	432.442	1.209.028.426	212.410	1.605.293.700	644.852	2.814.322.126
2013	374.121	1.188.432.525	233.394	1.704.471.151	607.515	2.892.903.676
2014	302.212	1.099.749.495	235.133	2.160.070.890	537.335	3.259.820.385
2015	431.907	1.245.020.381	240.334	2.569.208.590	672.241	3.814.228.971

Çizelge 1.2. Türkiye’de Yetiştiricilik En Çok Yapılan Türlerin Üretim Miktarları (TUİK, 2016)

Yıllar	Alabalık			Çipura	Levrek
	İçsu	Deniz	Toplam		
2000	42.572	1.961	44.533	15.460	17.877
2001	36.827	1.240	38.067	12.939	15.546
2002	33.707	846	34.553	11.681	14.339
2003	39.674	1.194	40.868	16.735	20.982
2004	43.432	1.650	45.082	20.435	26.297
2005	48.033	1.249	49.282	27.634	37.290
2006	56.026	1.633	57.659	28.463	38.408
2007	58.433	2.740	61.173	33.500	41.900
2008	65.928	2.721	68.649	31.670	49.270
2009	75.657	5.229	80.886	28.362	46.554
2010	78.165	7.079	85.244	28.157	50.796
2011	100.239	7.697	107.936	32.187	47.013
2012	111.335	3.234	114.569	30.743	65.512
2013	122.873	5.186	128.059	35.701	67.913
2014	107.983	5.610	113.593	41.873	74.653
2015	101.166	6.872	108.038	51.844	75.164

Yetiştiriciliği yapılan türler arasında tatlı suda en çok üretilen alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) 108 bin ton, denizde yetiştirilen levrek (*Dicentrarchus labrax*) 75 bin ton ve çipura (*Sparus aurata*) ise 51 bin ton olarak belirtilmiştir (Çizelge 1.2). Tesislere bakıldığında iç sularda 242.316 ton/yıl, denizde 236.964 ton/yıl ve toplamda

ise 479.280 ton/yıl kapasiteli yetiştiricilik işletmeleri mevcuttur (BSGM, 2016; TUİK, 2016).

Türkiye levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) üretiminde Akdeniz ülkeleri arasında üçüncü, alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) üretiminde ise birinci sırada yer almaktadır. İller bazında yapılan çipura ve levrek yetiştiricilik türleri ve üretim miktarlarına bakıldığında 2015 yılında Muğla 70,500 ton ile ilk sırada yer almaktadır. Bunu İzmir 47,410 tonla, Hatay ise 482 tonla takip etmektedir (Coşkun ve ark., 2011; Kaldırım ve Yılmaz, 2013; TUİK, 2016). Balık yetiştiriciliğinin en fazla yapıldığı Ege ve Akdeniz'deki işletmeler üretimin büyük kısmını yurt dışına satmaktadır. Ayrıca akuakültür sektörüne yeni bir ivme kazandırabilmek ve yetiştiricilikte gözlenen sorunlar nedeniyle ekonomik değeri yüksek alternatif (mercan, sinagrit, mersin ve Karadeniz alabalığı) türlerin üretimi de gündeme gelmiştir. Bu kapsamda Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı kendisine bağlı birimlerde yapılan çalışmalara destek vermekte ve desteklenen projelerinde başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Güralp, 2012; Çötek, 2016).

1.2. Balıklarında Görülen Bakteriyel Hastalıklar ve Hastalık Tanı Yöntemleri

Kültür balıkçılığında yetiştiriciliğin artışı ile beraber hastalıkların ortaya çıkışında da artış gözlenmekte ve karşılaşılan hastalıkların neden olduğu ekonomik kayıplarda giderek artmaktadır. Bu kayıp tüm karşılaşılan ekonomik zararın % 10'na tekabül etmektedir (Hawke, 2000; Coşkun ve ark., 2011). Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan balıklarda görülen, rapor edilmiş bakteriyel hastalıkları; Furunculosis (Korun ve Timur, 2001; Kayış ve ark., 2009), Aeromonas septisemisi (Candan ark., 1995), atipik Aeromonas enfeksiyonu (Karataş ve ark., 2005), Yersiniosis (Çağırman ve Yürekli Türk, 1991; Timur ve Timur, 1991; Karataş Dügenci ve Candan, 1997; Karataş Dügenci ve ark., 2004), Fry Mortalite Sendromu (Çağırman ve ark., 1997; Korun ve Timur, 2001; Diler ve ark., 2003,2004; Timur ve ark., 2004; Kum ve ark., 2008; Kayış ve ark., 2009; Durmaz ve ark., 2012), Pseudomonas Septisemisi (Akaylı ve Timur, 2004a, 2004b), Streptococcosis (Diler ve ark., 2002,2003; Avcı ve ark., 2010),

Staphylococcosis (Timur ve Akaylı, 2003; Kubilay ve Uluköy, 2004; Turgay, 2009), Vibriosis (Timur ve Korun, 2004; Akaylı ve Timur, 2004; Demircan ve Candan, 2006), Pasteurellosis (Candan ve ark., 1996; Çolak, 1999; Yaman ve ark., 2003; Korun ve Timur, 2005) ve Bakteriyeel Böbrek Hastalığı olarak sıralanabilir (Savaş ve ark., 2006). Yetiştiriciliği yapılan levrek ve çipurada en sık karşılaşılan bakteriyel hastalık ise Vibriosisdir (Tanrıkulu ve ark.,2004). Yaşama ortamı itibariyle balıklar sürekli mikroorganizmalarla temas halindedir. Balık hastalıklarının ortaya çıkış nedeninde yaşama ortamı, etken, patojenin virulensi ve balığa ait etmenler (genetik, immun sistem vb.) önemlidir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Balıklarda hastalık nedenlerinin sınıflandırılması (Türk ve Oğuz, 2013).

Biyolojik nedenler	Biyolojik olmayan nedenler
Bakteriler	Balık Yemi
Parazitler	Su
Mantarlar	Genetik etmenler
Viruslar	

Balığın bağışıklık sistemini baskılayan stres, hastalıkların ortaya çıkmasında en önemli nedenidir. Çizelge 1.4'de çipura ve levrek balıklarında tanımlanan Gram negatif bakteriyel enfeksiyonları ve başlıca klinik belirtileri verilmiştir (Yaman ve ark., 2003). Stres nedeniyle ortaya çıkan hastalık ve insidensi kültürü yapılan balıklarda avcılık yoluyla tutulan balıklara göre daha yüksek olmaktadır (Rodgers, 2003). Kültür koşullarında strese neden olan etkenleri; pH, su sıcaklığı ve oksijen miktarındaki ani değişimler, taşıma, yemlemenin düzensiz ve dengesiz yapılması, yetiştiricilerin fiziksel müdahalesi, boylama, ortam hijyen eksikliği ve ortamda bulunan hastalık etkenleri olarak sıralanabilir (Rottman ve ark., 1992; Treves- Brown, 2000; Güralp, 2012).

Çizelge 1.4. Çipura ve levrek balıklarında tanımlanan Gram negatif bakteriyel enfeksiyonlar (Yaman ve ark., 2003).

Bakteri	Balık	Balık büyüklüğü	Başlıca Klinik Belirtileri
<i>Vibrio anguillarum serotip u.k</i>	Çipura	Larva	Larvada ölümler
<i>Vibrio anguillarum serotip 1</i>	Levrek	Yavru, yetişkin	Hemorajik septisemi
<i>Vibrio anguillarum serotip 3</i>	Levrek	Yavru	Septisemi
<i>Vibrio ordalii</i>	Levrek	Yavru, yetişkin	Septisemi
<i>Vibrio damsela</i>	Levrek, Çipura	Yavru	Enteritis
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Levrek, Çipura	Yavru, yetişkin	Deri lezyonları
<i>Vibrio harveyi</i>	Levrek, Çipura	Yavru, yetişkin	Ülseratif lezyonlar
<i>Pasteurella piscicida</i>	Levrek	Yavru, yetişkin	Dalakta nodüller
<i>Pasteurella piscicida</i>	Çipura	Larva, yavru	Dalakta nodüller
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Çipura	Yetişkin	Hemorajik septisemi
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Çipura	Yetişkin	
<i>Cytophage – benzeri bakter</i>	Levrek, Çipura	Yetişkin, yavru	Deri, ağız lezyonları
<i>Flexibacter maritimus</i>	Levrek	Yetişkin, yavru	Deri, solungaç lezyonları

1.2.1. Vibriosis

Deniz ve tatlı suda yaşayan balık türlerinin en önemli ve sık karşılaşılan bakteriyel hastalığı olan vibriosis gerek Türkiye’de gerekse tüm dünyada yaygın görülen bakteriyel balık hastalığıdır. 1985 yılında MacDonell ve Colwell’in yaptığı çalışmalarla etken *Listonella* grubuna dahil edilmiş ve hastalık *Listonellosis* olarak adlandırılmış ancak birçok araştırmacı hastalığı tanımlarken vibriosis terimini tercih etmiştir. Ayrıca hastalık pekçok literatürde red pest, cod pest, red disease, pestis rubia *anguillarum*, tuzlu su furunkulozisi, *erysipelosis anguillarum*, eye disease, ulcer disease ve bakteriyel dermatitis gibi adlarla da anılmaktadır (MacDonell ve Colwell, 1985; Hawke, 2000; Austin ve Austin, 2012; Buller, 2014).

Vibriosis, yaz aylarında su sıcaklığının 10 °C yi geçtiği veya suda çözülmüş oksijen seviyesinin düştüğü durumlarda ortaya çıkmaktadır. Yoğun yetiştiricilik yapılmasından ileri gelen stress ve kötü hijyen şartları da hastalığın çıkmasına neden olan diğer faktörler arasında yer almaktadır (Yaman ve ark., 2003; Austin ve Austin,

2012). Ayrıca, çevrede bulunan ağır metal (demir ve bakır) varlığı hastalığın şiddetlenmesinde rol oynadığı, bakır ve demirin farklı yoğunlukları ve temas sürelerinde hastalığın virulensini arttırdığı bildirilmiştir (Litwin ve Calderwood, 1993).

Yiagnisis ve Athanassopoulou tarafından yapılan (2011) çalışmada Vibriosis etkenlerinden *V. anguillarumun* daha çok su sıcaklığının arttığı mart, nisan ve mayıs aylarında ortaya çıktığı; haziran, temmuz ve en fazla eylül ayında olmak üzere *V. alginolyticus*'un hastalığa neden olan etkenler arasında baskın olduğunu belirtilmiştir. Hasta balıklarda klinik olarak deride koyulaşma, vücut yüzeyinde, abdominal kaslarda, yüzgeç hizası ve ağız etrafında nekrozlar, yer yer karın altında, kaudal yüzgeçte erimeler gözlenmektedir. Ayrıca bazı balıklarda asites ve ekzoftalmus gözlenmiştir. Nekropside ise karın duvarında, karaciğerde hemoraji ve enteritis görülür. Dalak, böbrek ve karaciğer normalden büyük ve nekrotik loblu olabilmektedir, Kronik enfeksiyonlarda deri ve kas ülserasyonu en belirgin hastalık bulgusudur (Demircan ve Candan, 2006; Hawke, 2000; Noga, 2010; Actis ve ark., 2011; Austin ve Austin, 2012).

Her yaştaki deniz balıklarından izole edilen *Vibrio* türleri, Gram negatif, hareketli, hafif kıvrık basil, 0,5 X 1,4-2,6 µm boyutlarında besi yerlerinde krem renge, yuvarlak, kenarları düzgün koloniler oluşturan, fermantatif, oksidaz pozitif, genellikle O/129'a duyarlı bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Tuz oranı % 1-3 ve su sıcaklığı 25- 30 °C olan sularda optimum üreyen bu bakteriler tatlı sularda da 1-4°C'de üreyerek balıklarda hastalığa neden olmaktadır (Toranzo ve Barja, 1990; Alsina, 1994; Yaman ve ark., 2003; Actis ve ark., 2011; Noga, 2010).

İlk olarak 1718 yılında Bonaveri tarafından yılan balıklarında "kızıl veba" olarak tanımlanmış ve Avrupa'da gözlenen ilk bakteriyel balık hastalığı olarak kaydedilmiştir (Austin ve Austin, 2012). *V. anguillarum* (*Listonella anguillarum*), *V. ordalii*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. damsela* (*Photobacterium damsela*), *V. harveyi*, *V. fischeri*, *V. chagasii*, *V. splendidus*, *V. cholerae non-O1*, *V. marinus*, *V. ichthyoenteri*, *V. pelagius*, *V. trachuri*, *V. salmonicida*, *V. tubiashii*, *V. campbelli*, *V.*

parahaemolyticus, *V. viscosus* sınıflandırmaya sonradan katılan pekçok *Vibrio* türü vibriosis etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Schiewe ve ark., 1981, Dalsgaard ve ark., 1999; Austin ve Austin, 2012). Deniz balıklarında Vibriosis etkenleri ve coğrafik dağılımları bakımından değişiklik göstermektedir (Çizelge 1.5)

Hasta levreklerden izole edilen *Vibrio anguillarum* ve diğer vibriosis etkenleri % 77 oranında en fazla hastalığa neden olan bakteri sınıfıdır (Yiagnisis ve Athanassopoulou, 2011).

Çizelge 1.5. Deniz balıklarında Vibriosis etkenleri ve coğrafik dağılımları (Noga, 2010; Austin ve Austin, 2012; Güralp, 2012; Buller, 2014)

Etken	Hastalık adı	Balık türü	Coğrafik Dağılım	Referans
<i>V. anguillarum</i>	Vibriosis	Atlantik salmonu Kalkan balığı Deniz levreği Çipura Çizgili levrek Yılan balığı Ayu balığı Morina balığı Kırmızı mercan	Amerika, Avrupa, Türkiye, Japonya, İsrail, Kuveyt	(Noga, 2010; Austin ve Austin, 2012; Güralp, 2012; Buller, 2014)
<i>V. ordalii</i>		Salmonoidler Çipura	Akdeniz ülkeleri, Türkiye	
<i>V. alginolyticus</i>		Atlantik salmonu Çipura Kalkan balığı Yılan balığı	İsrail, İskoçya, Kızıl deniz	
<i>V. cholerae</i>		Ayu balığı	Japonya	
<i>V. tischeri</i>		Çipura Kalkan balığı		
<i>V. splendidus</i>		Atlantik salmonu Çipura Kalkan	İspanya, İskoçya	
<i>V. harvei</i>		Çipura Levrek Dil balığı	ABD, Tayvan, İspanya	
<i>V. parahaemolyticus</i>		Çipura	Çin, Türkiye, ABD	
<i>V. salmonicida</i>		Atlantik salmonu Morina balığı	Atlantik salmonu Morina balığı	
<i>V. pelagius</i>		Kalkan balığı	İspanya, Norveç	
<i>V. ichthyoenteri</i>		Kuluçkahane	Japonya	
<i>V. campbelli</i>		Levrek	İspanya	
<i>V. vulnificus</i>		Yılan balığı	Japonya, Danimarka, ABD, İspanya	
<i>V. viscosus</i>		Kış ülseri	Atlantik salmonu Kalkan balığı	

1.2.1.1. *V. anguillarum*

V. anguillarum, en sık tespit edilen vibriosis etkeni olarak bildirilmiş ve ülkemizde ilk olarak çipura balıklarında izole edilmiştir (Candan, 1991). Çipura, levrek ve yılan balığı gibi 48'den fazla deniz ve tatlı su balığı türünde etken hastalığa neden olmaktadır (Akaylı ve ark., 2009).

V. anguillarum, Vibrionaceae familyasının ait, Gram negatif, hareketli, tek flagella, kıvrık çomak şeklinde, guanin ve sitozin (G+C) içeriği % 45,6-46,3 olan, 20-30°C'de % 1,5-2 NaCl içeren TSA (Triptik soy agar) ve NA (Nutrient agar) gibi zengin besi yerlerinde rahatça üreyebilen, agarda yuvarlak düzgün, krem renkli koloniler oluşturan halofilik bakteridir. Katalaz, sitokrom oksidaz, ONPG (β - galaktosidaz), indol, nitrat, jelatin, amilaz, arjinin dihidrolaz, glukoz, mannitol, sakkaroz, mannoz, sorbitol, fruktoz testleri pozitif; lüminisans, üre, ornitin ve lizin dekarboksilaz, glukozdan gaz oluşumu ve laktoz testleri negatif sonuç verir (Buller, 2014; Austin ve Austin, 2012). İnositol, MK, VP, eskülin, arabinoz, maltoz ve galaktoz testlerinde ise farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca *V.anguillarum*'un tanısında O/129'a hassaslık, TCBS agarda sarı ve yeşil koloni oluşturma ve seçici besi yerinde (VAM) sarı koloni oluşturma kullanılan diğer testler olmaktadır (Austin ve Austin, 2012). Bazı kültürlerde O/129'a direnç geliştiği ve hareketsiz olduğu bildirilmiştir (Muroga ve ark., 1979).

İlk olarak 1977 yılında Schiwe ve arkadaşları tarafından iki farklı biyotipe ayrılmıştır. *V. anguillarum*'un toplamda 23 O serotipi bulunmaktadır. Biyotip 1 ve Biyotip 2 salgınlarda en çok karşılaşılan serotipler olmaktadır. Biyotip 2 olarak tanımlanan tür 1981 yılında *V. ordalii* olarak isimlendirilmiştir (Actis ve ark., 2011; Öztürk ve Altınok, 2014). TCBS agarda üreme özelliği ile *V. anguillarum* ayırt edilmektedir. Etken normal deniz mikroflorasında yer almakta olup virulent ve avirulent suşları uzun süre varlığını sürdürebilmektedir. Etken horizontal olarak su ile ya da enfekte balıklar (deriden doğrudan, solungaç veya anüs) aracılığıyla yayılmaktadır. Yapısındaki endotoksin ve ekzotoksinleri etkenin patojenitesini belirlemektedir. Aynı zamanda deniz suyu sıcaklığı da etken virülensinde etkili

olmaktadır (Stickney, 2000). Virulens mekanizmaları ise patojenin yüksek demir taşıma sistemi, plazmid ya da siderefor aracılı sistemlerdir. Park ve Chun (1986) yaptıkları çalışmada *V. anguillarum*'un 25 °C'de sazan ve çipura balıklarında virulent olduğunu ancak 15 °C'de avirulent olduğunu belirtmişlerdir. 1983 yılında yılan balıklarından izole edilen virulent *V. anguillarum* suşuyla yapılan çalışmada etkenin flagella sayısı ile patojenitesi arasında ilişki olduğu ortaya konulmuştur (Chart ve Trust, 1984).

V. anguillarum'un virulensinin en fazla olduğu O1 ve O2 suşları arasındaki farklılıkları ortaya koymak için pek çok araştırmacı moleküler metotlar kullanmıştır (Toranzo ve ark., 1997; Noga, 2010; Austin ve Austin, 2012). Ayrıca kuzey ve güney Avrupa ülkelerinde tespit edilen O2 suşları arasındaki farklılıklarda ortaya konulmuştur (Toranzo ve ark., 2005).

1.2.1.2. *V. alginolyticus*

Çipura ve deniz somon balıklarının yetiştiriciliğinde sıklıkla karşılaşılan *V. alginolyticus* ilk olarak 1955 yılında hastaneye gelen Japonya'da akut gastroenteritis tanısı konulan bireyde tespit edildi. Sakazaki ve ark., (1963) *V. parahaemolyticus* tip 2 olarak isimlendirmiş ancak araştırmacı 1968 'de yaptığı çalışmada *V. alginolyticus* olarak yeni bir tür olarak etkeni sınıflandırmıştır. İsrail'de çipura yetiştiriciliği yapılan işletmelerde ilk kez saptanmış, kefal ve yılan balıklarında da görülmüştür (Sakazaki ve ark., 1968; Timur ve Timur, 2003).

Türkiye'de Çağırğan tarafından 1993 yılında ilk kez tespit edilmiştir. Etken ülser, septisemi, hemoraji ve peritonda sıvı birikimi gözlenen balıkların dalak, karaciğer ve böbreklerinden izole edilmiştir. Deniz balığı yetiştirilen tanklardaki sulardan izole edilmiş, bu nedenle enfeksiyonun ortaya çıkmasında kontamine suyun da önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Çağırğan, 1993; Yaman ve ark., 2003; Buller, 2004; Mustapha ve ark., 2013; Austin ve Austin, 2012).

Vibrionaceae familyasına ait, fermentatif Gram negatif, çomak şeklinde, hareketli, guanin ve sitozin (G+C) içeriği % 45 - 47 olan etkenin 37 °C'de % 7 NaCl içeren besi yerinde üreyebildiği tuzsuz ve % 10 tuz ilave edilmiş ortamda üreyemediği bildirilmiştir. TSA besiyerinde yayılımcı tarz koloni oluşturması ile diğer vibriolardan ayrılmaktadır. Bu durumun sahip olduğu peritrik flagella ile ilgili olduğu ve bunun da kültür şartlarına göre değiştiği bildirilmiştir. Katalaz, oksidaz, H₂S, indol, ODC, LDC, ornitin, lizin dekarboksilaz, MR ve VP testlerinin pozitif, arjinin dihidrolaz, eskulin ve ONPG (β - galaktosidaz) testlerinin negatif sonuç verdiği, nitrat, jelatin, üreaz kullandığı, glukoz, mannitol, sakkaroz, mannoz, sorbitol, fruktoz gaz oluşumu pozitifken arabinoz laktoz ve inositolden gaz oluşumu negatiftir (Austin ve Austin, 2012; Buller, 2014). Etken, TCBS agarda geniş sarı koloni oluşturur ve deniz tuzu içeren kanlı agarı hemolize eder. *V. parahaemolyticus* ile oldukça benzer özelliklere sahip olup biyokimyasal testlerle ayırt etmek mümkün değildir. Benzer durum *V. alginolyticus* ve *V. harveyi* türlerinde arasında geçerlidir. Bu iki türün ayırımında VP testi ve glukuronat fermentasyonu testleri kullanılmaktadır (Mustapha ve ark.,2013; Buller, 2014). *V. anguillarum*'da olduğu gibi etkenin virulensi çevresel faktörlere (tuz, sıcaklık gibi) göre değişkenlik göstermektedir (Stickney, 2000).

V.alginolyticus araştırmacılar tarafından fırsatçı patojen olarak ifade edilmiştir. Stress nedeniyle zayıf düşmüş balıklarda ve hasar almış, mukozal bütünlüğü bozulmuş balıklarda ikincil enfeksiyon etkeni olarak tespit edilmiştir. Hastalanan balıklarda korneal opasite ve eksoftamik göz belirgin semptomatik özelliştir. Sıklıkla ince bağırsaklar ve safra kesesi açık sarı renkli sıvı içermektedir (Burke ve Rodgers, 1981; Lee, 1995; Austin ve Austin, 2012)

Etken Japonya'da kontamine deniz ürünlerini çiğ tüketen insanların dışkılarından izole edilmiştir. Ayrıca İngiltere'de 2011 yılında yapılan bir çalışmada yüzeysel yaralanması olan insanlarda etken nedeniyle kontamine deniz suyu temasıyla kulak enfeksiyonu vakaları ile karşılaşmıştır (Korun, 2009; Reilly ve ark., 2011).

1.2.2. Hastalık Tanı Yöntemleri

Hastalıkla mücadelede amaç en kısa sürede doğru, hasas ve güvenilir bir şekilde hastalık etkenini tanımlamak ve hastalık yayılmadan kontrol altına almaktır. Yetiştirme sırasında ortaya çıkan hastalık kısa zamanda diğer balıklara bulaşarak hızlı yayılır. Patojenin kısa zamanda tespiti, gerek hastalığın yayılımının kontrol edilmesi gerekse çevre (serbest dolaşan balık, diğer su canlıları ve sucul ortam) açısından da önemlidir (FAO, 2000). Anemnez ve klinik bilgiler doğru teşhis için önemlidir. Hastalık etkeni bakterilerin teşhisi için balıkların iç organlarından besiyerlerine ekimler yapılarak etken izolasyonu gerçekleştirilir. Elde edilen saf kültürler morfolojik, biyokimyasal, serolojik ve moleküler testler yardımıyla teşhis edilir (Austin ve Austin, 2012; Buller, 2014).

1.2.2.1. Konvansiyonel Bakteriyolojik Yöntemler

Bakterilerin kültürel özelliklerini incelemeye, bunların katı ve sıvı ortamlardaki saf kültürleri kullanılır. Bu aşamada izolasyon ve izolatin saflık kontrolü gibi uygulamalar önemlidir. Bu amaçla hastalık etkeni normal veya seçici besi yerine (VAM, TCBS gibi) ekilir. Bakteri kültürleri etken için gerekli olan optimal ısı derecesinde ve aerobik, mikroaerofilik veya anaerobik koşullarda uygun bir süre inkubasyonda bırakılır. Balık hastalıklarında ise etken, daha çok özel besi yerine ve 20-25 °C'lik inkubasyon sıcaklığına ihtiyaç duymaktadır. Hastalık etkenini çoğaltmak, izole etmek için katı besi yeri ekimi veya özel yayma teknikleri kullanılmaktadır. Kullanılan tekniklerde amaç mümkün olduğu kadar mikroorganizmayı tek koloni olarak düşürmektir. Morfolojik sınıflandırma için katı (agar) besiyerine ekilen etkenin koloni yapısı, şekli, rengi gibi koloniye ait ilk tanımlamalar yapılır. Bakteriyel izolasyonda kullanılan besi yerleri bakteri türüne göre değişmekte olup bazı türlerde belirleyici tanı olmaktadır (Buller, 2014).

Sınıflandırmanın ilk basamağını oluşturan Gram boyama yöntemiyle bakteri morfolojik olarak ayırt edilmektedir. Gram pozitif ve Gram negatif olarak genel ayrımı

yapıldıktan sonra bakterilere katalaz üretimi, sitokrom oksidaz reaksiyonu, oksidasyon-fermentasyon (O/F), glukoz testi, indol üretimi, Metil-red (MR) ve Voges-Prousker (VP) testleri, lizin ve ornitinden dekarboksilaz üretimi, arjinin dihidrolaz üretimi, eskülin üretimi, sitrat kullanımı, nitrat redüksiyonu, amilaz, jelatin, β -galaktosidaz (ONPG), üreaz üretimi, şeker fermentasyon testleri, farklı tuzluluk (% 0, 3, 8, 10 ve 15) ve sıcaklık (4, 37 ve 44 °C) toleranslarının belirlenmesi ve özellikle balık patojenlerinin sınıflandırılmasında O/129 (10 μ g ve 150 μ g) gibi bazı biyokimyasal testler uygulanmaktadır (Alsina ve Blanch, 1994; Whitman, 2004; Buller, 2004).

Ayrıca etkenin hızlı teşhisine olanak sağlayan biyokimyasal reaksiyon temelli API hızlı tanı kitleri günümüzde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Austin ve Austin, 2012; Buller, 2014). Ondokuz enzimatik reaksiyonun belirlendiği test kitleri bakteri morfolojisine göre seçilmektedir. Balıklarda hastalık etkenlerinden Gram negatif ve fermentatif çomak olanların teşhisinde API 20E, Gram negatif ve fermentatif olmayan çomakların teşhisinde API 20NE kullanılmaktadır. Bu kitlerin dışında 6 adet daha kit bulunmakta ve teşhis için kullanılmaktadır (Biomerieux, 2016; Buller, 2014).

1.2.2.2. Aglütinasyon Yöntemleri

Biyokimyasal testleri destekleyici amaçla serolojik yöntemler de günümüzde kullanılmaktadır. Aglütinasyon test kitleri kolay, hızlı, ucuz ve sahada kullanımının uygun olması nedeniyle balık hastalıklarının teşhisinde de tercih edilmektedir (Austin ve Austin, 2012).

1.2.2.3. Moleküler Tespit ve Görüntüleme Yöntemleri

Klinik belirtiler göstermeyen taşıyıcı canlılar hastalık etkenlerini taşımakta ve hastalığın yayılımını arttırmaktadır. Balık populasyonunda taşıyıcı balıklardan hastalık etkeninin tespiti oldukça zor olmaktadır. Rutin kullanılan biyokimyasal ve serolojik testler tespitte yetersiz kalmaktadır. Ayrıca yumurta ve larvalardan etken izolasyonu erginlere göre daha da güç olmaktadır. Bununla birlikte aynı genus içindeki bakteri suşları arasında klasik testlerde farklılık olmadığı gözlemlenmiştir (Shewan ve McMeekin, 1983; Türe ve ark., 2012).

Moleküler teknikler, hastalık etkenlerinin tespitinde daha hızlı ve duyarlı olmasıyla klasik yöntemlere göre yetiştiricilere avantaj sağlamaktadır. Ayrıca asemptomatik hasta balıklardan etken tespiti salgın hastalıkların önlenmesi ve kullanılan antibiyotik miktarlarının azalmasına neden olmaktadır. Buna bağlı olarak gelişmekte olan antibiyotik direncinin kontrolü ve ilaçların çevre üzerindeki etkisini azaltılmakla katkı sağlanmaktadır. Moleküler yöntemler kültürü zor yapılan, yapılamayan hatta ölü bakteriden nükleik asit tespiti ile hastalık teşhisine olanak sağlamıştır (Altınok ve Kurt, 2003).

Balıklarda son 20 yıldır kullanılan moleküler yöntemler önceleri etken tespitinde kullanılmakta iken günümüzde etkenin yayılımı, korunma önlemleri konusunda da kullanılmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda da sıklıkla başvurulan yöntemler arasındadır (Teletchea, 2009; Türe ve ark., 2012).

Balık hastalıklarında etkenin doğrudan teşhisi ve etken karakterizasyonunun doğrulanması amacıyla keza 1980'den itibaren yaygın bir şekilde RAPD, PCR-RFLP, AFLP, Real Time PCR, RT-PCR (reverse transcription PCR) gibi farklı PCR yöntemleri özellikle kültürü zor olan bakteri ve virüslerin teşhis edilmesi için sıklıkla tercih edilmektedir (Altınok ve Kurt, 2003).

PCR'nun amacı çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü ve tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda sentetik oligonükleotid primerler kullanılarak, primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak çoğaltılmasıdır. Üç basamaktan oluşmaktadır. Bunlar; çoğaltılacak DNA'nın yüksek sıcaklıkta (94°C), denatürasyonu, primerlerin DNA üzerindeki hedef bölgelerle uygun sıcaklıkla birleşme (annealing) reaksiyonu, son basamak Taq DNA polimeraz enziminin 72 °C'de primerlerin uzaması ile zincir sentezini oluşturmasıdır. Elde edilen PCR ürünleri Agaroz Jel Elektroforez yöntemi kullanılarak görüntülenip ayrımı yapılmaktadır. Yöntemde, amplifikasyon ürünleri agaroz jellere uygun tampon kullanılarak uygulanır. Hafif moleküller hızlı ilerlerken ağır olanlar daha yavaş ilerlemektedir. Elektrik akımı ile ayrılan farklı DNA parçalarına ait bantları saptamakta çift iplikçikli DNA'nın baz çiftlerine bağlanan floresan boya (Etidiyum bromür, red safe gibi) kullanılır ve UV ışık altında değerlendirilir (Sambrook ve ark., 1989; Newton ve Graham, 1994; McPherson ve Møller, 2006).

V. anguillarum (Martinez-Picado ve ark., 1994; Powell ve Loutit, 1994 González ve ark., 2003; Rodkhum ve ark., 2005, 2006; Kim ve ark., 2008; Crisafi ve ark., 2011), *V. alginolyticus* (Zhou ve ark., 2007, Cai ve ark., 2009, 2010), *L. garvieae* (Zlotkin ve ark., 1998; Türe, 2012), *Photobacterium* (Osorio ve ark., 1999; Amagliani ve ark., 2009; Rajan ve ark., 2003), *Flavobacterium* (Izumi ve Wakabayashi, 1997; Liu ve ark., 2001; Izumi ve ark., 2005), *Y. ruckeri* (Altinok ve ark., 2001; Soto et al . 2010) gibi birçok balık patojeninin teşhisinde çeşitli PCR yöntemleri kullanılmıştır.

Bakterilerin sınıflandırılmasında klasik yöntemler (morfolojik, metabolik, fizyolojik ve kimyasal karakter tayini) filogenetik ilişkiyi ortaya koymakta yetersiz kalmaktadır. Bu da birçok farklı bakteri grubunun dolayısıyla neden oldukları hastalıkların tanımlanmasında ciddi bir sorun olmaktadır. Son yıllarda moleküler yöntemlerin gelişmesiyle bakterilerin yakın akrabaları ile olan ilişkileri de ortaya konulmaktadır. Bu amaçla bakterilerin spesifik 5S, 16S ve 23S rDNA dizileri moleküler teşhisin yapılmasında kullanılır. Dizi analizi, bir DNA molekülün nükleotidlerinin belirlenmesi olarak tanımlanmıştır. İzolatların ayrımında en ideal yöntem DNA dizisinin kullanılmasıdır. Bu amaçla türe göre değişken dizileri

barındıran ve korunma oranı diğerlerine göre yüksek olan 16S rDNA gen dizisi bakterilerin PCR ile tanısı için primer bölgelerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bakterilerin, teşhisi ve filogenetik sınıflandırmaları GenBank veri tabanında bu dizilerin karşılaştırılmasıyla yapılır. Dizi analizinde en çok kullanılan yöntem Sanger yöntemidir (Sanger ve ark., 1977; Martinez-Picado ve ark., 1994; Osorio ve diğ., 1999; Nascimento, 2011).

Çalışma prensibi, dizilenecek DNA parçaları primerler yardımıyla PCR ile çoğaltılır, dizileme cihazının kapillerinin (anot ve katot arasında uzanır), polimerle doldurulmasının ardından negatif yüklü PCR ürünü DNA örneğini çekerek pozitif yüklü anoda doğru ilerleyerek, ışıkla uyarılan floresan boyaların yansıttığı ışığın detektör tarafından kaydedilmesine dayanmaktadır. Kaydedilen veriler matematiksel olarak değerlendirilerek bir grafikte (elektroferogram) görüntülenmektedir. Görüntülenen grafik çeşitli yazılımlarla incelenebilir. DNA dizileme, genetik mutasyonları (direncin tespiti), gen polimorfizmi ve bakteriyel identifikasyon tespit etmede kullanılmaktadır (Sanger ve ark., 1977; Srinivasan ve ark., 2015).

1994 yılında Martinez-Picado ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada *V. anguillarum*'un 16S rRNA dizi analizi kullanılarak oligonükleotid tasarlanmış ve işaretli spesifik proplar kullanılarak etkenin çevredeki suşlardan ve yakın türlerden ayrımı yapılmıştır (Martinez-Picado ve ark., 1994). Hong ve ark., (2007) *V. anguillarum*'u konvansiyonel PCR kullanarak identifiye etmiştir. *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, ve *V. harveyi* gibi yakın özelliklere sahip türleri birbirinden ayırt etmede 16S rRNA'nın kullanışlı olmadığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Thompson ve ark., 2007). *V. harveyi* ve *V. campbellii* gibi özellikleri birbirine çok yakın suşların DNA benzerlik oranı % 69, 16S rRNA benzerlik oranı % 97 olmaktadır. Spesifik primerler ve dizi analizi ile *V. harveyi* teşhis doğru teşhis edilmiştir (Lopez ve ark., 2009). 16S rRNA analizinde *Vibrio alginolyticus* ve *V. parahaemolyticus*'un %99.7 homolog oldukları saptanmıştır (Ruimy ve ark., 1994).

Osorio ve ark., 1999'da yaptığı çalışmada pasteurellosisin etkeni *P. damsela* subsp. *damsela*'yı 16S rRNA analizi ile *P. damsela* subsp. *piscicida* olarak tekrar

sınıflandırmışlardır (Osorio ve ark., 1999). Rajan ve ark., (2003)'te iki türü hızlı olarak PCR ile ayırt etmiştir.

Direncin karakter özellikleri genetik kodlamadan ileri gelmektedir ve moleküler yöntemler bu amaçla antibiyotik direncine neden olan genin tespitinde kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan gen belirteçleri Çizelge 1.6.'da verilmiştir.

Çizelge 1.6. Direnç mekanizmalarının ve gen belirteçleri (Boerlin ve White, 2008; Sekkin ve Kum, 2011)

Antibakteriyel	Direnç mekanizması	Genetik belirleyici örnekler
Tetrasiklin	<i>E. coli</i> ve diğer Enterobakteriler de tetrasiklinlerin uyarılabilir efluks, ribozomal korunma	tetA, tetB, tetD, tetM
	Gram (+) bakteride ribozomal koruma	tetO, tetM
Kloramfenikol	Enterobakterilerdeki efluks	cmlA, floR
	Enterobakterilerde asetilasyon	catA
Beta-Laktam	Enterobakterilerde, <i>Staphylococcus aureus</i> 'larda Beta-Laktamaz	blaTEM, blaSHV, blaCMY-2, blaZ
Oksasilin, Metisilin	<i>Staphylococcus aureus</i> da Alternatif penisilin bağlayıcı proteinler	mecA geni
İmipenem	<i>Enterobacter aerogenes</i> ve <i>Klebsiella sp.</i> azalmış porin oluşumu	Mutasyonlar
Aminoglikozidler	Gram (-) ve (+) bakterilerde aminoglikozidlerin fosforilasyon, adenilasyon ve asetilasyonu	Özgüllükleri çok çeşitli birçok genler
Streptomisin	Ribozomal proteinlerin değişimi veya <i>Mycobacterium sp.</i> in 16s ribozomal RNA'sı	Mutasyonlar
Makrolidler, Linkozamidler, Streptograminler	Gram (+)'deki ribozomal RNA'nın metilasyonu	ermA, ermB, ermC
Makrolidler,	<i>Staphylococcus sp.</i>	vga(A), msr(A)
Fluorokinolonlar	Kinolonlara düşük ilgili DNA topoizomerazlar, Plazmid aktarımlı ve çoklu ilaç direnci	gyrA, gyrB, parC, parE, mar, qnrB, qnrS qnrC
Sülfonamidler	Gram (-) bakterilerde ek dirençli dihidropteroat sentetaza giden yollarda	Sul1, sul2, sul3
Trimetoprim	Ek dirençli dihidrofolat redüktaza giden yollarda tıkanıklığı açarak	Çeşitli DFR genler

1.3. Balık Yetiştiriciliğinde Kullanılan Antibakteriyel İlaçlar

Bakteriyel balık hastalıklarında bağışıklık uyarıcı, probiyotik kullanımı ve aşı uygulamaları gibi sağaltım seçenekleri günümüzde özellikle veteriner hekimlikte bakteriyel enfeksiyonların kontrolü için kullanılmaktadır. Balık yetiştiriciliğinde en fazla antibakteriyel ilaçlar kullanılmakta bunu kimyasal dezenfektanlar, pestisitler, anestezi maddeler, mineraller ve vitaminler olmak üzere pek çok kimyasallar takip etmektedir (Treves-Brown, 2000; Sanders, 2005; Akşit, 2016). Aşılar, yetiştiricilikte bakteriyel hastalık etkenlerini kontrol etmede antibiyotiklerin yerini önemli ölçüde almıştır. Ancak antibakteriyel ilaçlar halen aşılamanın yapılamadığı veya yetersiz olduğu kuluçkahanelerde hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Armstrong ve ark., 2005). Antibakteriyel ilaçların balık yetiştiriciliğindeki hastalığın sağaltım ve kontrolüne yönelik kullanımı ve kullanım şekilleri ülkeden ülkeye, ülke içerisinde bulunan farklı işletmelerde bile değişiklik göstermektedir (Horsberg, 1994; Burka ve ark., 1997; Defoirdt ve ark., 2011). Kullanılan antibiyotikler bulaşıcı hastalıkların önlenmesinin yanı sıra yumurta, larva veya anaçların yeni tesislere ve deniz kafeslerine taşınması sırasında oluşabilecek kayıpların azaltılmasında da kullanılır (Phillips ve ark., 2004; Lupin, 2009). Su ürünlerinde kemoterapötiklerin kullanımı hem yasal olarak hem de kullanımı bakımından sınırlıdır. Maliyet, ilacın uygulama yolu, toksisitesi, ilacın absorpsiyonu ve çevreye etkisi kullanımı sınırlandıran faktörler arasındadır.

1930'lu yıllarda ilk denenen antimikrobiyal madde olan sülfonamidler (sülfamerazin) daha sonra ABD'de furunkulozis' in sağaltımında kullanılmaya başlanmıştır. Balıklarda toksik olduğu anlaşılan sülfonamidler 1970'li yıllarda kısa zamanda Avrupaya yayılırken, ABD'de balıklarda kullanım için yasal izni 1985 'te verilmiştir (Alderman, 1988; Okamoto, 1992; Stickney, 2000; Smith, 2002).

Sülfonamidlere karşı dirençli bakterilerin ortaya çıkmasıyla kloramfenikol kullanılmaya başlanmış ancak kloramfenikol'ün daha sonra yapılan çalışmalarda istenmeyen etkileri tespit edilmiş ve ABD'de kullanımı azalmış, yerini daha ucuz olan oksitetrasiklin HCl 'e bırakmıştır. Son yıllarda Oksitetrasiklin HCl (OTC) deniz ve

akvaryum balıklarının bakteriyel hastalıklarının sağaltımında dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılmaktadır (Benbrook,2002; Erdoğan, 2012). Nitekim bu maddelerin kullanıma girmelerini izleyen yıllar içinde, sağaltıcı etkilerinin yanında özellikle koruyucu ve gelişmeyi hızlandırıcı olarakda yaygın kullanılmaları, insan ve hayvanlarda dirençli bakteri suşlarının oluşmasına neden olarak halk sağlığı açısından büyük risk oluşturmuş; bu yüzden büyük ölçüde kullanım sınırlandırılmıştır. Yetiştiricilikte antibakteriyel ilaçlar sıklıkla kullanılmasına rağmen, kullanılan antibakteriyel ilaçların miktarları konusunda sınırlı bilgi mevcuttur (Sapkota ve ark., 2008; Heuer ve ark., 2009).

Sadece su ürünleri yetiştiriciliği için üretilen antibiyotikler mevcut olduğu gibi farklı tür hayvan ve diğer alanlar için geliştirilen antibiyotikler de yetiştiricilikte kullanılmaktadır (Erdoğan, 2012). Ülkemizde ve tüm dünyada balık hastalıklarını tedavi etmek için çeşitli antibakteriyel ilaçlar kullanılmaktadır. Ülkemizde Aralık 2016 tarihi itibarıyla su ürünlerinde kullanılan 41 adet ruhsatlı ilaç bulunmaktadır. Ruhsatlı ilaçlar yıllara göre farklılık göstermekle (Çizelge 1.7) birlikte bu ilaçlardan 17'si florfenikol, 11'i oksitetrasiklin, 9'u sülfadiazin+ trimetoprim, 2'si enrofloksasin ve 2'si amoksisiklin etken maddesi içermektedir (GKGM, 2016).

Çizelge 1.7. Balık Yetiştiriciliğinde kullanılan Ruhsatlı Antibiyotik İlaç Etken Listesi (GKGM, 2014, 2016)

Antibakteriyel ilaç/ Yıl	2014 Şubat	2016 Aralık
Florfenikol	15	17
Oksitetrasiklin HCl	12	11
Amoksisilin trihidrat	2	2
Sülfadiazin-Trimetoprim	9	9
Enrofloksasin HCl	2	2
Oksolinik asit	1	-
Toplam	41	41

1.3.1. Tetrasiklinler

Tetrasiklinler, sülfonamidler ve makrolidler beşeri ve veteriner hekimlikte oldukça yaygın kullanılan antibiyotik ilaç gruplarıdır (Kim ve Carlson, 2007).

Etkin, ucuz ve düşük toksiteli olması dolayısıyla tetrasiklinler su ürünlerinde tercih edilen antibiyotik grubu olmaktadır. 1950'lerde kullanıma giren tetrasiklinler 30s ribozomal alt üniterine bağlanarak protein sentezini önleyerek etkirler. Geniş spekturumlu olan tetrasiklinler Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde bakteriyostatik etkilidir. Uygulama yoluna göre etkinlikleri farklılık gösterir (Çizelge 1.8, Yetiştiricilikte kullanılan bazı antibakteriyel ilaçların dozları, uygulama yolları ve yarılanma ömürleri). Yemle karıştırılarak verildiğinde etkinliği iyi olmaktadır ancak banyo olarak uygulandığında biyoyararlanımı deniz balıklarında Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi deniz suyunda bulunan iki değerlikli katyonlara bağlandığı için %10'un altına inmektedir. Bu sebeple sağaltım dozu suların sertliğine göre değişim göstermektedir (Baydan ve ark., 2012).

Kuluçkahane ve yetiştirme kafeslerinde sıklıkla ülser tedavisi, furunkulosiz ve bakteriyel hemorajik enfeksiyonlarının sağaltımında kullanılmaktadır. Yarı ömrü uzun olan OTC % 59-90 değişen oranda metabolize olmadan dışarı atılmaktadır (Namdari, 1999; Seyfried ve ark., 2010). Bu da kullanılan OTC'nin sedimentte birikmesinin ana sebebini oluşturmaktadır. Sedimentte parçalanmadan ve güneşten etkilenmeden uzun süre varlığını koruyan (3-6 ay) OTC'nin sürüklenip diğer balıklara ve insanlara geçebilmesi söz konusudur (Schimith ve ark, 2004). Ayrıca yemle birlikte ortama geçen ilacın bir kısmı doğal ortamdaki balık ve diğer kabuklu canlılar tarafından alınır. Kümülatif olarak balık ve kabukluların bünyesinde birikerek yüksek konsantrasyonlara ulaşmaktadır. Kullanımı sınırlandırılmış olmasına rağmen yapılan taramalarda OTC insan tüketimi için kabul edilebilir miktarı aşmaktadır (Benbrook, 2002; Baydan ve Yurdakök, 2009; Topal ve ark., 2012). Atlantik somonların vibrio ve Yersinya enfeksiyonları, sazanların Flavobacteri ve alabalıkların Kolumnaris enfeksiyonlarının sağaltımında sıklıkla tercih edilmektedir (Treves- Brown, 2000).

Çizelge 1.8. Yetiştiricilikte kullanılan bazı antibakteriyel ilaçların dozları, uygulama yolları ve yarılanma ömürleri (Reimschuessel ve ark., 2005).

İlaç	Tür	t ½ (saat)	Doz	Uygulama Yolu	°C
Amoksisilin	Atlantik Somonu	120	12,5 mg/kg td	Kİ	13
	Atlantik Somonu, Çipura	14-72	40-80 mg/kg td	Dİ/PO	16-22
Enrofloksasin	Atlantik Somonu, Kırmızı Pacu, Gökkuşluğu Alabalığı, Deniz Levreği, Deniz	24-105	5-10 mg/kg td	Kİ/Dİ/P O	10-26
Florfenikol	Atlantik Somonu	12-30	10 mg/kg td	Dİ/PO	10-11
	Morina Balığı	39-43	10 mg/kg td	Dİ/PO	8
Flumekuin	Yılan Balığı	255	9 mg/kg td	Kİ	23
	Atlantik Pisi Balığı, Kahverengi Alabalık, Çırçır Balığı, Atlantik Somonu, Morina Balığı, Deniz Levreği, Deniz Çuprası, Kalkan	21-96	5-25 mg/kg td	Pİ/Dİ/PO	5-25
	Yılan Balığı	208-314	10 mg/kg td	Dİ/PO	23
	Gökkuşluğu Alabalığı	285-736	5 mg/kg td	Dİ/PO	13 veva
	Atlantik Somonu, Çırçır Balığı, Yayın Balığı, Morina Balığı, Gökkuşluğu Alabalığı, Mercan Balığı	15-87	4-20 mg/kg td	Pİ/Dİ	8-24
Oksolinik asit	Atlantik Somonu, Morina Balığı, Gökkuşluğu Alabalığı	82-146	25-75 mg/kg td	PO	5-8
	Atlantik Somonu, Çipura Gökkuşluğu Alabalığı, Sivriburun Karagöz, Kalkan	13-48	10-40 mg/kg 10 doza kadar	PO	9-19
	Afrika Kedibalığı, Sazan, Gökkuşluğu Alabalığı, Kırmızı Pacu, Kızıl Somon	63-95	5-60 mg/kg td	Kİ	12-25
Oksitetrasiklin	Afrika Kedibalığı, Atlantik Somon, Sazan, Kral Somon, Yılan Balığı, Gökkuşluğu Alabalığı, Kırmızı Pacu, Deniz Levreği, Deniz Çuprası	6-167	5-60 mg/kg td	Dİ	8-25
	Atlantik Somon, Siyah Çipura, Sazan, Yayın Balığı, Yılan Balığı, Gökkuşluğu Alabalık, Levrek, Çipura, Tatlı Su Levreği, Dil Balığı	43-268	10-100 mg/kg 10 doza kadar	PO	7-27
	Kral Somon, Kızıl Somon	428-578	10-100 mg/kg td	PO	6-11

Dİ: Damar içi; **Kİ:** Kas içi; **Pİ:** Periton içi; **Po:** per os; **td:** terapötik doz

Çizelge 1.8. (devamı) Yetiştiricilikte kullanılan bazı antibakteriyel ilaçların dozları, uygulama yolları ve yarılanma ömürleri (Reimschuessel ve ark., 2005).

Sülfadiazin	Atlantik Somon, Sazan Gökkuşığı Alabalık	26-96	25-200 mg/kg td	Dİ/PO	8-24
Sülfadimetoksin	Atlantik Somon, Yayın Balığı, Gökkuşığı Alabalık, Tatlı Su Levreği	1-48	25-200 mg/kg td	Dİ/PO	10-20
Sülfadimidin	Sazan, Gökkuşığı Alabalık	18-57	100-200 mg/kg	Dİ/PO	10-20
Sülfametoksipridazin	Gökkuşığı Alabalık	72	200 mg/kg td	PO	13
Sülfamonometoksin	Gökkuşığı Alabalık, Sarıkuyruk Balığı	5-33	100-400 mg/kg td	Dİ/PO	15-22

Tetrasiklin transport proteinlerini kodlayan genler (tetA-G, tetK, L) Gram pozitif ve negatif bakterilerde vardır. *E. Coli*, *Salmonella*, *Vibrio spp.* ve *Shigella* türlerinde bulunan transkripsiyon ünitesinin (marRAB), tetrasiklinin aktif olarak dışarı atılmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Nikaido, 1994).

Tetrasiklin direncine yol açan ikinci önemli mekanizma ribozomal korunmadır. tetM, tetO, tetQ, tetS genlerince sentezlenen sitoplazmik proteinin aktivitesi sonucunda ilaç ribozoma bağlanamaz. Bu genler *Vibrio spp.*, *Campylobacter*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Bacteroides* ve *Neisseria* gibi birçok bakteri türlerinde bulunur (Levy ve ark., 1999; Çiftçi ve Aşık, 2011). Çeşitli türlerde bulunan tetM en yaygın rastlanan tetr (tetrasiklin resistance genes) gen olmaktadır (Suzuki; 2010). Brezilya'da *Aeromonas* suşlarında polimer zincir reaksiyonu (PCR) ile yapılan araştırmada incelenen 16 suşta, tetrasikline karşı oluşan dirençten sorumlu tetA ve tetE genleri %37.5 oranında tespit edilmiştir (Balassiano ve ark., 2007).

Schmid ve ark. (2001)'nin Gökkuşığı alabalıklarında çoklu PCR kullanarak yaptığı çalışmada ise izole ve sınıflandırılması yapılan *Aeromonas*lardan %69'unda OTC dirençli, %30'nun taşıyıcı olduğu ve bunların 2/5'nin tetrasiklin direnç genini taşıdığı saptanmıştır. Toplamda 19 tetA pozitif, 39 tetE pozitif ve 6 tetD pozitif izolat bulunmuştur. Üç izolatta ise iki tetrasiklin direnç belirteci bulunmuştur: TetA ve -E; tetA ve -D; tetE ve -D. Ancak B ve C tetrasiklin direnç belirtecine rastlanmamıştır (Schmid ve ark., 2001).

Yapılan diğerk bir prevalans çalışmasında ise *Vibrio alginolyticus* suşunda tetB ve tetM' e bakılmış ve MİK değeri 128 µg/mL olan suşta her iki belirteçte tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2007).

1.3.2. Kinolonlar

Su ürünleri yetiştiriciliğinde solunum, üriner ve sindirim sistemi hastalıklarının sağaltımında kinolon grubu antibiyotiklerden yararlanılmaktadır (Samanido, 2007; Baydan ve Yurdakök, 2009; Baydan ve ark., 2012).

Kinolonlar bakteride DNA-jiraz enzim etkinliğini engelleyerek DNA'nın sentezini ve kalıbının çıkarılmasını önler; böylece bakteri bölünemez ve uzayarak ölür, bakteriosidal etkili, geniş spektrumludur (Aldred ve ark., 2014).

Ortamın pH'ı ilacın etkinliğini büyük ölçüde değiştirmektedir. Asidik ortamda daha etkili olmakla birlikte sert sularda kullanımında etkileri baskılanmaktadır. Banyo ve ağızdan uygulamalarda etkilidir. İlaç atımları tatlı su balıklarında deniz balıklarına göre atılım daha hızlı olmaktadır. Bu da denizde yetiştirilen ve serbest dolaşan balıklarda ilacın daha uzun süre ortamda kalmasına neden olmaktadır. Gıda değeri olan balıklarda kinolonların kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından uygun bulunmamıştır ve bu grup ilaçları izleme bakımından "yüksek öncelikli" olarak değerlendirmeye almışlardır (Yanong, 2003; Baydan ve ark., 2012).

Bu grup ilaçlar balıkların özellikle Vibriosis ve Furunkulozis hastalıklarının sağaltımında kullanılır. Kinolon grubu ilaçlardan Avrupa Birliği'nde kullanımına izin verilen flumequin iken, Türkiye'de enrofloxasindir. Oksolinik asit ise daha önce ruhsatlandırılmasına rağmen günümüzde kullanılmamaktadır (Türk ve Oğuz, 2013; GKGM, 2016).

Oksolinik asit, eritromisin ve sulfonamide karşı gelişen direnci arttırırken oksitetrasikline olan direnç gelişimini yavaşlatmaktadır (Treves-Brown, 2000).

Enrofloksasin Bakteriyel Böbrek Hastalığında (BBH) kullanımı 10 mg/kg/gün doz da 10 gün; oksolinik asit po 10 mg/kg/gün dozda olmaktadır. *Aeromonas salmonicida* enfeksiyonun sağaltımında kullanılan oksolinik asidin MİK değeri deniz suyunda belirlenene göre tatlı sularda 30 kat daha düşük tespit edilmiştir (Baydan ve ark., 2012).

Fluorokinolonlara karşı oluşan direnç kromozomal kaynaklıdır. Nalidiksik asid gibi birinci kuşak kinolonların sistemik etkileri zayıf ve etki spektrumları dardır. İkinci kuşak kinolonlar Gram negatif bakterilere karşı çok etkili antibiyotiklerdir. Yeni geliştirilen üçüncü kuşak kinolonlar ise sadece Gram negatif bakterilerle sınırlı kalmayıp Gram pozitiflere de etki eden geniş spektrumlu antibiyotik grubudur. Kinolon grubu antibiyotiklere gelişen direnç, diğer antibiyotiklerde olduğu gibi doğal-intrinsik ya da sonradan kazanılmış olabilmektedir. Bakterilerde kazanılmış kinolon direnci ise çoğunlukla kromozomal mutasyonlar ile oluşmaktadır. Bu mutasyonlara en sık Ser-83 ve Asp-87 (DNA giraz) ile Ser-80 ve Glu- 84 (topoizomeraz IV) kodonlarında rastlanmaktadır. DNA giraz; DNA replikasyonu, rekombinasyonu ve onarımında görev alır. Topoizomeraz IV ise replikasyon sırasında oluşan yavru DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılarak yavru hücrelere geçmelerine yardım eder. DNA giraz (topoizomeraz II) enzimi gyrA geni tarafından kodlanan iki A alt birimi ile gyrB geni tarafından kodlanan iki B alt biriminden oluşmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda tek başına gyrB geninde meydana gelen mutasyonun, ilaca karşı gelişen dirençten sorumlu olmadığı belirtilmiştir. Topoizomeraz IV ise parC geni tarafından kodlanan iki parC alt birimi, parE geni tarafından kodlanan iki parE alt biriminden oluşmaktadır (Everett ve ark., 1996; Hooper, 1999; Miranda ve ark., 2013). GryB gen mutasyonuna ise özellikle *P.aeruginosa* ve *E. coli* 'de rastlanmıştır. Son yıllarda *S. auerus*'ta gyrA mutasyonel değişikliği gözlenmekte olup bunun fluorokinolona karşı gelişen dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir (Tanır ve Çöl, 1999; Yüce, 2001).

Kim ve ark. (2005) *Photobacterium damsela subsp. piscicida* suşlarında kromozomal kinolon direncine neden olan gyrA, parC genlerini PCR yöntemiyle tespit etmeye çalışmıştır. Düşük maliyeti olan TILLING (Targeting Induced Local Lesions

in Genomes) yöntemi kullanarak yaptığı bu çalışmada mutasyonu nedenini *gyrA* geninden kaynaklandığını tespit etmiştir (Kim ve ark., 2005).

Rodkhum ve ark. (2008)'de *Vibrio anguillarum* suşlarında oksolinik aside gelişen direncin kromozomal mutasyona (*gyrA* ve *parC*) bağlı olarak oluştuğunu PCR yöntemi kullanarak ortaya çıkarmışlardır.

Norveç'te *Vibrio anguillarum* O2b suşunda yapılan bir çalışmada gelişen kinolon direncinin 83 ve 85'inci kodondaki mutasyondan ileri geldiği belirtilmiştir (Colquhoun ve ark., 2007).

1999 yılında Japonya'da *V. parahaemolyticus* suşlarında yapılan çalışmada siprofloksasine gelişen direnç sekans analizi ile belirlenmiş, duyarlı ve orta duyarlı olan suşlarda gelişen direncin sadece *gyrA* 'dan ileri geldiğini ancak dirençli olan diğer suşlarda bunun nedeninin hem *gyrA* ve hem de *parC* olduğu belirtilmiştir (Okuda ve ark., 1999).

1.4. Sudaki Bakterilerde Direnç

Yaygın bulaşıcı hastalıkların sağaltımına yönelik ilaç seçenekleri giderek daha kısıtlı ve pahalı hale gelmektedir. Ayrıca sağaltımda kullanılan ilaçlar, bakterilerde gelişen direnç nedeniyle kullanılamaz hale gelmektedir (FAO, 2005). Genel olarak, su bakterileri antibakteriyel ilaçlara maruz kalma durumunda verdikleri yanıtlar bakımından diğer bakterilerden farklı değildir (Heuer ve ark., 2009). Dünya Sağlık Örgütü, yemeklik hayvanlardaki antibakteriyel kullanımı sonucunda oluşan direncin halk sağlığı açısından olumsuz etkiye yol açtığını bildirmiştir (WHO, 2011). Veteriner hekimlikte de bakterilerin ilaçlara karşı direnç gelişimi giderek artmaktadır (Kemper, 2008; Mulcahy, 2011). Balıklarda hastalığa yol açan bakterilerden bazılarının insanlardaki enfeksiyonlara neden olması gelişen direncin balıklardan insanlara geçme olasılığını daha da güçlendirmektedir (Heuer ve ark., 2009). Profilaksi için düşük miktarlarda antibiyotik kullanımı, ilaca karşı dirençli suşların ortaya çıkmasına ve

bunun sonucunda da kontrol edilmesi güç salgın hastalıklara neden olmaktadır (Mulcahy, 2011). Ayrıca doğru olmayan, etiket dışı antibakteriyel seçimi, kullanımı ve süresi, hatalı uygulama yolu, yanlış doz hesabı ve sıklığı dirençli bakterilerin ortaya çıkmasındaki diğer etmenlerdir (Mulcahy, 2011). Bakterilerdeki direnç gelişimi antibakteriyel ilaçların doğrudan kullanımının yanı sıra ilaçların etkene dolaylı olarak temasıyla da olmaktadır. Direnç genleri serbest dolaşan balıklardan, insan patojenlerinden, hayvan kökenli bakterilerden ve hatta çevresel bakterilerden izole edilmiştir (Kemper, 2008; Martinez, 2009; Martinez ve Silley, 2010). Su bakterilerinin antibakteriyel ilaçlara karşı geliştirdiği direnç ve bu direncin oluşma mekanizmaları diğer bakterilerdeki gibidir.

Balık patojenlerine R-faktörü transferi ilk kez belirli *Aeromonas salmonidae* suşlarıyla gösterilmiştir. İlaça dirençli suşlarda transfer edilebilen R-faktörü plazmidleri ayrıca *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda* ve *Pasteurella piscicida* ile gösterilmiştir (Alderman ve Hastings, 1998). Tetrasikline direnç genleri antibakteriyel ilaçları az miktarda kullanan küçük çiftliklerde bile bulunmaktadır; ayrıca antibakteriyel ilacın kullanımının üzerinden önemli bir süre geçmiş olmasına karşın tetrasikline dirençli bakterilerin varlığı gözlenmiştir (Stachowiak ve ark., 2010) Bu durum bize bakterilerin direnç geni rezervuarları olarak etki gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Nihayetinde, su ortamındaki direnç genleri insan patojenlerine ulaşabilmekte ve insanlarda hastalık yapan patojenlerin direncini daha da arttırmaktadır (Novotny ve ark., 2004, Heuer ve ark., 2009).

Balık yetiştiriciliğinde antibakteriyel ilaç kullanımının, çevredeki antibakteriyel direncin yayılmasını arttırdığı düşünülmektedir (Sapkota ve ark., 2008; Davies ve Davies, 2010). Antibakteriyel dirençli bakterilerin yetiştiricilikte kullanılan suda ve sedimentte bulunma olasılığının daha fazla olduğu görülmüştür. İlaçlar yeme uygulanmış şekilde verildiği zaman, ilaçlara karşı bakteriyel direncin hem yüzdesi hem de düzeyi daha yüksek olmuştur. Ayrıca, direnç süresi diğer ilaç uygulama şekillerine oranla daha uzun olmuştur (Yu ve ark., 2009).

Mg⁺² ve Ca⁺² gibi divalent iyonların varlığı kinolon ve oksitetrasiklinin *in vitro* minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerini 40-60 kat arttırmaktadır. Yem katkı maddeleri balık yemi yemeden önce peletin dağılmamasını sağlarken, bağırsaktan emilmeden önce ilacın şelasyonunu engelleyememektedir. Yapılan çalışmada Oksolinik asit ve OTC bağırsak filorasında bakteri sayısında ilk 24 saatte artışa neden olmakta daha sonrasında atılma periyodunda azalışa geçmektedir (Treves-Borwn, 2000).

1.5. Su Bakterilerine Yönelik Antibakteriyel Duyarlılık Testi

Direncin veya direnç düzeyinin tespiti, testin tipine ve koşullarına ayrıca bileşiğin içeriğine, etki biçimine bağlıdır (Kümmerer, 2008). Antibakteriyel ilaçların kullanımında her zaman klinik olgunun incelenmesi, bakteriyel enfeksiyonun teşhisi ve hastalık için klinik açıdan etkili bir maddenin seçilmesi gerekir. Öte yandan belirli durumlarda (balıkların ciddi derecede hasta olması veya yüksek ölüm oranı veya hızlı yayılmalarıyla birlikte bir salgının mevcut olması durumu gibi), klinik belirtiler göz önüne alınarak sağaltıma başlanabilir (Guardabassi ve Kruse, 2008; Smith ve ark., 2008). Kesin teşhis, hastalığa neden olan etkenin tercihen 3-5 adet enfekte olmuş balıktan izolasyonu sonucu belirlenmesiyle gerçekleşir (Smith ve ark., 2008). Antibakteriyel bir ilacın uygulanmasından önce, enfeksiyon odağından bakteriyolojik kültür numuneleri toplanmalıdır (Walker ve Giguère, 2008). Günümüzde, çok çeşitli standartlaştırılmış yöntemler mevcuttur (Guardabassi ve Kruse, 2008; CLSI, 2014; USM, 2015). Tatlı su ile tuzlu su balıkları arasında; farklı balık türleri arasında bile izole edilen bakterilerde ve bunların antibakteriyel ilaçlara duyarlılıkları arasında farklılıkların oluşması muhtemeldir (Mulcahy, 2011). Ayrıca, bazı testlerde farklı bileşiklerin değişen aktivite spektrumundan farklı sonuçlarla karşılaştırılması olabilmektedir (Kümmerer, 2008; Çağırğan, 2004). Test yöntemleri arasındaki farklılıkların azaltılması için daha fazla çalışma yapılması gerekir (Kum ve ark., 2008). Etkenlerde gelişen direncin belirlenmesinde yöntemin kontrolü yapmak için ilaca dirençlilikleri bilinen standart bakterilerden yararlanmak ve bu değerlerle karşılaştırılarak yorumlanması gerekir. Bu amaçla CLSI, EUCAST gibi

uluslararası referans laboratuvarların kültür koleksiyonlarından yararlanılır (CLSI, 2014).

Balıklarda hastalık etkenlerinin ilaca karşı geliştirdikleri direnci saptamak için *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 standart referans suşları yöntemin kontrolünde kullanılmaktadır (CLSI, 2014).

1.5.1. Disk Difüzyon Testi

Kirby-Bauer tarafından geliştirilen ve bu isimle anılan yöntem kolay ve ucuz olması nedeniyle laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntem olmaktadır. Bu yöntem, kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı araştırılan etkenin inoküle edildiği besiyerine diffüze olması prensibine dayanmaktadır. Bu amaçla; günümüzde antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler yerine ticari olarak belli miktarda ilaç ihtiva eden diskler kullanılmaktadır. Diskler etkenin inoküle edildiği katı besiyerlerine belli aralıklarda yerleştirilir. Etkene göre değişen inkübasyon süresi sonunda ilacın etkili olduğu diskin çevresinde üreme görülmez. Etken ilaca ne kadar duyarlı ise, diskin etrafında oluşan inhibisyon alanı o kadar geniş olmaktadır. Değerlendirme inhibisyon zonunun çapının mm şeklinde ölçülmesi ve standart inhibisyon alanına göre karşılaştırma yapılır. Böylece etkene karşı kullanılacak antibiyotiğin duyarlılık ya da dirençlilik durumu belirlenmiş olur (Bauer ve ark., 1996).

Bu yöntemde kullanılacak bakteri yoğunluğu; sıvı besiyerinde bulunan bakteri sayısını belirlemek amacıyla geliştirilen ve standart yoğunluk olan McFarland 0.5'e göre ayarlanmaktadır. Ayarlama standart McFarland bulanıklık tüpleri (Baryum ve sülfirik asit) olabildiği gibi bu amaçla tasarlanan cihazlar ve spektrofotometrik yöntemler de kullanılmaktadır. Hazırlanan inokulumdan steril bir eküvyon yardımıyla alınan örnek, Mueller-Hinton agar yüzeyine inoküle edilir. Farklı antibiyotik içeren diskler steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine arasında 22 mm mesafelerle yerleştirilir. Etkenin özelliğine göre disk yerleştirilen besiyerleri 18-48 saat süreyle 22-

35°C'de oksijenli ya da CO₂'li ortamda inkübe edilir ve bekleme süresi sonunda inhibisyon alanları cetvelle ölçülür (CLSI, 2014; USM, 2016).

1.5.2. Dilüsyon Testleri

Dilüsyon testleri, antimikrobiyal maddenin bakterinin üremesini inhibe etmek veya öldürmek için gerekli olan minimum konsantrasyonunu belirlemek için uygulanan testlerdir. Dilüsyon testleri "tüp dilüsyon" ve "agar dilüsyon" olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

1.5.2.1. Tüp Dilüsyon

Tüp dilüsyon "makro" ve "mikro" olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Makrodilüsyonda cam tüp, mikrodilüsyonda ise "U" ya da "V" tabanlı mikropalaklar kullanılır. Her iki metotta besiyeri olarak katyon ayarlı Mueller-Hinton buyyon kullanılır. Etkinliği bakılacak antibiyotikler (analitik toz) testten önce standart rehberde belirtilen çözücüde çözdürülür ve iki kat azalan sulandırmaları yapılır. Etkenin hazırlanan standart inokulum (5×10^5 CFU / ml) antimikrobiyal maddenin hazırlanan dilüsyonlarını içeren her bir tüpe ya da mikropalaklara eşit miktarlarda eklenir. Yöntemin kontrolü için ayrıca antibiyotik içermeyen, besiyeri kontrolü için bakteri inoküle edilmemiş ayrı kuyucuk belirlenir. Mikropalaklar 20- 35°C'de 24-48 saatlik inkübasyondan sonra bakteri üremesini temel alınarak incelenir. Buna göre berrak olarak kalmış, üremenin olmadığı en düşük konsantrasyonun olduğu kuyucuk işaretlenerek ve en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu (MİK) olarak değerlendirilir (Andrews, 2001; CLSI, 2014; USM, 2016).

İlacın, *in vitro* etkinliği-*in vivo* etki ile ilişkilendirilmede, yeni antibiyotik geliştirilmesinde ya da doz ayarlanmasında ve oluşacak direncin izlenmesinde farmakokinetik (PK)/ farmakodinamik (PD) değerler önem arz etmektedir.

Antibakteriyel ilaçlarda MİK ise bu parametreleri elde edebilmede kullanılan yöntem olmaktadır (Gür, 2010).

1.5.2.2. Agar Dilüsyon

Tüp dilüsyon yöntemiyle prensipleri aynı olan agar dilüsyon yönteminde antibiyotik sulandırılmaları petri plaklarına agar içine konularak yapılmaktadır. Malzeme fazlalığı ve kontaminasyon riski nedeniyle sınırlı kullanımı vardır.

1.5.3. Otomatik Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sistemi

Teknik hatayı azaltmak ve analiz zamanını kısaltmak amacıyla mikrodilüsyon panelleri ve buna ilaveten otomatik plate okuyucuları içeren sistemler firmalar tarafından geliştirilmiştir. Maliyetin yüksek olması nedeniyle sınırlı kullanımı vardır. Aynı zamanda bakteri çeşitliliğinin yetersizliği de sınırlandırıcı diğer faktördür. Türkiye’de Vitek Sistem (BioMerieux, Fransa) enstitülerde en fazla kullanılan otomatik sistem olmaktadır.

1.5.4. Genotipik Metod

İlaça karşı gelişen gen karakter özellikleri genetik kodlamanın soucunda olmaktadır. Antibiyotik direncinin tespitinde belirli bir gen test edilmesiylede oluşan direncin boyutu tespit edilir. Hızlı ve duyarlı olması da diğer yöntemlere göre avantajını oluşturmaktadır. Populasyonda yayılan dirençli mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılabilir.

Türkiye’de 2008 de yapılan bir çalışmada gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)’nda ekonomik kayıplara sebep olan önemli bakteriyel hastalık etkenlerinin tespit edilerek, ilaç kullanımına bağlı sorunların ve tedavi

maliyetlerinin azaltılabilmesi için çeşitli antibakteriyel ilaçlara karşı gösterdikleri duyarlılık derecelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal testleri sonucunda belirlenen 37 adet izolatın 6'sını (%16,22) *A. salmonicida*, 13'ünü (%35,13) *L. garvieae*, 7'sini (%18,92) *V. anguillarum* ve 11'ini (%29,73) *Y. ruckeri* oluşturduğu, su sıcaklıklarının arttığı (Mayıs-Ağustos arası) dönemlerde *L. garvieae* ve *Y. ruckeri*'nin, mevsimsel geçiş (Şubat-Nisan arası) dönemlerinde ise *A. salmonicida* ve *V. anguillarum*'un daha yüksek oranda izole edildiği görülmüştür. Etkenlerin tümünün enrofloksasin, florfenikol ve siprofloksasine duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Diğer yandan bazı etkenlerin amoksisilin, ampicilin, basitrasin, eritromisin, fusidik asit, gentamisin, kloramfenikol, linkomisin, nalidiksik asit, neomisin, novobiosin, oksitetraiklin, sefoksitin ve sulfametoksazol-trimetoprim'e karşı değişen oranlarda dirençli oldukları belirlenmiştir (Akşit ve Kum, 2008).

Çalışmamızda Ege denizinde yetiştiriciliği yapılan kültür balığı (Levrek ve Çipura) ile doğal avlanan balıklardan *Vibrio (Listonella) anguillarum* ve *Vibrio alginoliticus* etkenlerinin izolasyonu ve identifikasyonu (konvansiyonel ve genotipik) yapılarak belirlenen izolatların tetrasiklin ve kinolon grubu ilaçlara karşı oluşan direncin klasik PCR yöntemle tespit edilmesi ve izole edilen bu etkenlere karşı gelişen direnç haritasının örnekleme alanı ve balık türleri için çıkarılarak elde edilen sonuçların üreticiler ile ilgili kurum ve kuruluşlara aktarılması amaçlanmıştır. Bu şekilde hızlı ve güvenilir alternatif antibakteriyel ilaç seçeneklerinin uygulamaya konularak antibakteriyel ilaçlardan kaynaklanan direncin sağlık ve çevreye yönelik etkilerinin en aza indirilmesi hedeflenmiştir. Bu araştırma sonuçlarının aynı ya da benzer alandaki araştırma sonuçlarını kapsayan veri bankalarına ve bu konuda yapılacak daha sonraki araştırmalara katkı sağlaması beklenmektedir. Araştırmamızda üç hipotez bulunmaktadır: Bunlardan ilki, balık çiftliklerine yakın bölgelerden avlanan doğal ortam balıklarında, artan balıkçılık faaliyetleri ve antibiyotiklerin bilinçsiz ve uygun olmayan kullanımına bağlı olarak, antibiyotik direncinin ve özellikle yaygın kullanılan kinolon ve tetrasiklin direncinin görülmesi oluşturmaktadır. İkinci hipotezimizi ise, hem etken, hem de direncin tespit edilmesinde moleküler yöntemlerin kullanılmasının konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı ve daha duyarlı sonuçlar vermesi oluşturmaktadır. Üçüncüsünü ise, araştırılan antibiyotiklerin özellikle

Çevresel koşullarda yıkımlanmaya dirençli olması ve sedimentte birikmesine bağlı olarak daha derinde yaşayan ve antibiyotik kirleticilerine daha fazla maruz kalan ipura balıklarında, direncin levreğe göre daha yüksek görülmesi oluşturmaktadır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada, 30.10-03.11.2015; 07-17.04.2015; 15-27.06.2015 ve 24.08-07.09.2015 tarihlerinde Milas-AKYA Veteriner Kliniği'ne Güllük-Milas'ta ve İzmir Körfezi'nde bulunan kafes balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerden gönderilen hasta balık örnekleri incelendi. Serbest avlanan balık numuneleri üç ve dördüncü örnekleme döneminde, örneklemenin yapıldığı kafeslerin etrafından 82 (20 levrek, 21 Çipura) adet olacak şekilde yakalandı (Çizelge 2.1). Birinci ve ikinci dönemde avlanma yasağı olması nedeniyle örnek alınamamıştır.

Çizelge 2.1. Çalışmada incelenen balık sayısı

Balık türü/örnekleme yeri	Balık Sayısı	
	Av	Kafes
Levrek	40	120
Çipura	42	120

2.1.2. Besiyerleri

Etken izolasyonu için Trypticase Soy Agar (Oxoid, CMO131), Trypticase Soy Buyyon (Oxoid, CMO129), TCBS Agar (Merck, 1.10263), Sodyum Klorür (Merck, 1.06404) ve izole edilen suşların pasajı için Nutrient Agar (Merck, 1.05450), Nutrient Buyyon (Oxoid, CM0001) kullanıldı.

Antibiyotik ilaç dirençlilik profillerinin belirlenmesinde Müeller Hinton Agar (Merck,1.05437), Müeller Hinton II Buyyon Katyon ayarlı (BD, 212322), Luria-Bertani Buyyon (LB) besi yerleri kullanıldı (CLSI, 2014).

İzole edilen suşlar % 20 Gliserin (Merck) ilave edilmiş Trypticase Soy Buyyon (TSB, Oxoid) kullanılarak -20 °C de muhafaza edildi (Buller, 2014).

2.1.3. Ayıraçlar, Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

SIM Medium (Sulfate, İndole, Motility Medium; Sülfat İndol, Hareket besiyeri) (Merck 1.05470), Bile Aesculin Azide Agar (Merck 1.00072), Tripton (Oxoid LP0042), Oxidation Fermentation Basal Medium (Merck, 110282), Simons Sitrat Agar (Merck, 102501), Urea Agar Base (Oxoid, CM0053), Urea Broth (Merck 1.08483), Nitrat Buyyon (Merck, 1.10204), MRVP Medium (Oxoid, CM0043), Gelatine (Merck, 104078), Gliserol (Glycerol, Merck,1.04094), L- Ornitin (L- Ornitin Monohydrochloride, Merck, 6906.0025), L- Lisin (L- Lysine Monohydrochloride, Merck, 105700), Arjinin (L- Arginine Monohydrochloride, Merck, 1.015440), sistin (L- cysteine, Merck, 1.02839), Mannitol (D-Mannitol, Merck, 443907), D- Ksiloz (D- Ksiloz, Merck, 8689), Glikoz (D(+)) Glucose Anhydrous, Merck, 1.08337), Sükroz (Sucrose, Merck, 1.07651), Arabinoz (L-Arabinos, Merck,1.01492), Maltoz (Maltose, Merck, 1.05910), Mannoz (D+Mannose, Merck, 1.05984), İnositol (Merck, 1.04728), Galaktoz (D(+)) Galactose Merck 1.04062), Fruktoz (D-Fructose Merck, 1.05323).

5X TBE (Tris-borate-EDTA) 1 litre:

54g Tris base

27,5g Borik asit

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

54 gram Tris base ve 27,5 g borik asit karıştırıldıktan sonra en son EDTA eklenerek hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır (Sarıkaya, 2008).

1X TBE: 5X'lik TBE'den 1X'lik TBE hazırlandı. 100 ml 5X TBE, 400 ml ddH₂O içerisine ilave edildi.

2.1.4. Antibiyotik Diskleri

DD14 O129 10 µg (Oxoid, X3494A), DD15 O129 150 µg (Oxoid, X3494B), Enrofloksasin disk (ENR5) (Oxoid, X7894), Oksolinik asit disk (OA2) (X3367) ve Oksitetrasiklin disk (OT30) (Oxoid, X3368) kullanıldı.

2.1.5. Kullanılan Antibiyotikler

Kinolon direncini belirlemek amacıyla Enrofloksasin (Sigma, 17849) ve oksolinik asit (Sigma, O0877); tetrasiklin direncini belirlemek amacıyla ise oksitetrasiklin (Sigma, O5875) kullanıldı.

2.1.6. PCR'da ve Görüntülemede Kullanılan Maddeler

PCR'da Etanol (%95'lik) (Merck), Tris Borik asit EDTA (TBE) (SIGMA), 10xPCR Buffer (NEB), 25 mM MgCl₂ (NEB), 10 mM dNTP karışımı (NEB), Taq DNA polimeraz (NEB), Primerler (Sentromer), Agarose (Prona, Biomax), Safe View™ Classic (abm, G108), 6xLoading Dye (Fermentas, 1ml), GeneRuler 100 bç Plus DNA Ladder ve 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, 0,5 µg/µl, 50 µg) kullanıldı.

2.1.7. DNA ve Plazmid İzolasyonunda Kullanılan Maddeler

NucleoSpin® Tissue DNA Isolation Kit (250 preps) ve NucleoSpin® Plasmid, (5x50preps) (Macherey Nagel) ve Fermentas GeneJET Genomik DNA Purifikasyon (#K0722, 250 preps) kiti kullanıldı.

2.1.8. PCR’da ve Görüntülemeye Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Bu çalışmada, hassas terazi (Scaltec SBC31), santrifüj (Selectra), vorteks (Elektro-mag M16 x), Thermo-Shaker TS-100C, steril kabin (laminar flow) (Astec microflow PCR), Biyogüvenlik kabini Metisafe ClassII, NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), DNA Thermal Cyclers (Biorad), C1000™, Jel elektroforez cihazı ve güç kaynağı (Biometra Standard Power Pack P25), UV transillüminatörlü bilgisayarlı görüntüleme sistemi (Kodak Gel-logic 200), Fotoğraf Filmi (High Glossy Printing Paper, UP-110HG, Sony, USA) kullanıldı.

2.1.9. Standart Suşlar

İzole edilen suşların identifikasyonu, MİK değerlendirmeleri için yapılan konvansiyonel testlerde, antibiyotik dirençlilik profillerinin belirlenmesi için yapılan moleküler incelemelerde pozitif kontrol olarak TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü *V. anguillarum* ATCC 43305 ve *Aeromonas salmonicida subs. salmonicida* ATCC 33658 suşları ayrıca *E. coli* ATCC 25922 standart suşu ise Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Murat Cengiz’den temin edildi. *Vibrio alginoliticus* ATCC 17749 (Kwikstik, 0819P) suşu ise ticari firmadan satın alındı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Bakteri İzolasyonu

Bakteriyel etkenlerin (*V. anguillarum*, *V. alginoliticus*) ilk izolasyonunda toplanan balık doku ve organlarından (böbrek, karaciğer ve dalak) %2 NaCl içeren Trypticase Soy Agar (TSA) ve Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agara ekimi yapıldı. 22°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılan besi yerleri 12 saatlik

periyotlarda kontrol edildi. Gelişen kolonilerden saf koloniler elde edildi. Her petri kutusundan ortalama 3 koloni alınarak % 2 NaCl içeren Tryptic Soy Buyyona aktarıldı ve inkübasyon sonunda gelişme olan tüplerde identifikasyon testlerine geçildi (Alsina ve ark., 1994; Toranzo ve ark., 2005; Austin ve Austin, 2012; Actis ve ark., 2006; Buller, 2014;).

2.2.2. Fenotipik (Biyokimyasal) Yöntemler

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan rutin bakteriyolojik testler Milas-AKYA Veteriner Kliniği ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. Aynı zamanda Etlik Veteriner Merkez Araştırma Enstitüsü Bakteriyolojik Teşhis Laboratuvarı'ndan da destek alınmıştır. Bütün izolatlar saflaştırma işlemi ardından Gram boyama, hücre morfolojisi, oksidaz ve katalaz reaksiyonu, hareket muayenesi, oksidasyon-fermantasyon testi (O/F), TCBS agar'da üreme, % 0, 3 ve 10 NaCl'de üreme, 4 ° C, 35 ° C, 40 ° C'de üreme, vibriostatik ajan O/129 (10 ve 150 mg) duyarlılığı, arjinin hidrolizi, lizin ve ornitin dekarboksilazı, sitrat asiliminasyonu, H₂S üretimi, üreaz üretimi, indol üretimi, jelatin hidrolizi testleri, glukoz, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnoz, sükroz ve arabinoz'u fermente etme özellikleri yönünden değerlendirildi (Arda, 2000; Buller, 2014).

Vibrio (Listonella) anguillarum ve *Vibrio alginoliticus* olarak identifiye edilen suşlar daha sonra kullanılmak amacıyla - 20°C'de, %20 gliserinli TSB'de süspanse edilerek saklandı (Buller, 2014).

Çizelge 2.2. *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* biyokimyasal testleri (Buller, 2014).

SUŞ / TEST	Gm	Ox	cat	βH	mot	SW	ODC	LDC	ADH	Nit	Ind	Cit	urea	mr	vp	aes	G	onpg	OF	arab
<i>V.anguillarum</i>	-	+	+S	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	F	+
	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	F	-
<i>V.alginolyticus</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	w	-	+	+	-	w	-	F	-
	-	+	+		+	+	-	+	-	+	+	-	-		-		+	-	F	-

SUŞ / TEST	glu	inos	lac	malt	man	mano	sal	sor	suc	tre	Xyl	H ₂ S	MCA	TCBS	Dnase	temp °C	NaCl%	12910	129150	Amp
<i>V.anguillarum</i>	+g-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	G	+w	25	1-3	S	S	R
	+g-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	Y	+	10-37	0,5-7	S	S	R
<i>V.alginolyticus</i>	+g-	-	-	+	+	S	-	-	+	+	-	-	w	Y	+	25-43	1-10	PS	S	
	+	-			+			-	+			-		Y						

Gm=Gram, Ox=oksidaz, cat=katalaz, βH=beta hemoliziz, mot=motiliti, SW=swarming, ODC=ornitin dekarboksilaz, LDC=lizin dekarboksilaz, ADH=arjinin dihidrolaz, Nit=nitrat, Ind=indol, Cit=sitrat, urea=üre, mr=metil kırmızısı, vp=Voges-Proskauer, aes=eskulin, G=jelatin, onpg= b-galaktosidaz testi, OF=oksidatif fermentatif, arab=arabinoze, glu=glukoz, inos=inositol, lac=laktöz, malt=maltoz, man=mannitol, mano=mannoz, sal=salisin, sor=sorbitol, suc=sükroz, tre=treloz, xyl=ksiloz, H₂S=hidrojen sülfid, MCA=MacConkey agar, TCBS=thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar, Dnase=deoxyribonuclease agar, temp=sıcaklık, NaCl 0/3= % üreme, 0129 10= vibrio duyarlılık disk 10 mg, 0129 150= vibrio duyarlılık disk 150 mg, Amp=10 mg ampisiline duyarlılık, += pozitif, -= negatif, w= zayıf reaksiyon, s= yavaş reaksiyon, G= yeşil, Y= sarı, S=Duyarlı, PS= olası duyarlı, R= dirençli

2.2.3 Moleküler Yöntemler

2.2.3.1. Bakteriden Genomik DNA İzolasyonu

Bakteriden DNA izolasyonu, PCR optimizasyonu ve elde edilen ürünlerin görüntülenmesi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen 173 suş'un genomik DNA izolasyonu için genomik DNA purifikasyon kiti (Fermentas GeneJET Genomik DNA Purifikasyonu) kullanıldı. Tuzlu nutrient buyyonda 21°C'de 24 saatte üretilmiş taze suşlardan izolasyon yapıldı. Elde edilen DNA'lar etken identifikasyonu ve kromozomal kinolon ilaç direnci tespitinde kullanıldı.

Protokol olarak Gram negatif bakteriler için DNA Purifikasyonu protokolü seçildi. Bu prosedüre göre;

- Pelet, 180 µl digestion solüsyonu ile süspanse edildi. Daha sonra 20 µl Proteinaz K solüsyonu eklendi ve vortekslendi. Lizis için 56°C'de 30 dk inkube edildi.
- 20 µl RNase A solüsyonu eklendi ve vorteks yapılarak 10 dk oda ısısında inkubasyona bırakıldı.
- 200 µl lizis solüsyonu eklendi. Homojen bir karışım elde etmek için 15 saniye vorteks yapıldı.
- 400 µl %50'lik etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
- Hazırlanan lizat, spin column tüpüne aktarıldı.
- 6000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni 2 ml'lik koleksiyon tüpü takıldı.
- 500 µl etanol eklemesi tamamlanan wash buffer I solüsyonundan eklendi 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yeni koleksiyon tüpü takıldı.

- 500 µl etanol eklemesi tamamlanan wash buffer II solüsyonundan eklendi 12000 g'de 3 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak, spin column 1,5 ml'lik ependorfa takıldı.

- 200 µl elution buffer eklendi ve 2 dk oda ısısında inkubasyonu takiben 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

- Spin column atılarak 1,5 ml'lik ependorfa içerisinde saf DNA elde edildi.

İzole edilen DNA'ların yoğunluğu ve saflığı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan NanoDrop 2000 spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazı ile spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Bu amaçla DNA'ların yoğunluk ve saflık analizinde 260 nm dalga boyunda elde edilen değerle 280 nm dalga boyunda elde edilen değerlerin oranı (A260/A280) ve 260 nm dalga boyunda elde edilen değerler 230nm dalga boyunda elde edilen değerlerin oranı (A260/A230) kullanılmıştır. 1,8'in altında elde edilen A260/A280 değeri protein kontaminasyonunu, 2'nin üzerinde elde edilen A260/A280 değeri RNA kontaminasyonunu; 2'nin altında elde edilen A260/A230 değeri ise guanidin kalıntısını, 2,2'nin üzerinde elde edilen A260/A230 değeri ise ölçümde kullanılan blank'in yanlış seçimine işaret etmektedir. Buna göre A260/A280 oranı 1,80 ile 2,00; A260/A230 oranı ise 2 ile 2,2 aralığında olan DNA'lar çalışmaya dahil edildi.

DNA'ların degrade olup olmadığının kontrolü % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Bunun için; 1 g agaroz tartılarak 100 ml 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) içinde homojen bir görünüm alana kadar mikrodalga fırında eritildi. Agoroz jel karışımına safeView™ (10 µl) eklenip köpürmemesine dikkat edilerek karıştırıldı. Agoroz jel karışımı, taraklar içeren jel kasedine dökülerek yarım saat donması beklenildi ve süre sonunda taraklar çıkartılarak, 1X TBE içeren elektroforez tankına alınmıştır. DNA'ların görüntülenmesi amacıyla, 5 µl genomic DNA alınıp, 5 µl loading dye yükleme solüsyonu karıştırıldı ve kuyucuklara yüklendi. Her sıranın sonuna 1kb'lik DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya) örneklerin en dışındaki kuyucuklara 3 µl olacak şekilde yüklendi. Elektroforez işlemi 120 V'da 20–25 dakika uygulandı. Görüntüleme sistemi (Kodak Gel Logic) yardımıyla DNA bantlarının varlığı ve bütünlüğü kontrol edildi.

PCR'da yükseltgenilecek DNA'lar, yaklaşık 50 ng/µl olacak şekilde, saf su ile 1/10 veya 1/20 oranında sulandırıldı ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

2.2.3.2. Bakteriden Plazmid İzolasyonu


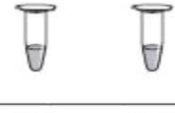




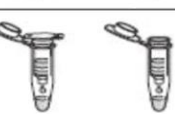
Tetrasiklin ilaç direnç tespitinde gerekli olan plazmid izolasyonu için Plazmid DNA purifikasyon kiti (Plazmid DNA Purifikasyon, NucleoSpin® Plazmid) kullanıldı. Tuzlu Luria-Bertani (LB) buyyonda 21°C'de 24 saatte üretilmiş taze suşlar hazırlandı.

Protokol olarak Gram Negatif Bakteriler için Plazmid Purifikasyonu protokolü Şekil 2.1 'deki gibi seçildi. Bu prosedüre göre 173 suş için;

- Pelet, pipetasyon yardımıyla 250 µl risüspanسیون solüsyonu (A1) ile süspanse edildi.
- 250 µl lizis solüsyonu (A2) solüsyonu eklendi ve 6-8 defa alt üst edildi. 5 dk oda ısısında inkubasyona bırakıldı.
- 300 µl nötralizasyon solüsyonu eklendi. 6-8 defa alt üst edildi.
- Oda sıcaklığında 5 dakika 11,000x g'de santrifüj edildi.
- Hazırlanan lizat (750 µl) spin column tüpüne aktarıldı.
- 11,000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü boşaltıldı.
- 600 µl wash buffer (A4) solüsyonundan eklendi 11,000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü boşaltıldı.
- 11,000 g'de 2 dk santrifüj edilerek silika membranın kuruması sağlandı. Koleksiyon tüpü atılarak, spin column 1,5 ml'lik ependorfa takıldı.
- 50 µl elution buffer eklendi ve 1 dk oda ısısında inkubasyonu takiben 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Spin column atılarak 1,5 ml'lik ependorfa içerisinde plazmid DNA elde edildi.

11,000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

Elde edilen plazmid DNA'ları direnç genleri (tetr) tespiti için -20°C'de muhafaza edildi.

¹ Bakteri hücresi çöktürülmesi		11,000 x g, 30 sn
² Lizis		250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 Oda sıcaklığı, 5 dk 300 µL Buffer A3
³ Lizattan arınma		11,000 x g, 5-10 dakika
⁴ DNA bağlama		Süpernatan aktar 11,000 x g 1 dakika
⁵ Silika membranın yıkanması		600 µL Buffer A4 11,000 x g, 1 dakika
⁶ Silika membranın kurutulması		11,000 x g, 1 dakika
⁷ DNA elüsyonu		50 µL Buffer AE Oda sıcaklığı, 1 dk. 11,000 x g, 1 dakika

Şekil 2.1. Gram Negatif Bakteriler için Plazmid Purifikasyonu protokolü (NucleoSpin® Plasmid, MN)

2.2.3.3. Primerler

Literatür araştırmalarında, *V. anguillarum* ve *V. alginoliticus*'un konvansiyonel PCR ile belirlenmesinde kullanılan primerler çalışmada kullanıldı ayrıca seçilen primerlere ait

sekanslar yanında NCBI-BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] programı kullanarak primerlerin spesifikliğine de bakıldı. Primerler PRZ Biotech ve Sentromer DNA Teknolojileri firmaları tarafından sentezlendi. Primerler 18-20 bç (baz çifti) uzunlukta, erime sıcaklıkları (T_m, melting temperature) 47-58°C arasında ve primer guanin-sitosin yüzdeleri (%GC oranı) %33-65 arasında yer almaktadır. Sentezleyici firma tarafından belirtilen sulandırma oranları kullanarak ana stok hazırlandı. Çalışmada kullanılmak üzere -20 °C de saklandı.

Sentez edilen primerler etken identifikasyonu ve ilaç direncinin belirlenmesi aşamalarında kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 2.3., Çizelge 2.4.,Çizelge 2.5 de belirtilmiştir.



Çizelge 2.3. Çalışmada identifikasyon için kullanılan primer dizileri.

Bakteri suşu	Primer Adı	Forward	Reverse	Amplikon	Ref
<i>Vibrio anguillarum</i> identifikasyon	amiB	ACATCATCCATTTGTTAC	CCTTATCACTATCCAAATTG	429bç	Hong ve ark., 2007
<i>Vibrio alginolyticus</i> identifikasyon	col	TGGTGAACAGCCAGTAAA	CAAACCCATCATAAGTAGTC	424bç	Cai ve ark., 2009
Kontrol primeri	16S rRNA	ATTACCGCGGCTGCTGG	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	530bç	González, 2004

Çizelge 2.4. Kinolon ilaç direnci tespitinde kullanılan primer dizileri.

Kinolon direnç	Forward	Reverse	Amplikon	Ref
GyrA	CGTGATGGCCTAAAACCAGT	CCATCGACCARCATGTAACG	203bç	Rodkhum ve ark., 2008
ParC <i>V. anguillarum</i>	ATGTCAACTGAAATAACCTT	AACCTTCCAAGATGTGCAAA	1150bç	Rodkhum ve ark., 2008'nin çalışmada kullanılan primerlere göre tasarlanmıştır.
ParC <i>V. alginolyticus</i>	TATGCGATGTCAGAGCTTGG	AGCGGTAAGAGAATGGCTGA	151bç	Rodkhum ve ark., 2008

Çizelge 2.5. Tetrasiklin ilaç direnci tespitinde kullanılan primer dizileri

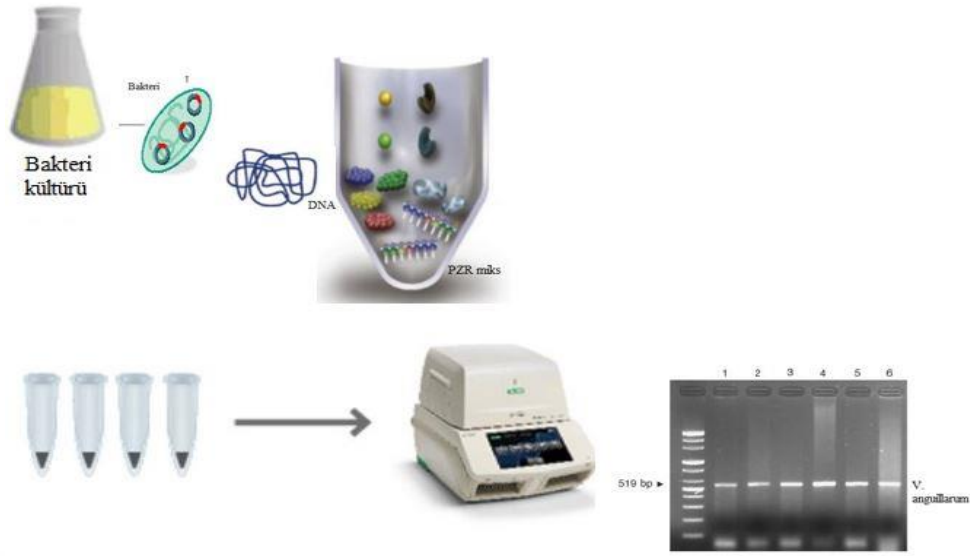
Tetrasiklin direnç	Forward	Reverse	Amplikon	Ref
TetA	GCG CGATCTGGTTCCTC G	AGTCGACAGYRGC GCCGG C	186bç	Aminov ve ark., 2002
TetB	TACGTGAATTTATTGCTTCGG	ATACAGCATCCAAAGCGCAC	206bç	Aminov ve ark., 2002
TetD	GGAATATCTCCCGGAAGC GG	CACATTGGACAGTGCCAGCAG	187bç	Aminov ve ark., 2002
TetM	GTAAATAGTGTCTTGGAG	CTAAGATATGGCTCTAACAA	656bç	Kim ve ark., 2004

2.2.3.4. PCR Optimizasyonu

Amplifikasyon işleminde elde edilecek görüntünün spesifik bantları verebilmesi için optimizasyon yapıldı. Optimizasyon çalışması için PCR karışımı her bir örnek için 25 µl'lik final hacim olacak şekilde, primer, MgCl₂, dNTP, hedef DNA miktarları ve bağlanma sıcaklığı ve buna göre değişen ddH₂O miktarları deneme yapıldı. Sonuç olarak en spesifik bant veren görüntü seçilerek amplifikasyon yöntemi belirlendi.

2.2.3.5. PCR Amplifikasyonu

DNA amplifikasyonunda *V. alginolyticus* için 0,3-0,5 µM konsantrasyonda forward ve revers primer (Sentromer DNA ve PRZ Biotech, 10 pmol/ µl), 2,5 µl reaksiyon buffer (BioLabs, M0320S), 0,7 µl 10 µM dNTP miks (BioLabs, M0320S), 2,5 mM MgCl₂ ve 0,2 U Taq DNA polimeraz (BioLabs, M0320S) içeren; *V. anguillarum* için 0,3-1 µM konsantrasyonda forward ve revers primer (PRZ Biotech, 10 pmol/ µl), 2,5 µl reaksiyon buffer (BioLabs, M0320S), 0,5 µl 10 µM dNTP miks (BioLabs, M0320S), 1,5 mM MgCl₂ ve 0,3 U Taq DNA polimeraz (BioLabs, M0320S) içeren 25 µl toplam hacimdeki PCR karışımı kullanıldı (Çizelge 2.6, Çizelge 2.8, Çizelge 2.10, Çizelge 2.12, Çizelge 2.14, Çizelge 2.16, Çizelge 2.18). AmiB, col ve 16s rRNA genlerinin amplifikasyonunda Bio-Rad C1000 Thermal Cycler cihazına Çizelge 2.7, Çizelge 2.9, Çizelge 2.11, Çizelge 2.13, , Çizelge 2.15, Çizelge 2.17, Çizelge 2.19) belirtilen program girilerek hedef gen bölgeleri amplifiye edildi. Elde edilen PCR ürünlerinden 5 µl alınıp, 5 µl 2X loading dye (Fermentas, 1ml) ile karıştırılarak safeView™(10 µl) eklenen %2'lik agaroz jele yüklendi ve 120 V, 500 mA'da 25 dk yürütülerek DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya) örneklerin en dışındaki kuyucuklara 3 µl olacak şekilde yüklendi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. PCR amplifikasyon şeması

Çizelge 2.6. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları- *V. anguillarum* (toplam 25 µl)

Adı	Miktarı
10xPCR tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
dNTP(10 mM)	0,5 µl
amiB F1 (10 pmol/µl)	1 µl
amiB R1 (10 pmol/µl)	1 µl
contF	0,3 µl
contR	0,3 µl
Taq Polimeraz	0,3 µl
Distile su	16,6 µl
Kalıp DNA	1,0 µl

Çizelge 2.7. PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları.

Derece	Süre	
94 °C	3 Dakika	Ön denaturasyon
94 °C	60 Saniye	35 Döngü
51 °C	30 Saniye	
72 °C	30 Saniye	
72 °C	10 Dakika	Son uzatma

Çizelge 2.8. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları -*V. alginolyticus* (toplam 25 µl)

Adı	Miktarı
10xPCR tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 µl
dNTP(10 mM)	0,7 µl
colF1 (10 pmol/µl)	0,5 µl
colR1 (10 pmol/µl)	0,5 µl
contF	0,3 µl
contR	0,3 µl
Taq Polimeraz	0,2 µl
Distile su	15,5 µl
Kalıp DNA	2,0 µl

Çizelge 2.9. PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları

Derece	Süre	
94 °C	4 Dakika	Ön denaturasyon
94 °C	45 Saniye	35 Döngü
55 °C	30 Saniye	
72 °C	30 Saniye	
70 °C	5 Dakika	Son uzatma

Çizelge 2.10. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları –Kinolon (*V. anguillarum* -*V. alginolyticus* gyrA) direnci (toplam 25 µl)

Adı	Miktarı
10xPCR tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 µl
dNTP(10 mM)	0,5 µl
F (10 pmol/µl)	0,5 µl
R (10 pmol/µl)	0,5 µl
Taq Polimeraz	0,2 µl
Distile su	16,3 µl
Kalıp DNA	2,0 µl

Çizelge 2.11. PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları.

Derece	Süre	
94 °C	4 Dakika	Ön denaturasyon
94 °C	45 Saniye	34 Döngü
55 °C	30 Saniye	
72 °C	30 Saniye	
70 °C	5 Dakika	Son uzatma

Çizelge 2.12. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları –Kinolon ilaç (*V. anguillarum*/parC) direnci (toplam 25 µl)

Adı	Miktarı
10xPCR tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl
dNTP(10 mM)	0,5 µl
F (10 pmol/µl)	0,5 µl
R (10 pmol/µl)	0,5 µl
Taq Polimeraz	0,3 µl
Distile su	16,7 µl
Kalıp DNA	2,0 µl

Çizelge 2.13. PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları.

Derece	Süre	
94 °C	4 Dakika	Ön denaturasyon
94 °C	45 Saniye	34 Döngü
55 °C	30 Saniye	
72 °C	30 Saniye	
70 °C	5 Dakika	Son uzatma

Çizelge 2.14. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları –Kinolon (*V. alginolyticus* /parC) Direnci (toplam 25 µl)

Adı	Miktarı
10xPCR tamponu	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 µl
dNTP(10 mM)	0,5 µl
F (10 pmol/µl)	0,5 µl
R (10 pmol/µl)	0,5 µl
Taq Polimeraz	0,2 µl
Distile su	16,3 µl
Kalıp DNA	2,0 µl

Çizelge 2.15. PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları

Derece	Süre	
94 °C	4 Dakika	Ön denaturasyon
94 °C	45 Saniye	34 Döngü
55 °C	30 Saniye	
72 °C	30 Saniye	
70 °C	5 Dakika	Son uzatma

Çizelge 2.16. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları – Tetrasiklin ilaç (*V. anguillarum*- *V. alginolyticus* suşları / tetA-tetB-tetD genleri) Direnci (toplam 15 µl)

Adı	Miktarı
10xPCR tamponu	1,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0.6 µl
dNTP(10 mM)	0,3 µl
F (10 pmol/µl)	0,3 µl
R (10 pmol/µl)	0,3 µl
Taq Polimeraz	0,1 µl
Distile su	10,9 µl
Kalıp DNA	1,0 µl

Çizelge 2.17. PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları.

Derece	Süre	
94 °C	4 Dakika	Ön denaturasyon
94 °C	45 Saniye	38 Döngü
60,7 °C	30 Saniye	
72 °C	30 Saniye	
70 °C	5 Dakika	Son uzatma

Çizelge 2.18. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasal yoğunlukları – Tetrasiklin ilaç (*V. anguillarum*- *V. alginolyticus*/ tetM geni) direnci (toplam 15 µl)

Adı	Miktarı
10xPCR tamponu	1,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 µl
dNTP(10 mM)	0,3 µl
F (10 pmol/µl)	0,3 µl
R (10 pmol/µl)	0,3 µl
Taq Polimeraz	0,1 µl
Distile su	10, µl
Kalıp DNA	1,0 µl

Çizelge 2.19. PCR reaksiyonu yükseltgenme koşulları.

Derece	Süre	
94 °C	4 Dakika	Ön denaturasyon
94 °C	45 Saniye	38 Döngü
55 °C	30 Saniye	
72 °C	30 Saniye	
70 °C	5 Dakika	Son uzatma

2.2.3.6. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

Amplifikasyon sonucunda elde edilen ürünlerinin görüntülenmesi için % 2 yoğunlukta olacak şekilde 2 g agaroz (Prona, İspanya) üzerine 100ml 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) elektroforez tampon solüsyonu ilave edildi ve karışım mikrodalga fırında ısıtılarak çözüldü. 50-55 °C'ye soğuması beklenen agarozun üzerine safeView™ (10 µl) eklenip köpürmemesine dikkat edilerek karıştırıldı.

Agaroz jel karışımı, taraklar içeren jel kasedine dökülerek yarım saat donması beklenildi ve süre sonunda taraklar çıkartılarak, 1X TBE içeren elektroforez tankına alındı.

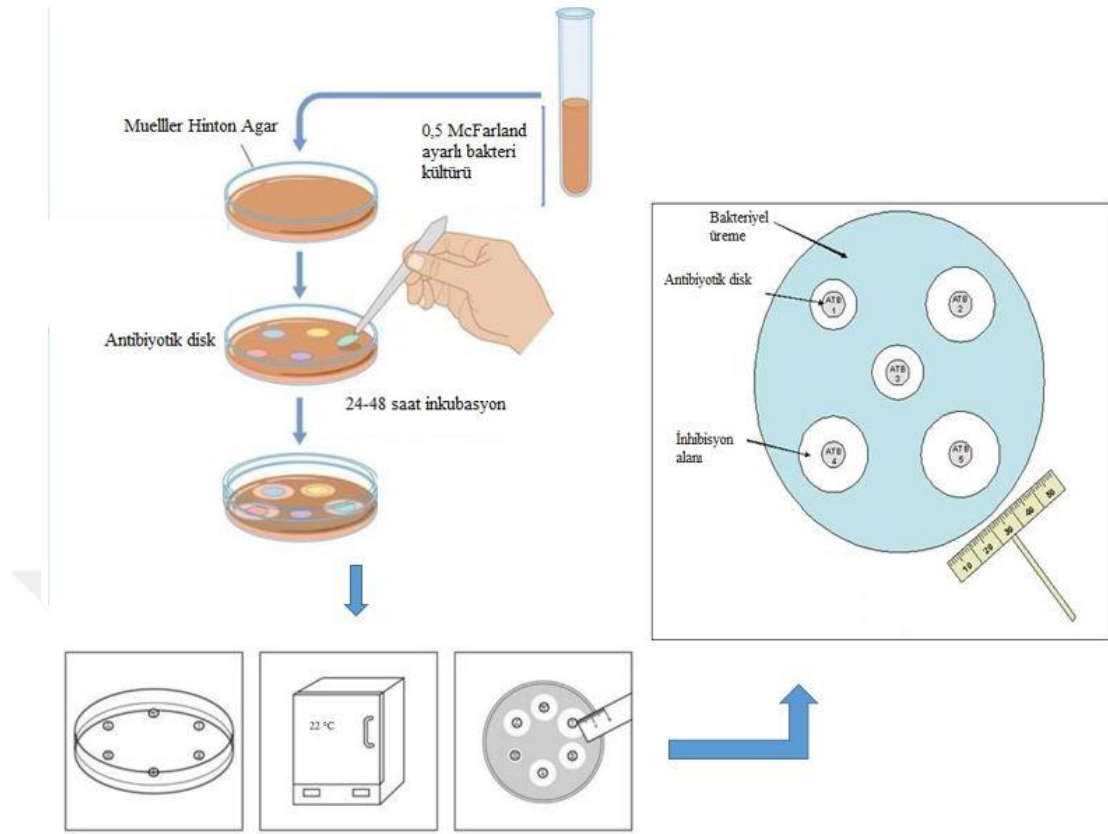
PCR ürünleri, 6xLoading dye (Fermentas, Litvanya) ile bir kısım boya ve bir kısım PCR ürünü olacak şekilde karıştırılarak jeldeki kuyucuklara; ürün büyüklüklerinin belirlenebilmesi için 100 bç'lik DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya), örneklerin en dışındaki kuyucuklara 3 µl olacak şekilde yüklendi.

Jele 120 volt/cm akımı uygulanarak 20-30 dk süre ile ürünler yürütüldü. Süre sonunda agaroz jel Kodak Gel-logic 200 (Kodak Gel Logic 100, ABD) jel görüntüleme sisteminde görüntüldü.

2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

2.2.4.1. Disk Difüzyon Testi

Antibiyotik duyarlılık testinde izolasyonu yapılan *V. anguillarum* ve *V. alginolicus* suşları CLSI'nın (Clinical and Laboratory Standarts Institute) önerdiği disk difüzyon tekniğine göre yapıldı (CLSI, 2014). Buna göre, suşlar bir gece boyunca 22 °C'lik etüvde % 1,5 deniz tuzu içeren Nutrient Buyyon'da üretildi ve McFarland 0,5'e göre spektrofometrik yöntem kullanılarak (Wiegand ve ark., 2008) seyreltilen suşlardan Mueller Hinton Agara 0,1 ml yayma tarzında ekimleri yapıldı. 5–10 dk oda ısısında bekletilerek CLSI'nın önerisi doğrultusunda O/129 (10 µg, Oxoid), O/129 (150 µg, Oxoid), Enrofloksasin (5 µg, Oxoid), Oksolinik asit (2 µg, Oxoid), Oksitetrasiklin (30 µg, Oxoid) antibiyotik diskleri yerleştirildi. Ekim işlemleri tamamlanan petriyeler 24 saat boyunca 22 °C'lik etüve inkubasyon için bırakıldı ve antibiyotik dirençlilikleri CLSI standartlarına göre değerlendirildi. Standart suş olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı. Test sonucunda üç veya daha fazla antibiyotik grubuna dirençli bulunan suşlar çoklu antibiyotik dirençli olarak belirlendi (CLSI 2006a, 2006b, 2014).



Şekil 2.3. Disk Difüzyon Yöntemi

2.2.4.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK)

2.2.4.2.1. Antimikrobiyal İlaç Solüsyonlarının Hazırlanması

Test için mikroplakların hazırlanmasında stok solüsyondan antimikrobiyal maddelerin sulandırılmaları Çizelge 2.20.'deki çizelgeye ve ana stok ilaç miktarı aşağıda belirtilen formüle göre hazırlandı. Stok solüsyonlar ise seri dilüsyonlar (Şekil 2.4) ise yarı sulandırma olacak şekilde 96'lık kuyucuklarda hazırlandı.

$$\text{İlaç Hacim (ml)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens } (\mu\text{g/mg})}{\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}$$

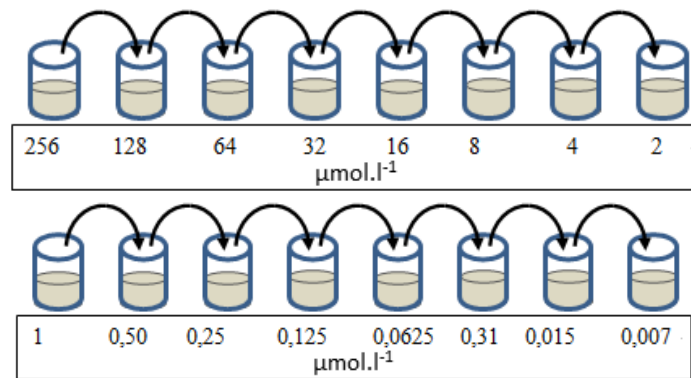
Çizelge 2.20. Antimikrobiyel İlaçların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması İçin Gerekli Çözücü ve Sulandırıcılar (CLSI, 2014).

Antimikrobiyel İlaç (toz)	Çözücü	Dilüsyon
Oksitetrasiklin (HPLC/Sigma)	% 100 Metanol	Steril distile su
Oksolinik asit (HPLC/Sigma)	½ 1 mol/L NaOH ,distile su	Steril distile su
Enrofloksasin (HPLC/Sigma)	½ 1 mol/L NaOH ,distile su	Steril distile su

2.2.4.2.2. Antimikrobiyel İlaçların Dilüsyonu ve Saklanması

Mikrodilüsyon plaklarını hazırlamak için antimikrobiyel ilacın buyyonlarının (en az 10 mL sıvı besiyerinde) çift kat ara sulandırmaları yapıldı. Tüm sulandırıcılar için ve stok antibiyotik çözeltisini ilk tüpe koymak için tek bir pipet kullanıldı. Sonraki tüm sulandırma basamaklarında yeni bir pipet kullanılır. Antimikrobiyel ilaç dilüsyonları standart 96'lık mikrodilüsyon plaklarına bir her bir kuyucuğa 0,05 mL olacak şekilde dağıtıldı.

Her plakta bir üreme kontrol kuyucuğu ile bir sterilite (inoküle edilmemiş) kuyucuk olacak şekilde mikropalakalar hazırlandı.



Şekil 2.4. Antimikrobiyel İlaçların Dilüsyon

2.2.4.2.3. İnokulumun Hazırlanması ve İnokülasyon

MİK belirlemek için izolasyonu yapılan *V. anguillarum* ve *V. alginoliticus* suşları CLSI'nın önerdiği mikrodilüsyon yöntemine göre yapıldı (CLSI, 2014). Buna göre, suşlar bir gece boyunca 22 °C'lik etüvde % 1,5 deniz tuzu içeren Katyon ayarlı Müeller Hinton II Buyyonda 600 nm'de 0,063 (SpectraMax MiniMax300 Imaging Cytometer) absorbans değerine ulaşmaları sağlanmıştır (Lalitha, 2004; Wiegand ve ark., 2008). Temiz bir petriye hazırlanan bu solüsyondan 96-kuyucuklu U-tabanlı mikropklara 5×10^5 CFU inokulum olacak şekilde 8'li otomatik pipet yardımıyla 50 µl ve üzerine Şekil 2.4.'de daha önce hazırlanan antibiyotik dilüsyonlarından 50 µl ekim yapıldı İnokulum konsantrasyonunun test edilmesinde *E.coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı. (Andrews, 2001; CLSI, 2014; UMS, 2016).

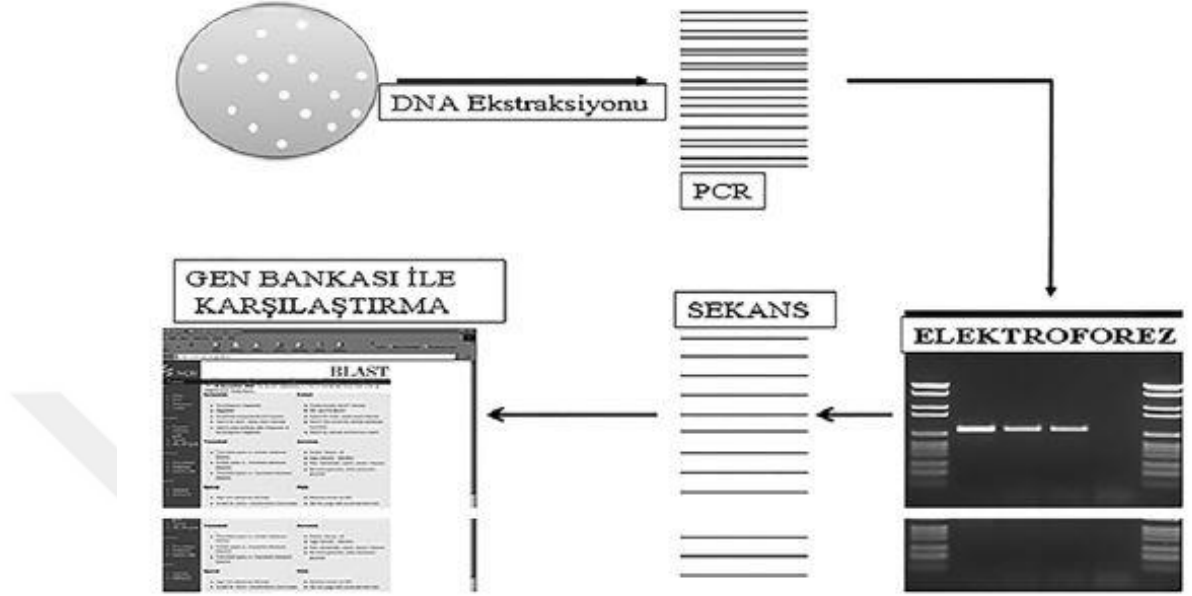
2.2.4.2.4. MİK Değerlendirilmesi

Suşlar için 21 °C'de 16–18 saat inkübasyon sonunda okundu. Berrak olarak kalmış, üremenin olmadığı en düşük konsantrasyonun olduğu kuyucuk işaretlendi ve en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu olarak değerlendirildi (Andrews, 2001; CLSI, 2006a; 2006b; 2014).

2.2.5. DNA Dizi Analizi

Kromozomal kinolon direncinin tespiti için; amplifikasyonu yapılan bölgenin PCR ürünleri 50 ng/µl yoğunluğunda ve minimum 25 µl olacak şekilde hazırlanıp dizi analizini yapacak olan RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Firmasına laboratuvarına gönderildi. Laboratuvara analizde kullanılmak üzere ise 5 pmol/µl yoğunluğunda ve analizde kullanılacak primerler her bir örnek için 5 µl olacak şekilde ana stoklardan hazırlanarak teslim edildi. Her PCR ürünü için tek yönlü okuma ve saflaştırma işlemi yaptırılmıştır. Ham dizi verileri Bioedit Sequence Alignment Editor

programı ile tek bir dizi haline getirildi (Şekil 2.5). Gen Bankası nükleotid blast işlemi ile her suş için mutasyon varlığına bakıldı (BLAST, 2016).



Şekil 2.5. Dizi analizi

3. BULGULAR

3.1. Klinik ve Otopsi Bulguları

Ege bölgesinde bulunan farklı deniz balığı işletmesinden örneklenen hasta levrek ve çipura balıklarına ve serbest dolaşan levrek ve çipura balıklarına ait bulgular Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7’de verildi.

Hasta balıklar iç ve dış bakı olarak incelendi. Dış bakıda iştahsızlık, durgunluk sürüden ayrı dolaşma gözlemlendi. Solungaçların anemik olduğu, ağızda, özellikle deride ventralde dermal hemoraji, operkulum ve anüs etrafında kızarıklıklar saptandı. Bazı hasta balıklarda kornea opaklaşması bazılarında ise korneal ülserler görüldü. İç bakıda ise karaciğerde hemoraji, asites, bağırsakta şişlik ve açık renkli bir sıvı birikimi görüldü. Bazı balıklarda dalak, böbrek ve karaciğerde hipertrofi olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.1. Levrek balığında operkulum ve anüs etrafında görülen kızarıklıklar



Şekil 3.2. Levrek balığında ağız etrafında ülseratif lezyon, gözde opaklaşma



Şekil 3.3. Levrek balığında ventralinde ve dorsalinde görülen ülser

İç bakıda karın boşluğunda aşırı yağlanma ve karaciğerin solgun ve genelde peteşiyal kanamaların olduğu örneklenen balıkların çoğunda tespit edildi.



Şekil 3.4. Levrek balığında karaciğerde peteşiyal hemorajik kanamalar



Şekil 3.5. Levrek balığında iç organlarda yağlanma



Şekil 3.6. Çipura (numune 2-9) balığında karaciğerde hiperemi, bağırsak içi beyaz – opak, şeritler halinde mukoid madde ve bağırsağın sarı şeffaf bir sıvı ile dolu olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. Levrek balığı (numune 30) yüzgeç etrafında peteşiyel kanama

3.2. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Çalışmada 322 adet balık örneği incelenerek *Vibrio spp.* izolasyon ve identifikasyon yöntemleri uygulandı. İzolasyon sırasında kullanılan TSA ve TCBS besiyeri Şekil 3.1’de gösterildi. İzolasyon sonunda krem renğinde, parlak, kenarları düzgün veya yayılımcı koloniler oluşturan suşlar *Vibrio* şüpheli olarak biyokimyasal testler yapıldı. Test sonuçlarına göre Gram negatif, hareketli, katalaz, oksidaz, jelatin, β -galaktosidaz ve arjinin dihidrolaz (ADH) testleri pozitif, H₂S, lizin dekarboksilaz (LDC), ornitin dekarboksilaz (ODC), üreaz, metil red testleri ise negatif, O/129'a duyarlı, arabinoz, maltoz, mannit ve sakkarozdan asit meydana getiren, % 0 tuzlu ortamda üreyemezken % 3-8 tuz içeren ortamda üreyen koloniler *Vibrio* olarak isimlendirildi (Alsina ve Blanch, 1994).

% 10 tuz ilave edilmiş ortamda üreyemeyen, oksidaz, H₂S, indol, ODC, LDC testlerinin pozitif, ADH, β -galaktosidaz, Eskulin hidrolizi testinin negatif olduğu suşlar *V. alginolyticus*; 35 °C’de üreyen agarda yuvarlak düzgün, krem renkli koloniler oluşturan, katalaz, sitokrom oksidaz, indol, nitrat, jelatin, amilaz, glukoz, mannitol, sakkaroz, mannoz, sorbitol, fruktoz testleri pozitif veren; üre, ornitin ve lizin dekarboksilaz, glukozdan gaz oluşumu ve laktoz testleri negatif sonuç verenler *Vibrio anguillarum* olarak isimlendirildi (Çizelge 3.2.).

Etkenin O/129'a duyarlılığı firma tarafından verilen teknik datada yer alan bilgilere göre her iki konsantrasyonda (10 μ g-150 μ g) inhibisyon alanı oluşması duyarlı, her iki konstrasyonda inhibisyon alanı oluşmaması dirençli, 10 μ g konsantrasyonda alanın oluşması ve 150 μ g konsantrasyonda alanın oluşmasına kısmi duyarlı değerlendirildi. Katalaz, oksidaz, H₂S, indol, ODC, LDC, ornitin, lizin dekarboksilaz, MR ve VP testlerinin pozitif, arjinin dihidrolaz, eskulin ve ONPG (β -galaktosidaz) testlerinin negatif sonuç verdiği, nitrat, jelatin, üreaz kullandığı, glukoz, mannitol, sakkaroz, mannoz, sorbitol, fruktoz gaz oluşumu pozitif, arabinoz laktoz ve inositolden gaz oluşumu negatif olan ve TCBS agarda yeşil kononi veren O/129'a duyarlı olan suşlar *V.alginolyticus* olarak isimlendirildi (Noga; 2010; Austin ve Austin, 2012; Buller, 2014).

Çizelge 3.1. İzolatların biyokimyasal identifikasyon sonuçları

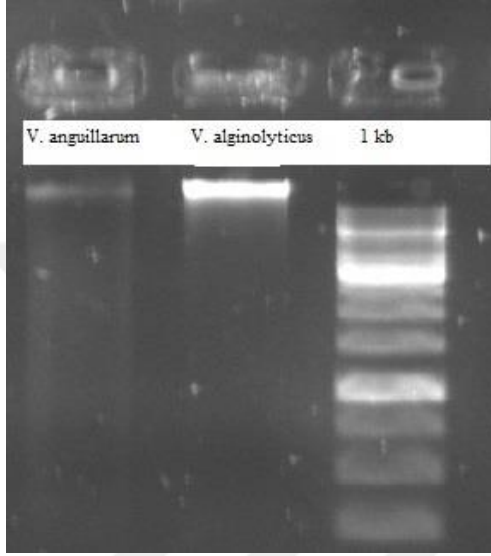
Balık türü/örnekleme yeri	Bakteri Suşu			
	<i>V. anguillarum</i>		<i>V. alginolyticus</i>	
	Av (n)	Kafes (n)	Av (n)	Kafes (n)
Levrek	7	10	10	32
Çipura	5	4	13	17

Çizelge 3.2. Biyokimyasal testler

Testler	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. alginolyticus</i>
Hareket	+	+
Yaygın koloni	-	+
Ferm. Metabolizma	+	+
Katalaz	+	+
Oksidaz	+	+
O/F	F	F
ADH	+	-
B-galaktosidaz	+	-
Arjinin dihidrolaz	+	-
Ornitin dekarboksilaz	-	+
Lizin dekarboksilaz	-	+
H ₂ S	-	+
Indol	+	+
LDC	--	+
ODC	-	+
Eskulin hidrolizi	-	-
Kitin hidrolizi	+	+
Jelatin erime	+	+
Lipit hidrolizi	+	+
Nisasta hidrolizi	+	+
Ureaz	-	+
Metil red	-	+
Nitrat reduksiyonu	+	+
VP	+	+
O/129 duyarlılık	10 µg	
	150 µg	
37°C'de üreme	+	+
%0 NaCl'de üreme	-	-
%7 NaCl'de üreme	-	-
TCBS	+ (sarı)	+ (yeşil)
Sitrat kullanımı	+	+
Mannitol kullanımı	+	+
Sekerden gaz üretimi	-	-
Arabinoz	+	-
Inositol	-	-
Laktoz	-	-
Maltoz	+	+
Mannitol	+	+
Mannoz	+	+
Sakkaroz	+	+
Toplam	26	72

3.2.1. Moleküler İdentifikasyon Bulguları

Konvansiyonel (biyokimyasal) yöntemlerle identifiye edilen tüm izolatların DNA izolasyonu yapıldı, sonrasında DNA bütünlüğü kontrolü için % 1'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.8).

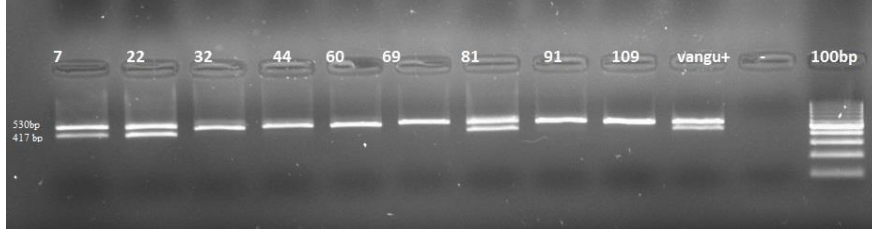


Şekil 3.8. *V. anguillarum* ATCC 43305 ve *V. alginolyticus* ATCC 17749 ait DNA agaroz jel görüntüleri.

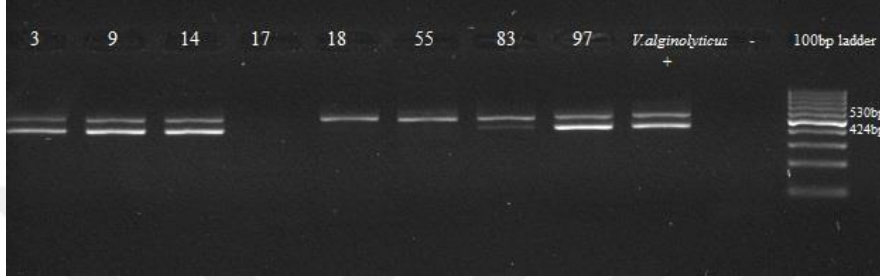
Bütünlüğü ve saflığı kontrol edilen DNA'lar kullanılarak örnekler konvansiyonel PCR ile *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* olarak Çizelge 3.3'de belirtildiği şekilde tespit edilmiştir. Örneklere ait PCR sonuç ve agaroz jel görüntüleri Şekil 3.9 ve Şekil 3.10 verildi.

Çizelge 3.3. İzolatların PCR ile belirlenen identifikasyon sonuçları

	Bakteri Suşu			
	<i>Vibrio anguillarum</i>		<i>Vibrio alginolyticus</i>	
Balık türü/örnekleme yeri	Av (n)	Kafes (n)	Av (n)	Kafes (n)
Levrek	2	9	8	27
Çipura	3	3	11	15



Şekil 3.9. *V. anguillarum* ATCC 43305 PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri. Vanguard+: Pozitif kontrol, - Negatif kontrol, 7, 22,32, 44, 60, 69, 81, 91 ve 109 nolu örnekler

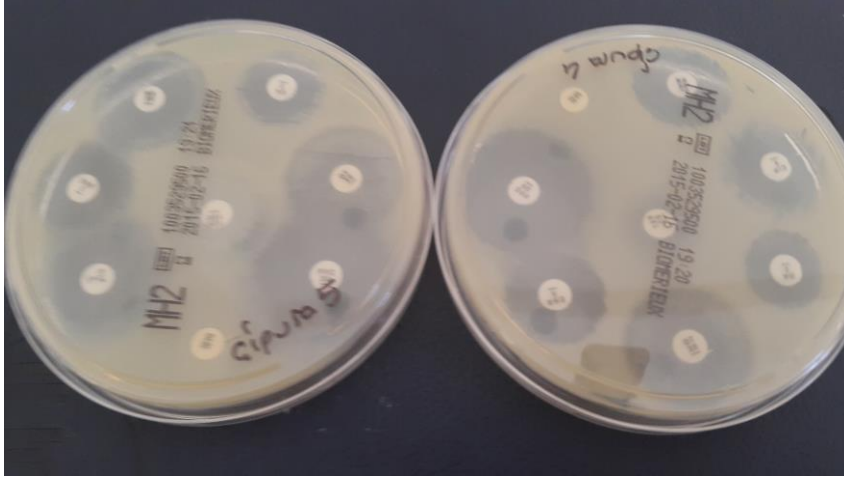


Şekil 3.10. *V. alginolyticus* PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri. *V. alginolyticus* ATCC 17749 + Pozitif kontrol; - Negatif kontrol; 3, 9, 14, 17, 18, 55, 83 ve 97 nolu örnekler

3.3. Antibakteriyel Maddelere Duyarlılık Testi Bulguları

3.3.1. Disk Difüzyon Testi Bulguları

22 saat boyunca 22 °C'lik etüve inkubasyon bırakılan örnekler ve standart suş olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922'nin antibiyotik dirençlilikleri CLSI standartlarına göre değerlendirildi (CLSI 2006). Dirençli (R) oldukları belirlenen suşların yoğun ürediği; hassas (S) ve orta dirençli (I) suşlar disk çevresinde belirli bir zon oluşturduğu görüldü. *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları Çizelge 3.4'te verildi. 35mm< olan izolatlar duyarlı olarak kabul edildi.



Şekil 3.11. Disk difüzyonda testinde farklı zon çapları (Avlanan çipura balık örneği)

Çizelge 3.4. *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Suş adı	<i>V. anguillarum</i> (n:17)			<i>V. alginolyticus</i> (n:61)		
	Duyarlılık (S) Oranları (%)	Orta Derecede Duyarlılık (I) Oranları (%)	Dirençlilik (R) Oranları (%)	Duyarlılık (S) Oranları (%)	Orta Derecede Duyarlılık (I) Oranları (%)	Dirençlilik (R) Oranları (%)
OTC	6	30	64	14	30	55
OXO	18	35	52	22	30	48
ENR	18	42	42	14	33	48

3.3.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Bulguları

22 °C’de 16–18 saat inkübasyon sonunda örnekler okundu. Berrak olarak kalmış, üremenin olmadığı en düşük konsantrasyonun olduğu kuyucuk işaretlendi ve en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu olarak değerlendirildi (Andrews, 2001; CLSI, 2014). Tüm antibiyotik dilüsyonlarında gelişme gösteren suşlar dirençli olarak tespit edildi. Antibiyotik içermeyen ve bakteri inoküle edilmemiş kuyucuklarda kontrol edilerek gerek yöntemin doğruluğu gerekse kontaminasyon olmadığı teyit edildi.

Çizelge 3.5. *Vibrio spp.* ait ilaç konsantrasyonları, minimum ve maksimum MİK değer aralıkları

İlaç/suş	İlaç kons.	<i>V. anguillarum</i> (n:17)	<i>V. alginolyticus</i> (n:61)
OTC	0,25-128 µg/mL	0,5-64 µg/mL	0,25- >128µg/mL
OXO	0,004-128 µg/mL	0,8-16 µg/mL	0,4—16 µg/mL
ENR	0,002-128 µg/mL	0,06-2 µg/mL	0,06-1 µg/mL

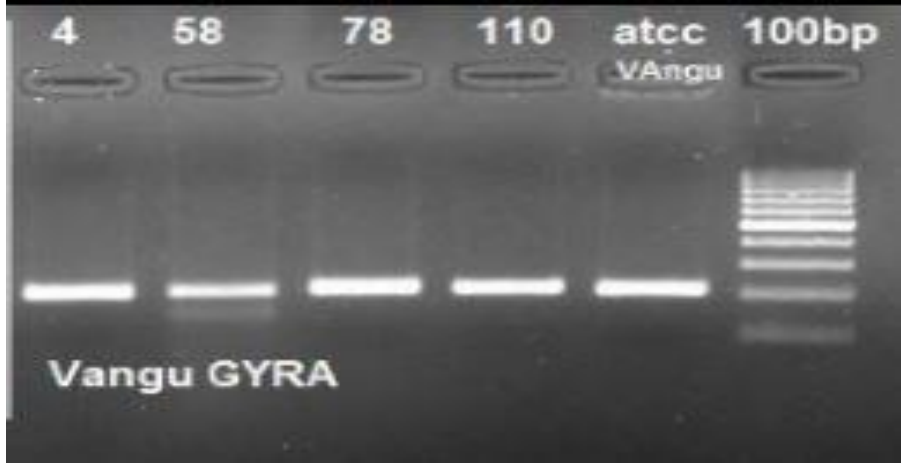
Çizelge 3.6. İdentifiye edilen 78 adet *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşu ortalama MİK₅₀ değeri

Suş adı	<i>V. anguillarum</i> MİK 50 ortalama	<i>V. alginolyticus</i> MİK 50 ortalama
OTC	4 µg/mL	4 µg/mL
OXO	2 µg/mL	1 µg/mL
ENR	0.5 µg/mL	0.3 µg/mL

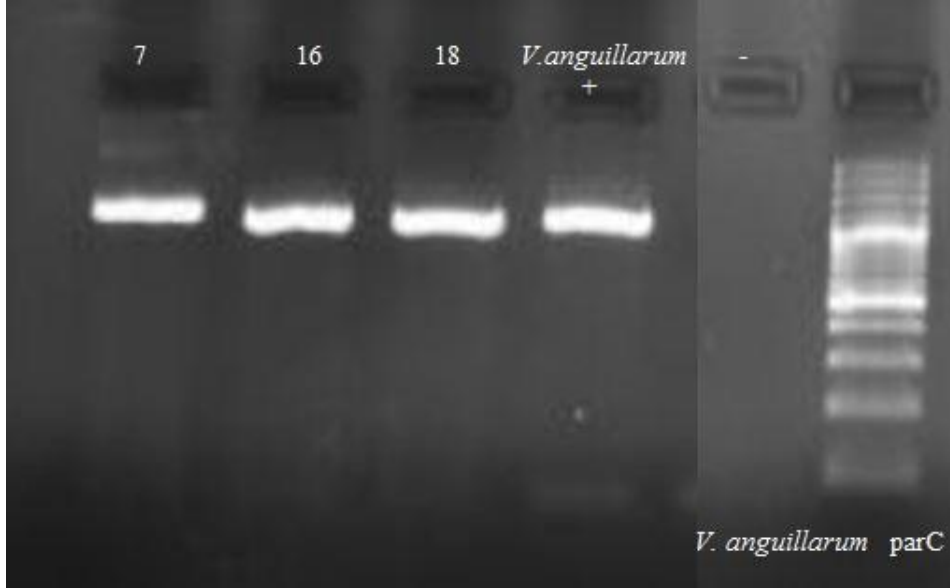
3.3.3. Moleküler Direnç Bulguları

3.3.3.1. Kromozomal Kinolon Grubu Direnci

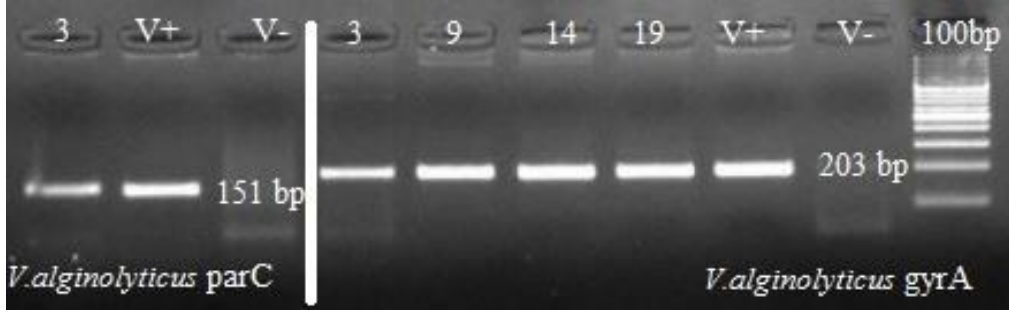
İzolasyonu ve identifikasyonu yapılan *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşlarının DNA'sı; kromozomal aktarımlı kinolon dirençliliği yönünden PCR ile incelendi. Dirençliliğe neden olan DNA giraz (*gyrA*) ve topoizomerez IV (*parC*) genlerinin varlığı Çizelge 3.6 gösterildi.



Şekil 3.12. *V. anguillarum* suşlarında gyrA genine ait PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri. PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri. Vangu+: *V. anguillarum* ATCC 43305 Pozitif kontrol, 4, 58, 78, 110 nolu örnekler



Şekil 3.13. *V. anguillarum* suşlarında parC genine ait PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri. PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri. Vangu+: *V. anguillarum* ATCC 43305 Pozitif kontrol, - Negatif kontrol, 7, 16, 18 nolu örnekler



Şekil 3.14. *V. alginolyticus* suşlarında *gyrA* ve *parC* genlerine ait PCR sonuçları agaroz jel görüntüleri. *V. alginolyticus* ATCC 17749- Pozitif kontrol; V- Negatif kontrol; 3, 9, 14 ve 19 nolu örnekler için *gyrA* ve *parC*

Yükseltgenen bölgelerde gen mutasyonu firma tarafından yapılan dizi analizlerinin ham verileri Bioedit Sequence Alignment Editor programı ile tek bir dizi haline getirildi. Gen Bankası nükleotid blast işlemi ile her suş için mutasyon varlığına bakıldı (Şekil 3.15). Buna göre *gyrA* mutasyonu çevreden avlanan çipura (53) ve kafesten alınan levrekten (78 nolu) izole edilen *V. anguillarum* suşlarında; çevreden avlanan çipura (5 nolu) ve levrekten (67 nolu) ayrıca kafesten alınan levrekten (9, 15 nolu) izole edilen *V. alginolyticus* suşlarında tespit edilmiştir (Çizelge 3.7). Ayrıca çevreden avlanan çipuradan izole edilen *V. anguillarum* 'un 82. kodonunda (Asp-Gly)' da mutasyon tespit edildi. Tüm örneklerin 87. kodonunda ise herhangi bir mutasyon tespit edilmedi.

İzole edilen *V. alginolyticus* suşları arasında sadece 1 tanesinde (kafes levrek) *parC* mutasyonu tespit edilmiş olup, *V. anguillarum* suşlarında ise herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir.

Çizelge 3.7. Dizi analiz ile tespit edilen amino asit değişimleri ve tespit edilen örnek sayıları

Mutasyon					
GyrA			ParC		
Kodon sayısı	Aminoasit	Nükleotid değişimi	Kodon sayısı	Aminoasit	Nükleotid değişimi
83	Ser-İle (6 suş)	AGT-ATT	85	Ser-İle (1 suş)	TCA-ATC

```

103583459 AGTGC TGTATA CGATAC GATTGTTTCGTT
1040 -GYRAF AATGTTGTGTACGACACAAATGTTTCATC
1041 -GYRAF AATGTTGTGTATAACAGAAATCTTTATC
1042 -GYRAF ATTGCTGTGTATACGATACGATTGTTTCGTT
1043 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1044 -GYRAF GGTGCTGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1045 -GYRAF ATAGCTGTGTACGACACAAATCTTTATC
1046 -GYRAF ATAGCTGTGTACGACACAAATGTTTCGTT
1047 -GYRAF ATTGCTGTGTATACGATACAAATGTTTCGTT
1048 -GYRAF AAGGCTGTGTACGACACAGTTCTTTATC
1049 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1050 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1051 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1052 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1053 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1054 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1055 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1056 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1057 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1058 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1059 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT
1060 -GYRAF AGTGC TGTGTACGACACAAATCGTACGTT

```

```

84-PARCF TCGGCGTGTATGAAGCGATTGGTATTGAT
89-PARCF TCGGCGTGTATAAACCAAGGGTATTGAG
92-PARCF TCGGCGTGTATGAAGCGATTGGTATTGAT
108-PARCF TCAGGTATCCACACCTTAACCCCTAGCC
111-PARCF ATCCCTTACCTTAAAGGGATGCCATTGAG
121-PARCF TCAGCGTGTATGAAGCGATTGGTATTGAT
131-PARCF TCGTGCATTATACGCGATTGGTATTGAT
136-PARCF TCGTGC TGTCCCGAACCCACCGTCCCTCC

```

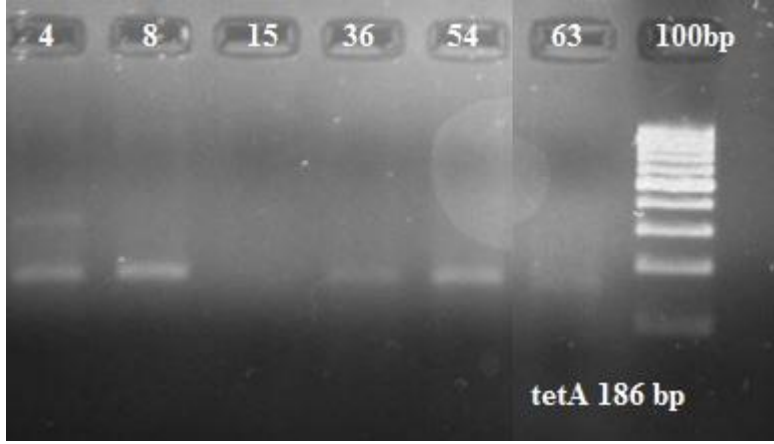
Şekil 3.15. 83. kodon gyrA ve 85. kodon parC mutasyonuna ait dizi analiz görüntüsü

3.3.3.2. Tetrasiklin Grubu İlaç Direnci

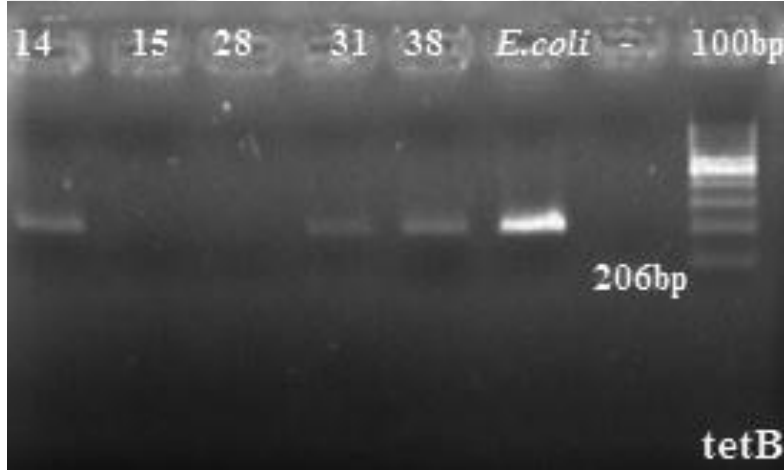
V. anguillarum ve *V. alginolyticus* suşlarında tetrasiklin direncine yol açan ribozomal korunmadan sorumlu gen tetM tespitinde bakteri DNA'sı, effluks sisteminde meydana gelen dirençten sorumlu olan tetA, tetB ve tetD için bakterinin plazmid DNA'sı kullanıldı. Belirlenen genlerin suşlara göre dağılımı Çizelge 3.8.'deki gibidir.

Çizelge 3.8. Tetrasiklin direnç genlerinin suşlara ve balık türlerine göre dağılımı

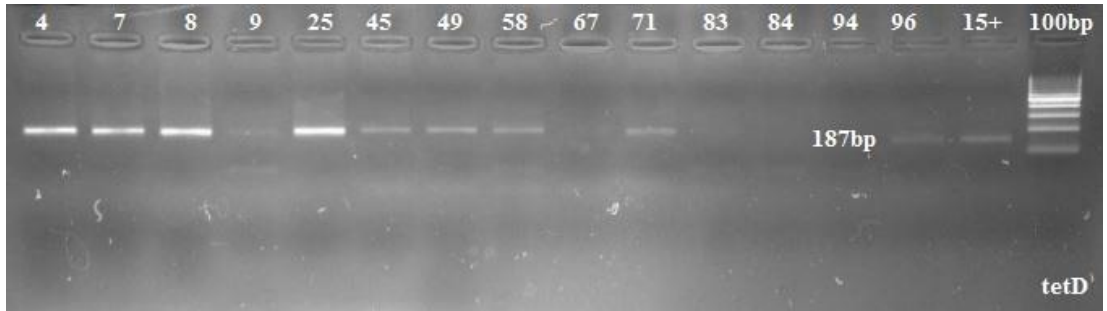
Bakteri suş	<i>V. anguillarum</i>		<i>V. alginolyticus</i>		
	Balık türü	Levrek	Çipura	Levrek	Çipura
TetA		1	4	12	13
TetB		3	3	9	5
TetD		6	4	15	16
TetM		3	1	12	10



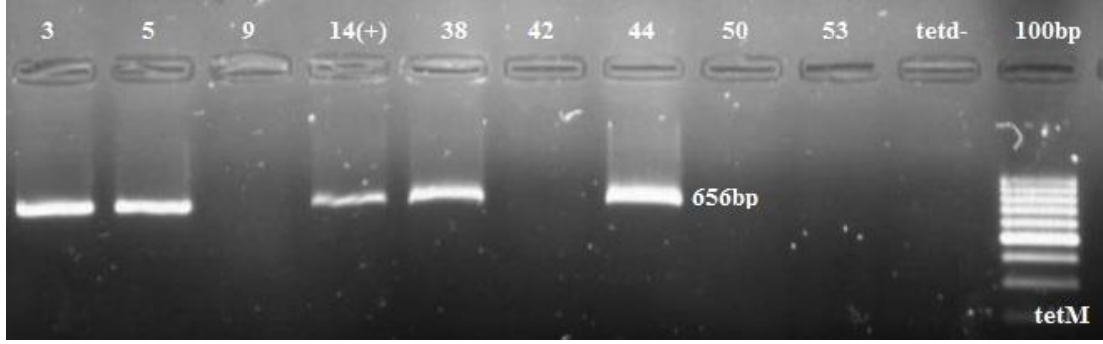
Şekil 3.16. tetA gen jel görüntüsü



Şekil 3.17. tetB gen jel görüntüsü



Şekil 3.18. tetD gen jel görüntüsü



Şekil 3.19. tetM gen jel görüntüsü

Levrekten izole edilen *Vibrio anguillarum* ve *Vibrio alginolyticus* suşlarından 4 tane; Çipuradan izole edilen *Vibrio alginolyticus* suşlarından 2 tanesinde herhangi bir tet genine raslanmadı. Her 4 gen belirtecine ise sadece Levrekten izole edilen *Vibrio alginolyticus* suşunda rastlanıldı.

Ayrıca çipuradan izole edilen *V. alginolyticus* suşlarından 5 tanesinde teta, tetd, tetm genleri, levrekten izole edilen susların 4 tanesinde ise teta-tetd ve tetd-tetm gen çiftleri aynı örnekte tespit edildi. Genlere ait PCR sonuçları ve jel görüntüleri Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18 ve Şekil 3.19 gösterildi.

4. TARTIŞMA

Vibrio anguillarum ve *Vibrio alginolyticus* balıkların doğal bağırsak florasında bulunan, intestinal ve ekstraintestinal infeksiyonlara yol açan bir hastalık etkenleridir. Özellikle levrek ve çipura balıklarında büyük kayıplara neden olmakta, salgınlara yol açmaktadır. Etkenin hızlı ve doğru teşhisi, hastalığın daha büyük kayıplar verilmeden engellenmesini sağlamaktadır. Hastalığın tedavisinde çoğunlukla antibakteriyal ilaçlar tercih edilmekte, yasal olarak izinli olan OTC ve ENR ise tedavide bu anlamda sık kullanılan antibakteriyellerdir. Son yıllarda sağaltım amacıyla hatalı ve yoğun antibiyotik kullanımına bağlı olarak ilaca karşı gelişen antibiyotik dirençliliği karşılaşılan en önemli bir sorunlardan biridir. Kullanılan antibiyotiklerin çevrede uzun süre etkinliğini kaybetmeden bulunması, gerek ortamda serbest avlanan balık popülasyonunda gerekse sucul ortamda yaşayan diğer canlıları olumsuz etkilemektedir. Dirence neden olan genlerin hızlı şekilde yayılması ve boyutunun giderek artması

Bu tez çalışmasında, vibriosis hastalığında levrek ve çipuralarda en fazla hastalık etkeni olan *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşlarının izolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin ve alternatif hızlı, güvenilir PCR tabanlı tanı tekniğinin oluşturulması ve optimizasyonun yapılması, aynı zamanda etken sağaltımında kullanılan kinolon ve tetrasiklin ilaç grubunda direnç durumunun genotipik ve fenotipik ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu şekilde hızlı ve güvenilir alternatif antibakteriyel ilaç seçeneklerinin uygulamaya konularak antibakteriyel ilaçlardan kaynaklanan direncin sağlık ve çevreye yönelik etkilerinin en aza indirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, araştırma sonuçlarının daha sonra yapılacak araştırmalara katkı sağlaması beklenmektedir.

Bu çalışmada, örnek dönemleri olarak Mart- Nisan- Haziran, Ağustos ve Eylül ayları belirlenmiştir. Hastalığın ortaya çıkışında deniz suyu sıcaklığı önemli bir faktör olmaktadır. Yapılan örnekleme zamanlarında su sıcaklığının 17- 24°C olduğu *Vibrio* haziran ayında çoğunlukla *Vibrio alginolyticus* izole edilmiş; su sıcaklığının daha az

olduğu mart- nisan aylarında ise izole edilen örnekler *V. anguillarum* olarak isimlendirilmiştir. Svabodova ve ark.(1993) benzer bir durum gözlemlemiş ve su sıcaklığının düşük olduğu aylarda izole edilen *Vibrio* etkenlerini *V. anguillarum* olarak isimlendi.

V. anguillarum ve *V. alginolyticus* suşlarının izolasyon ve biyokimyasal identifikasyonunda kıvrık şekilli basil, Gram negatif, O/129'a hassasiyet, TCBS'de sarı koloni oluşturma, oksidaz, katalaz, ONPG pozitif bakterilerin görülmesi gibi fenotipik özelliklerine göre *V. anguillarum* olarak teşhis edilmiştir. MR, VP, sitrat, gaz oluşumu, arabinoz, inositol gibi bazı biyokimyasal testlerde farklılık gözlenmiş, benzer sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından bildirilen sonuçlarla benzerlik göstermiştir (Whitman, 2004; Austn-Austin, 2012; Buller, 2014). Myhr ve ark. (1991) elde ettiği bulgulara paralel olarak bu 10 örnekteki biyokimyasal farklılığın yanında 7 örnekte etkenin O/129'a duyarlılığında da farklılık tespit edilmiştir.

Katalaz, oksidaz, indol, LDC, ornitin, lizin dekarboksilaz ve MR testlerinin pozitif, arjinin dihidrolaz, eskulin ve ONPG testlerinin negatif sonuç verdiği tespit edilen, TCBS agarda yeşil kononi veren, O/129'a duyarlı olan suşlar *V.alginolyticus* olarak isimlendirildi. Bazı suşlardan ODC, VP, H₂S negatif tespit edilmiş ve yaygın koloni üremesini göstermediği tespit edilmiştir. Buller (2004) ve Lajnef ve ark., (2012) yaptığı çalışmalarda benzer sonuçlar tespit etmiştir ve farklı sonuçlar veren 12 suşun isimlendirmesinin bu yönde yapılmasına karar verilmiştir. Colorni ve ark. (1981) yaptığı çalışmaya benzer olarak H₂S testinin negatif sonuç verdiği 3 örnek olarak *V. alginolyticus* olarak isimlendirildi. Ayrıca tespit edilen diğer bir farklılıkta isimlendirilen *V. alginolyticus* suşlarının 10 tanesinde 10 µg O/129 disk'e farklı yanıtlar verdiği gözlemlenmiştir. 150 µg O/129 diske ise bütün suşların duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçların Marhual ve ark. (2012) ve Buller (2014)'e paralel olduğu görülmüştür. Ancak identifikasyonu yapılan suşların dağılımında *V. alginolyticus* suşlarının gerek kafes ortamı gerekse avlanan balıklarda daha fazla olduğu tespit edilmiş bu sonuçla Türe ve Alp (2016) yaptığı çalışmada daha fazla olarak *Vibrio anguillarum* tespit etmiş, yaptığımız çalışmadan farklı sonuç elde

edilmiştir. Farklılığın sebebinin örneklenen balık türü, örneklem zamanı ve yeri olduğu düşünülmektedir.

Vibrio anguillarum'un biyokimyasal testlerin farklılıkları nedeniyle hastalıkla mücadele etmede moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Hirono ve ark., (1996)'ı etkenin isimlendirmesini hemolizin geninin tespitiyle gerçekleştirmiştir. Yapılan çalışmada sadece serotip B'nin tespit edilmesi nedeniyle farklı araştırmacılar tarafından diğer gen belirteçleri bakılmıştır. Gonzalez ve ark., (2003) ve Rodkhum ve ark., (2006) da etkenin spesifik identifikasyonu için rpoN ve hemolizin genlerini yükseltmişlerdir ancak bildirilen birleşme sıcaklığı *V. ordalii* suşu içinde aynı olmaktadır. Ayrıca tasarlanan primerlerle *V. ordalii*'nin ayrımı yapılamamaktadır. Diğer bir geliştirilen konvansiyel PCR yönteminde saf bakteri kültüründen OMP (dış membranda bulunan porin proteinleri) sentezinden sorumlu toxR geni tespiti yapılarak *V. anguillarumun* isimlendirilmesi yapılmak istenmiştir. Ancak *V. fluvialis*, *V. alginolyticus* ve *Photobacterium damsela* türlerinde de aynı gen belirteci tespit edilmiştir. Ayrıca OMP'nin sentezinden sorumlu toxR geni doğal balıklara uygulandığında hastalık yapmadığı tespit edilmiştir (Okuda ve ark., 2001). Bu bilgiler ışında etken tespiti için tezde N-asetil-muramil-L-alanin amidaz'ı kodlayan ve etkene özel olduğu düşünülen amiB geni kullanılmıştır. 429 bp'de spesifik bant verdiği ve etken tespitinde kullanılabileceği belirlenmiştir. 16S rRNA ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Tezde alınan sonuçlar Hong ve ark. (2007)'nin elde ettiği sonuçlarla benzerlik gözlemiştir.

İnsanlarda da hastalık etkeni olan *V. alginolyticus* konvansiyonel PCR ve dizi analizi kullanılarak referans genler olan rpoD ve toxR genleri kullanılarak tespit edilebilmektedir. % 99,8 dizi benzerlik gösterdiği *V. parahaemolyticus* ile ayrımında parsiyel toxR dizisi kullanılabilmektedir ancak 2 tür arasında toxR genleri benzerliği % 61 olması yöntemin tercih edilebilirliğini azaltmaktadır. Hastalığın çıkışında virüent suş rol oynamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda gerek *V. parahaemolyticus* ile ayrımı gerekse avirulent suşun ayrımında etkin bir yöntem kullanılmamaktadır. Bu tez çalışmasında Cai ve ark., (2009) 'da belirlediği yöntem kullanılarak suşlar arasında ayrım yapılmıştır. OmpK geni avirulent suşlarda da tespit

edildiği için çalışmaya dahil edilmemiştir. Benzer olarak diğer araştırmacılar da etken identifikasyonunda kollojenaz genini kullanmışlardır. Lui ve ark., (2004) yaptığı çalışmadan farklı sonuç bulunmuş, 16r RNA internal kontrol olarak kullanılmış tek başına % 99,8 dizi benzerlik gösterdiği *V. parahaemolyticus* tam ayırımında kullanılmayacağı görülmüştür.

Yetiştiricilikte yoğun kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen direncin boyutunu tespit etme, alınacak önlemler ve sucul canlılar üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde moleküler yöntemler günümüzde kullanılmaktadır. Özellikle suda uzun süre etkinliğini koruyan ve sıklıkla tedavide kullanılan oksolinik asit ve oksitetrasiklinle ilgili pekçok çalışma yapılmıştır. Tez çalışmasında alınan sonuçlar diğer çalışmalarla benzer sonuçlar içermektedir. Tedavinin başarısında direncin boyutu önemli olmaktadır.

Duyarlılığı belirlemede rutin yöntem olan disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Her iki bakteri suşunda da OTC ye olan direnç diğerlerine göre oldukça yüksek bulunmuştur. OTC'nin yetiştiricilikte sık kullanılması ve direncin gelişmesi ile özellikle oksolinik asit kullanılmış ancak son yıllarda bu ilaç grubunda direnç gelişmiştir. Alternatif olarak ülkelere göre değişmekle birlikte enrofloksasin (siprofloksasin) kullanılmaya başlanmıştır. Fazla ilaç seçeneğininde olmaması nedeniyle bu 2 ilaca karşı giderek artan direnç gelişmesi söz konusu olmaktadır. Test sonuçlarında duyarlılık yüzdeleri her ne kadar birbirine yakın olsada enrofloksasinin daha etkili olacağı düşünülmektedir. Avlanan levrek ve çipuradan izole edilen *V. alginolyticus* suşlarında OTC ve ENR'nin etkili olduğu; kafesten avananlarda ise her üç antibiyotiginde etkinliklerinin birbirine yakın olduğu, levreklerde ENR'n daha etkiliyken çipuralarda ise OXO daha etkili olmaktadır (Ottovaviani ve ark., 2001; Lajnef ve ark., 2012). *V. anguillarum* suşlarında ise kafesten alınan levrekte ENR ve OTC etkili olurken, çipuradan izole edilenlerde üç ilaca karşı direnç bulunmuştur. Avlanan örneklerde kinolon grubunun etkili olduğu belirlenmiştir. Avlanan balıklardan izole edilen tüm suşlarda üç ilaca da değişen oranlarla direnç bulunmuştur. Özellikle avlanan çipuralarda yüksek oranda OTC

direncine rastlanmıştır. Bununda çipuranın beslenme alışkanlığından ileri geldiğini düşülmektedir.

Türe ve Alp (2016) yaptıkları çalışmalarda en etkili ilacın her ne kadar OTC olduğu belirtmişlerse de aldığımız sonuçlarla avlanma bölgesinde direnç yüksek bulunmuştur. Maniati ve ark. (2005) ve Igbinsa (2016)'nın yaptığı çalışmalarda aldığımız sonuçlara benzer şekilde her iki suşta da OTC % 85 oranında dirençli bulunmuştur. Alınan örneklem yerinin bununla ilgili olduğu düşünülmekte lakin OTC Mg⁺² varlığında daha dirençli olmaktadır (Nonaka ve ark., 2002).

In vitro duyarlılık testleri değerlendirildiğinde ise alınan sonuçlar disk difüzyon sonuçları ile paralellik göstermektedir. OTC'ne MİK aralığının diğerlerine oranla daha geniş olduğu görülmüştür. Etken bazında değerlendirdiğimizde ise *V. anguillarum*'da her üç antibiyotik içinde MİK ortalama minimum değerlerinin *V. alginolyticus*'a oranla daha yüksek olduğu belirlenmiş bunun nedeni olarakta uzun yıllar süren ilaç uygulaması olduğu düşünülmektedir. *V. alginolyticus* OTC MİK aralıkları değerlendirildiğinde Vaseharan ve ark. (2005) te yaptığı çalışmaya benzer (22,8-33,5 µg/mL) sonuç alındığı ancak Zanetti ve ark.(2001), Ferrini ve ark. (2008) ve Lajnef ve ark.(2012) yaptığı çalışmaya göre (0,12-1 µg/mL) yüksek bulunmuş; Roque ve ark. (2001) elde ettiği aralığa (301,0 µg/mL) göre ise düşük bulunmuştur. Enrofloksasinle yapılan çalışma sayısı az olmakla birlikte Ferrini ve ark. (2008) elde ettiği değer aralığına (<0,06-1 µg/mL) yakın bulunmuştur. Yaygın olarak yapılan siprofloksasin çalışmaları ile kıyaslayacak olunursa 0,38- 0,52 µg/mL arasında elde edilen sonuçlara göre yüksek çıkmaktadır (Zanetti ve ark., 2001; Vaseharan ve ark., 2005). Oksolinik MİK aralıkları kıyaslandığında ise Lagana ve ark., (2010) belirttiği 3,9-62,5 µg/mL değerlere yakın olduğu görülmüştür. Aynı çalışmacının OTC MİK değer aralığına (62,5-250 µg/mL) kısmen yakın değerler bulunmuştur.

Laboratuvarlar ya da izleme programları yalnızca verilerin toplanmasını sağlarken asıl ihtiyaç duyulan direnci ölçmek ve temel yorumunu yapmaktır. MİK değerleri, MİK değerlerinin regresyon analizleri ve disk difüzyonon değerleri klinik breakpoint'leri belirlemede kullanılmaktadır. Böylece bu değer aralıkları kullanılarak

dirençli ya da duyarlı olarak belirlenen etkenin tedavisinde akılcı antibiyotik kullanımı ve tedavide başarı mümkün olacaktır. Diğer alanlara ait klinik breakpoint değerleri bulunurken su ürünlerinde böyle bir değere rastlanmamaktadır. Su ürünlerinde klinik breakpointleri belirlemede fazla miktarda veriye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çok uzun zaman gerektiren, pek çok laboratuvarla koordineli çalışmayı gerektiren bir süreçtir. Bu sürecin zor olmasının diğer bir sebebi su ürünlerindeki farklılık ve çeşitliliğidir. Doğru PK/PD değerlerini elde etmek için sağaltım seçimini, bakteri türü ve çevreyi (tuzluluk oranı, sıcaklık vb.) ayrı ayrı ya da grup olarak test edilmesi gerekmektedir. İlaç duyarlılıklarını yorumlamamızda klinik breakpointler kullanıldığı gibi epidemiyolojik cut-off (ECO) değerleri de kullanılmaktadır. ECO, bakterilerin *in vitro* duyarlılıkların MİK veya disk difüzyon duyarlılık test verilerinin yayılımından belirlenirken; klinik break point doğrudan klinikle bağlantılı yorumlama kriterlerini sağlamaya çalışırken, cut-off ise bakterilerin *in vitro* duyarlılıklarına göre belirlenmektedir. PK/PD ve klinik verileri olmadığı için sınırlı olan ECO buna rağmen antibiyotik tedavisine başlamada bize yardımcı olmaktadır. Su ürünlerinde Epidemiyolojik cut-off değerleri sadece *Aeromonas salmonicida* için belirlenmeye çalışılmış *V. anguillarum* için sadece bir çalışma bulunmuştur (Smith, 2007; Smith ve Christofilogiannis, 2007).

Suşların dirençli ya da duyarlı olarak yorumlamakta araştırmacılar farklı üreme koşullarında, aynı sınıfa ait farklı antibiyotiklerde ya da farklı suşalarda bildirilen değer aralıklarını kullanmaktadır. Araştırmamızda izole edilen *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları için herhangi bir breakpoint bulunmamaktadır. Bu nedenle suşların duyarlılık ya da dirençlilikleri belirlenememiş sadece MİK'nın min- maks. aralıkları ile Ruangpan ve Tendencia (2004) belirttiği hesaplamaya göre MİK₅₀ değeri hesaplanmıştır. Taramalarda bazı araştırmacılar CLSI'da daha önce verilen *Vibrio* spp. 'e ait değerleri kullanarak "duyarlı" ya da "dirençli" olarak yorum yapmışlardır. Yöntem, *Vibrio* spp. suşlarının 35 °C'de inkübasyon sonucunda değerlendirilmesine dayanmaktadır (Vaseeharan ve ark., 2005; Zanetti ve ark., 2001; Scarano ve ark., 2014). Bu farklılık aldığımız sonuçların yorumlandırmasını sınırlandıran diğer bir sebep olmaktadır.

V. anguillarum ve *V. alginolyticus* suşlarında diğer bakteri türlerinde olduğu gibi kromozomal kinolon direncinin DNA jiraz (gyrA- gyrB) ve topoizomerez IV (parC ve ParE)'da meydana gelen nokta mutasyonu neden olmaktadır. Yapılan dizi analizi sonucunda her suş için mutasyon varlığına bakıldı; gryA 83. kodonda (Ser-ile) ve parC 85. kodonda (Ser-lue) mutasyon tespit edildi. *V. anguillarum* OA MİK değeri 12,5-128 µg/mL arasında olan örneklerde bu değişim olduğu görülmüştür. Tezde alınan sonuçlar yapılan diğer çalışma sonuçları ile benzerlik göstermekle birlikte mutasyonun olduğu MİK değerleri arasında artışın meydana geldiği tespit edilmiştir (Oppegaard ve Sorum, 1994; Okuda ve ark., 2006; Colquhoun ve ark., 2007; Rodkhum ve ark., 2008). Aynı zamanda Gram negatif bakterilerde mutasyonun meydana geldiği diğer kodonlar olan 82 ve 87 incelendi ve herhangi bir mutasyon varlığına rastlanılmamıştır. Okuda ve ark., (2006) yaptığı çalışmada MİK değeri 0,39-6,25 arasında olanlarda 87. kodonda asp- tyr değişimini tespit etmiştir. Tezde ise aynı MİK değerinin olduğu suşlarda herhangi bir mutasyon tespit edilememiştir. Mutasyona daha çok *V. alginolyticus* (4) suşlarında rastlanılmıştır. Daha önce bu suşta benzer bir çalışma yapılmadığı için % 99 benzerlik gösterdiği *V. parahaemolyticus* susunda yapılan çalışmaları incelenmiş 83. kodondaki değişimde benzerlik bulunmuş (ser— ile), ancak 85. kodonda tespit edilen değişim de farklılık (ser-85-phe) gözlenmiştir. Yüksek MİK değerinde parC 89. kodondaki mutasyon varlığına bakılmış ancak herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir (Okuda ve ark., 1999, 2006).

Daha çok çalışmanın yapıldığı *E.coli* suşlarında, kodonda meydana gelen baz değişiminde benzerlik görülmemiştir. Bu durumun tür farklılığından ileri gelebileceği düşünülmüştür (Cengiz, 2010). Mutasyonun gözlemlendiği örneklerin MİK değerleri arasındaki farklılık diğer çalışmalarda benzerlik göstermiştir. Yüksek MİK değerinde mutasyon saptanmayan örneklerde bu durumun diğer direnç aktarım yollarından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (Rodhkum, 2008; Cengiz, 2010). Kinolon direncinin çevre izolatlarında düşük olarak tespit edildiği bildirilmesine rağmen oksolinik aside direnç, yapılan tez çalışmasında yüksek olarak belirlenmiştir (Akinbowale; 2006).

Suzuki (2010) akuatik çevrede en fazla kullanım alanı bulunan tetrasiklinlere gelişen dirençte temel olarak iki direnç mekanizmasının olduğunu belirtmiştir. Tetrasiklin direncine neden olan genler çok çeşitli olmakla 34 adet gen içinde *Vibrio* türlerinde saptanan effluks pompasından sorumlu tet genleri tetA, tetB, tetD daha az oranda tetC ve tetG; ribozomal korumadan sorumlu tetM genleri bulunmaktadır. Çevrede uzun süre etkin olması, bakteriler arasında kolay ve hızlı aktarılması nedeniyle pekçok çalışma yapılmıştır. Tez çalışmasında plazmid aracılı aktarılan tetA, tetB ve tetD genlerine PCR ile bakılmış ve en fazla levrekten izole edilen *V. alginolyticus* suşlarında tespit edilmiştir.

Araştırmacılar tarafından daha çok tetB olmak üzere tetA ve tetE genlerinin tespit prevansının yüksek olduğu belirtilmiş, yapılan tez çalışmasında buna benzer olarak tetA ve tetB genleri yüksek miktarda bulunduğu, farklı olarak tetA rastlanma yüzdesi en yüksek plazmid aktarımlı tetr(tetrasiklin direnç genleri) olmuştur. Diğer yandan ribozomal korumadan sorumlu tetM Gram negatif ve pozitiflerde yaygın bulunmaktadır. Ribozomal korunmadan sorumlu tetS ise daha çoğunlukla Gram pozitif bakterilerde bulunmaktadır. Kim ve ark., (2004)' te yaptığı çalışmada tetM ve tetS gen varlığına bakmış, en fazla tetM olmak üzere ilk defa tetS genini *Vibrio spp.* da bulmuşlardır. Yapılan tez çalışmasında bu çalışmalara paralel olarak tetrasiklin direnç genleri arasında en fazla tespit edilen ve aynı zamanda *Vibrio spp.* bulunan genler tercih edilmiştir. Alınan diğer sonuçlara benzer olarak en fazla levrekten izole edilen *V. alginolyticus* suşunda tetM genine rastlanmış, çipuradan izole edilen *V. alginolyticus* suşlarında da yüksek oranda tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda aynı örnekte tüm tetrasiklin genlerinden tetM ve tetB genleri daha çoğunlukla tespit edilmiştir. Bu sonuçtan farklı olarak Kim ve ark., (2007) örneklerde tetA ve tetD genleri daha fazla tespit edilmiştir. Direnç tespit edilen suşların MİK değerlerine bakıldığında yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı anda bir veya birden fazla tet geninin varlığı MİK değerindeki yükselmeyi de açıklamaktadır. Avlanan çipuralarda yüksek miktarda tetA tespit edilmiştir. Bu miktarların yüksekliği çipura balığının beslenme alışkanlığından ileri geldiği düşünülmekte keza kabuklu deniz canlılarıyla beslenen çipura besinle birlikte çevrede yayılan tetrasiklin direnç genlerini de almaktadır. *Vibrio spp.* de tespit edilmeye çalışılan ve yüksek MİK (125 µg/mL)

değerinde bulunan tet34' de bakılmış fakat herhangi bir sonuç bulunamamıştır (Kim ve ark., 2003). Tetrasiklin ya da oksitetrasiklin direnci sıklıkla rapor edilmektedir. Genel olarak çevreden toplanan sedimentlerde çalışılmış olup burdan izole edilen suşlarda dirençlilik geni varlığı ve düzeyi belirlenmeye çalışılmıştır (Kim ve ark., 2003; Heepngoan ve ark.,2007). Çevreden izole edilen örneklerdeki tetrasiklin direnci ile klinik izolatlardan tespit edilen direnç genleri arasında belirgin farklılığa rastlanılmamıştır (Furushita ve ark., 2003). TetM ve tetD genleri tek olarak tespit edilmemiş, diğer genlerin varlığı görülmüştür. 2 veya daha fazla geni taşıyan suşların MİK değerleri arasında korelasyon bulunamamıştır (Akinbowale, 2007). Gen belirteçlerinin tespit edildiği yüksek MİK değerleri yapılan diğer çalışmalara paralel olmuştur (Miranda ve Zemelman, 2002; Rodkhum ve ark., 2008;).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Artan dünya nüfusunun protein ihtiyacını karşılamakta su ürünleri yetiştiriciliği giderek daha önem kazanmıştır. Su ürünleri yetiştiriciliğinin en önemli problemi profilaktik önlemlere rağmen yaygın ve toplu ölümlere neden olan hastalıkların etkin şekilde önlenememesidir. Bunun pek çok sebebi olmakla birlikte, temel nedenlerden biri direnç gelişmesinden dolayı antibiyotiklere yeterli cevabın alınamamasıdır. Yapılan pek çok çalışmada su ürünleri yetiştiriciliğinde üreticilerin antibiyotik kullanımı konusunda bilinçsiz olduğu, hastalıkların sağaltımında yaygın ve/veya yanlış antibiyotik kullandığı, yetiştiriciliğin belli aşamalarında kontroller ve izlemeler konusunda standartların ve yasaların yetersiz kalarak tüketici sağlığının olumsuz yönde etkilendiği ortaya konulmuştur. Bu sebeplerden dolayı oluşan zararların azaltılması için kullanılacak antibakteriyellerin seçimi oldukça önem arz etmektedir.

Hastalıkların sağaltımı için antibiyotik seçiminde yaygın olarak disk difüzyon ve brot dilüsyon yöntemleri tercih edilmektedir. Ancak, bu konvansiyonel yöntemler daha az kullanılan moleküler yöntemlere göre yetersiz kalmaktadır. Moleküler yöntemlerle hem daha güvenilir hem de daha hızlı sonuçlar alınarak doğru antibiyotik kullanımı sağlanmaktadır. Ancak, Türkiye’de özellikle su ürünleri yetiştiriciliği alanında yapılan çalışmalarda konvansiyonel yöntemler kullanılmış, direnç durumunun tespiti ve alternatif antibiyotik seçimi için moleküler yöntemlerin kullanıldığı bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Bu yöntemlerin kullanılması daha çok hastalık etkeninin tespitiyle sınırlı kalmıştır. Diğer taraftan, günümüzde Türkiye’de özellikle sağaltım bakımından veteriner hekimin sorumluluğu bulunan türler içinde yer alan, fakat yeterince ilgilenilmeyen balık hastalıkları ve rasyonel ilaç kullanımı konusunda yeterli araştırmada bulunmamaktadır. Akılcıl sağaltımın temel ilkelerinden biri hastalığa yönelik doğru ve etkin ilaç kullanımını sağlamaktır.

Antibakteriyel ilaçlarla ilgili karşılaşılan önemli sorunların başında ilaca karşı direnç gelmektedir. Bu sorun bilinçsiz ilaç kullanımının yaygın olduğu hayvan hastalıklarının sağaltımında daha sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Direnç gelişmiş

bakterilere karşı aynı antibakteriyellerin sürekli kullanımı, ilaca cevap alınmasına, sağaltımın gecikmesine, hayvanların hastalıktan ölmesi ile ekonomik kayba sebep olmaktadır. Ayrıca, özellikle su ürünleri yetiştiriciliği alanında olduğu gibi bilinçsizce sulara atılan antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiş mikroorganizmaların diğer sucul canlılara ve bunlar aracılığıyla nihai tüketici konumunda olan insanlara geçmesi ile sadece sağlık yönünden değil ekolojik denge yönünden de önemli sorunlar karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde ekolojik dengenin korunması, belirtilen nedenle sürdürülebilir nitelikte yetiştiricilik yapılması, kısaca bilinçli ilaç kullanımı önem taşımaktadır.

Yapılan çalışmada sağaltımda kullanılan tetrasiklin ve kinolon grubu ilaçlara karşı gelişen direncin giderek arttığı sadece kullanıldığı alanda değil doğada serbest avlanan balıklarda da direnç genlerine rastlanmıştır.

Balıklarda hastalıklara yol açan etkenlere ait çalışma gerek Türkiye’de gerekse dünyada mevcut olmakla birlikte bunların sağaltım seçenekleri hakkında yeteri kadar çalışma mevcut değildir. Antibiyotik direncin önem kazanmasıyla her ne kadar çalışma sayısı arttırılsa da standart metodun tüm laboratuvarlar tarafından kullanılmaması elde edilen verilerin yorumlanmasındaki yetersizliği, tedavideki başarısızlığa neden olmaktadır. Bu amaçla diğer türlerde olduğu gibi türe özgü klinik breakpointleri belirlemek gerekir bu yönde PK/PD çalışmalarına ağırlık verilmesi önerilmektedir. Ayrıca işletme bünyesinde bulunan laboratuvarlarda yapılan çalışmaların da toplanarak veri bankalarının oluşturulması sağlanmalıdır.

ÖZET

Ege Denizi Doğal ve Kültür (Levrek ve Çipura) Balıklarından İzole Edilen *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* Türlerinde Kinolon ile Tetrasiklin Grubu İlaç Direncinin PCR Yöntemiyle Araştırılması

Çoklu doymamış yağ asitleri yönünden zengin olan balık, insanlar için önemli bir besin kaynağıdır. Türkiye İstatistik Kurumu 2015 yılı verilerine göre Türkiye'de su ürünleri üretimi 607,515 tondur. Ülkemiz levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) üretiminde Akdeniz ülkeleri arasında üçüncü, alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) üretiminde ise birinci sırada yer almaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri hastalıkların neden olduğu ekonomik kayıplardır. Ülkemizde ve Avrupa Birliği Ülkelerinde balık hastalıklarının tedavi etmek için kullanılan ruhsatlandırılmış 7 adet etken maddeyi içeren çok sayıda antibakteriyel preparat bulunur; bunların arasında kinolon ve tetrasiklin grubu preparatlar önemli bir yer tutmaktadır. Ancak, özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde bilinçsiz ve yaygın antibiyotik kullanımı, su ortamı ve sedimentte antibiyotiklerin uzun süre etkin şekilde kalmasına ve mikroorganizmalarda direnç gelişmesine neden olur. Dirençli mikroorganizmalar su ortamındaki farklı tür balıklara ve diğer su canlılarına geçerek ekolojik dengenin bozulmasına ve bunları tüketenlerde çeşitli sağlık sorunlarının ortaya çıkmasına yol açar. Sağlığın, doğal ortamın ve tür çeşitliliğinin korunması tüm Dünya'nın önemseydiği ve üzerinde durduğu konulardır. Bu nedenle bakterilerdeki antibiyotik direncini belirlemeye yönelik Türkiye'de ve Dünya'da kontrollü yetiştiricilik ortamında yapılmış pek çok araştırma bulunmaktadır. Buna karşılık, doğal ortam balıklarındaki antibiyotik direncine yönelik hemen hemen hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Türkiye'deki araştırmaların çoğu kültür balıklarında konvansiyonel (disk difüzyon, brot dilüsyon) yöntemle yapılan çalışmalardır. Ancak, son yıllarda bu bağlamda özellikle antibakteriyel direncin belirlenmesinde daha hassas ve etkin olan PCR yöntemi üzerinde durulmaktadır.

Bu araştırmada, Ege denizinde yetiştiriciliği en çok yapılan kültür balığı (Levrek ve Çipura) ile doğal avlanan balıklardan *Vibrio (Listonella) anguillarum* ve *Vibrio alginolyticus* etkenlerinin izolasyonu ve identifikasyonu (konvansiyonel- biyokimyasal ve genotipik) yapılarak belirlenen izolatların tetrasiklin ve kinolon grubu ilaçlara karşı oluşan direncin klasik PCR yöntemle tespit edilmesi ve izole edilen bu etkenlere karşı gelişen direnç haritasının örnekleme alanı ve belirlenen balık türleri üzerinden çıkarılması amaçlanmıştır. Bu şekilde hızlı ve güvenilir alternatif antibakteriyel ilaç seçeneklerinin uygulamaya konularak antibakteriyel ilaçlardan kaynaklanan direncin sağlık ve çevreye yönelik etkilerinin en aza indirilmesi hedeflenmiştir.

Örnekler su sıcaklığının değiştiği Mart-Ağustos tarihleri arasında kafes balığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerden (120 levrek, 120 Çipura) ve serbest avlanan balık numuneleri 82 (40 levrek, 42 Çipura) adet olacak şekilde alınmıştır.

Etkenlerin idendifikasyonu klasik biyokimyasal yöntemlerle tespit edilmiş olup 14 adet kafes, 12 adet avlanan balık örneklerinden *V. anguillarum*; 49 adet kafes, 26 adet avlanan balık örneklerinden *V. alginolyticus* izole edilmiştir. Yapılan türe spesifik moleküler etken identifikasyonunda 12 adet kafes, 5 adet avlanan balık örneklerinden *V. anguillarum*; 42 adet kafes, 19 adet avlanan balık örneklerinden *V. alginolyticus* olarak identifiye edilmiştir.

Araştırmada seçilen antibiyotiklere karşı gelişen direnci ve etkili antibiyotiğin belirlenmesi için klasik metot olan disk difüzyon yöntemi yapılmış olup, avlanan çipura balıklarında tetrasiklin direnç tespit edilirken kafesten alınan örneklerde enrofloksasine duyarlılık oksolinik asite olan duyarlılıktan daha fazla olduğu bulunmuştur. Etkili dozun belirlenmesinde mikropilaka dilüsyon yönteminden yararlanılmıştır. Üremenin gözlenmediği plak işaretlenerek o ilacın MİK değeri belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda *V. alginolyticus* MİK değerleri ortalaması OTC, OXO ve ENR için sırasıyla 4,1, 0,3 µg/mL ve *V. anguillarum* için 4,2,0,5 µg/mL'tir.

Direncin çevredeki boyutu ve dağılımının tespiti için yapılan moleküler testlerde özellikle *Vibrio spp.* 'lerde kinolon grubu ilaç direncine neden olan kromozomal mutasyon tespit edilmiştir. Alınan örneklerin 6 tanesinde gyrA 83. kodonda meydana gelen mutasyona ve 1 örnekte parC 85. kodonda meydana değişim nedeniyle direnç geliştiği tespit edilmiştir. Sağaltımda yoğun olarak kullanılan ve etkinliğini uzun süre devam ettiren tetrasiklin grubu ilaçlarda direncin tespiti için *Vibrio spp.* 'lerde effluks pompasında mutasyona neden olan tetA, tetB ve tetD; ribozomal korunmada mutasyona yol açan tetM genleri araştırılmış olup, yapılan diğer çalışmalara paralel tetA en fazla olmakla birlikte bunu tetB ve tetM takip etmektedir. Çoğu örnekte gen çiftleri halinde direnç tespit edilmiştir.

Diğer örneklerde de özellikle kinolon grubu ilaçlarda (OXO ve ENR) tespit edilen MİK ve disk difüzyon sonuçlarının moleküler yöntemle tespit edilen sonuçla örtüşmemesi direnç aktarımının kromozomal direncin yanı sıra plazmid aktarımlı (qnr) ya da çoklu ilaç (mar) direncinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılacak diğer çalışmalarda bu sorunun yanıtı alınmaya çalışılacaktır.

Sağaltımda kullanılan antibiyotik ilaca paralel olarak direncin arttığı özellikle avlanan balıklarda da direnç genlerinin tespit edilmesi ve çoklu olarak bulunması gelişen direnç için gerekli önlemlerin alınmasını zorunlu hale getirmiştir.

Anahtar Sözcükler: Antibakteriyel Direnç, Çipura, Ege Denizi, Levrek, PCR, *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*.

SUMMARY

Detection of quinolone and tetracycline resistance in *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* strains isolated from cultured (seabream and sea bass) and wild fish in Aegean sea by PCR.

Fish is an important source of food in human health, due to its rich content in polyunsaturated fatty acids. According to data from Turkish Statistics Institute in 2013, the production rate of aquaculture products is 607.515 tonnes. Turkey stands as the third country among Mediterranean region in the production of seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilt-head seabream (*Sparus aurata*); while first in the production of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The most important loss in aquacultural production is related to the economical loss due to diseases. For the treatment of fish diseases, 7 active compounds and several antibacterial preparations are licensed in our country and European Union. Among these compounds, quinolone and tetracyclines are the most well known and important ones. Meanwhile, due to the unprudent and widespread use of antibiotics, lead accumulation of antibiotics in water environment and sediment for a long period of time leading resistance in the target and nontarget microorganisms. Resistant microorganisms are transferred to other fish species and aquatic organisms leading alteration of the ecological balance and cause health problems among the consumers. Conservation of health and species diversity is paid attention with an intense importance all around the world. Therefore, various studies are available for the detection of antibiotic resistance in bacteria in Turkey and globally; meanwhile there are few studies regarding the wild fishes. Studies available in Turkey were mostly conducted in cultured fish with conventional methods such as disk diffusion and broth dilution; while much susceptible and reliable molecular methods such as PCR are applied globally.

Samples of sea bass and gilt-head seabream as the most common cultured fishes in Aegean region and wild fishes are collected for the isolation of *Vibrio (Listonella) anguillarum*, and *Vibrio alginolyticus* isolation and identification (conventional-biochemical and genotypical) to test the tetracycline and quinolone resistance using PCR and develop a resistance map for the tested fish species in the region. With this research, screening of the resistance with fast and reliable methods for selecting the most reliable antibacterial drug options would be evaluated; where the undesirable effects of these resistance on health and environment would be minimised.

82 samples (40 seabass and 42 gilt-head seabream) were collected from cage breeders and wild caught fishes at 30.10-03.11.2015; 07-17.04.2015; 15-27.06.2015 and 24.08-07.09.2015 dates where different temperatures are recorded.

Identification of the bacteria were conducted using classical biochemical methods; where *V. anguillarum* was isolated from 14 cage, 12 wild caught fishes; *V. alginolyticus* was isolated from 35 cage and, 23 wild caught fishes. According to species specific identification *V. anguillarum* was identified from 12 cage, 5 wild caught fishes; where *V. alginolyticus* was identified from 29 cage and 19 wild caught fishes. The common method for the selection of drugs in the field, disk diffusion used in the study revealed that wild caught gilthead seabream have tetracycline resistance; whereas cage bred ones were more susceptible to oxolinic acid than to enrofloxacin. In order to identify the effective concentration microplate dilution was

used; where MIC values were found for OTC, OXO and ENR as 4, 1 and 0.5, $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively for *Vibrio alginolyticus* ve 4,2,0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *Vibrio (Listonella) anguillarum*.

Molecular tests revealed the chromosomal mutation leading quinolone resistance isolated from *Vibrio spp.* Mutations in the 83th codon of *gyrA* was present in 6 samples where a mutation in the 85th codon in *parC* was present in 1 sample. Efflux resistance genes of *tetA*, *tetB* and *tetD*, along with *tetM* for ribosomal mutation were tested for tetracycline resistance, the most common used antibiotic in aquaculture production having long lasting effects; where *tetA* was found the most similar to other studies followed by *tetB* and *tetM*. Most samples were positive for these *tet* genes as couples.

Along with its widespread antibiotic use, resistance were found to have increased; where detection of resistance genes in wild caught animals as multiple resistance genes lead to intensive precautionary measures to be taken seriously compulsory.

Keywords: Aegean Sea, Antibacterial resistance, Sea Bass, Seabream, PCR, *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*.

KAYNAKLAR

- ACTIS LA, TOLMASK Y, ME, CROSA JH (2011). Vibriosis. In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. (Ed by P.T.K. Woo and D.W. Bruno). p. 571–605. CABI Publishing, Wallington, UK.
- ALEKSHUN MN, LEVY S (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* **128**:1037-1050.
- AKAYLI T (2001). Kültür Çipura balıklarında (*Sparus auratus*, L 1758) Vibriosis'in ELISA ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- AKAYLI T, TİMUR G (2004a). Yavru Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) Pseudomonad Septisemisi Üzerinde Bir Çalışma. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Uni.* **30(1)**: 121-131.
- AKAYLI T, TİMUR G (2004b). A Diagnostic Study on Vibriosis Cultured Gilt-head Sea Bream in the Aegean Sea Coast of Turkey, *Istanbul University Journal of Aquatic Sciences* **18**: 43-54.
- AKINBOWALE OL, PENG H, BARTON MD (2006), Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, **100**: 1103–1113. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02812.x
- AKINBOWALE OL, PENG HH, GRANT P, BARTON MD (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **30**: 177-182.
- AKŞİT D (2016). Balık Yetiştiriciliğinde Antibakteriyel Direnç ve Önemi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics* **2(1)**:47-54
- AKŞİT D, KUM C (2008). Gökkuşluğu Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda Sık Görülen Patojen Mikroorganizmaların Tespiti ve Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi. *Yü Vet Fak Derg* **19(1)**: 1-7.
- ALDERMAN DJ (1988). Fisheries chemotherapy: a review. In *Recent advances in aquaculture* (p. 1-61). Springer Netherlands.
- ALDERMAN DJ, HASTINGS TS (1998). Antibiotic Use in Aquaculture: Development of Antibiotic Resistance - Potential for Consumer Health Risks. *International Journal of Food Science and Technology* **33**:139 -155.
- ALDRED KJ, KERNS RJ, OSHERROFF N (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* **53(10)**: 1565-1574.
- ALSINA M, BLANCH AR (1994). A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology* **76(1)**: 76-85.

- ALTINOK İ, GRIZZLE JM, LIU Z (2001). Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org* **44**: 29-34.
- ALTINOK İ, KURT İ (2003). Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **3**: 131-138.
- AMAGLIANI G, OMICCIOLI E, ANDREONI F, BOIANI R, BIANCONI I, ZACCONE R, MAGNANI M (2009). Development of a multiplex PCR assay for *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* identification in fish samples. *Journal of Fish Diseases*, **32(8)**: 645-653.
- AMINOV RI, CHEE-SANFORD JC, GARRIGUES N, TEFEREDEGNE BI (2002). Development, Validation, And Application Of PCR Primers For Detection Of Tetracycline Efflux Genes Of Gram- Negative Bacteria. *Applied and Enviromental microbiology* **68(4)**: 1786-1793
- ANDREWS JM (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* **48(suppl 1)**: 5-16.
- ARDA M (2000). Temel Mikrobiyoloji 2. Baskı Medisan Yayın Serisi no 46. 2000. Medisan Yayınevi, Ankara" künyeli kitabın 28. Bölümü.
- ARMSTRONG SM, HARGRAVE BT, HAYA K (2005). Antibiotic Use in Finfish Aquaculture: Modes of Action, Environmental Fate, and Microbial Resistance, *Hdb Env Chem* **5**: 341–357.
- AUSTIN B, AUSTIN D (2012). Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish Fifth (Revised) Edition. *Springer-Praxis Publishing*, Chichester.
- AVCI H, TANRIKUL TT, AYDOĞAN A, BİRİNCİOĞLU SS (2010). Pathological and Microbiological Investigations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Naturally Infected with *Lactococcus garvieae*, *Kafkas Univ Vet Fak Derg* **16(Suppl-B)**: 313-318.
- BALEBONA MC, ZORILLA I, MORINIGO MA, BORREGO JJ (1998). Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996, *Aquaculture* **166(1-2)**: 19-35.
- BALASSIANO I, BASTOS MC, MADUREIRA DJ, SILVA IG, FREITAS-ALMEIDA AC, OLIVEIRA SS (2007). The involvement of tetA and tetE tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102(7)**: 861-866.
- BAUER AW, KIRBY WMM, SHERRIS JC, TURCK M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**: 493-496.
- BAYDAN E, YURDAKÖK B. (2009). Balıklarda ilaç kalıntıları. *Türk Vet. Hek.Birliği Derg.* **9**: 66-77.

BAYDAN E, YURDAKÖK B, AYDIN, FG (2012) Balıklarda Antibiyotik Kullanımı, *Türkiye Klinikleri J Vet Sci* **3(3)**: 45-52 (Derleme).

BENBROOK CM (2002). Antibiotic drug use in U.S. aquaculture.

Erişim Adresi:[http://m.iatp.org/files/421_2_37397.pdf].

Erişim tarihi: 1/6/2013.

BIOMERIEUX (2016). API Identification.

Erişim Adresi:[http://www.biomerieux-usa.com/clinical/api/diagnostics/dynPage?doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_11].

Erişim Tarihi: 18/10/2016.

BLAST (2016). Basic Local Alignment Search Tool,

Erişim: [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

Erişim Tarihi: 10/12/2016.

BOERLİN P, WHITE DG (2008). Antimicrobial Resistance and Its Epidemiology. In Guide to Antimicrobial "Use": in *Animals*, edited by Lars Bogø Jensen Luca Guardabassi, Hilde Kruse, p.: 27-43. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

BSGM (2016). Balıkçılık ve Su ürünleri Genel Müdürlüğü. Su Ürünleri İstatistikleri. .

Erişim Adresi:[<http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf>]

Erişim tarihi: 10/12/2016.

BULLER, NB (2014). Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic Animals: a practical identification manual. Cabi.

BURKA JF, HAMMELL KL, HORSBERG TE, JOHNSON GR, RAINNIE DJ, SPEARE DJ (1997). Drugs in salmonid aquaculture A review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic* **20(5)**: 333-349.

CAI SH, LU YS, WU ZH, JIAN JC, HUANG YC (2009). A novel multiplex PCR method for detecting virulent strains of *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture Research* **41(1)**: 27-34.

CAI SH, LU YS, WU ZH, JIAN JC, WANG B, HUANG YC. (2010). Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of *Vibrio alginolyticus*, the causative agent of vibriosis in mariculture fish. *Letters in applied microbiology* **50(5)**: 480-485.

CANDAN A (1991). Lymphocystis Disease of *Sparus aurata* in Marine Culture at Aegean and Mediterranean Coast of Turkey. *MEDRAP II, Mediterranean Regional Aquaculture*

Project. Basic Level Training Course on Disease, Diagnosis and Prevention for Aquatic Species. Turkey.

CANDAN A, KÜÇÜKER AM, KARATAŞ S (1995). Motile Aeromonad Septicemia in *Salmo salar* Cultured in The Black Sea in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **15(6)**: 195.

CANDAN, A., KÜÇÜKER-ANĞ, M., KARATAŞ, S., 1996, Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bull. Ass. Fish Pathol.* **16(5)**: 195-196.

CENGİZ, M (2010). Bakterilerde Kinolon Drencinin Genetiği. *Uludağ Uni. J.Fac. Vet. Med.* **29(1)**: 55-60.

CHART, H. ve TRUST, T.J. 1984. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Can. J. Microbiol.* **30**: 703-710.

CLSI (2006a). Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals. Approved Guideline.

CLSI (2006b). Publication M45-P—Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline (ISBN 1-56238-583-6).

CLSI (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (VET03-VET04-S2E) Twenty-Second Informational Supplement Aquatic Animals.

COLORNI A, PAPERNA I, GORDIN H (1981). Bacterial infections in gilthead sea bream *Sparus aurata* cultured at Eliat. *Aquaculture* **23**: 257-267.

COLQUHOUN DJ, AARFLOT L, MELVOLD CF (2007). *gyrA* and *parC* Mutations and Associated Quinolone Resistance in *Vibrio anguillarum* Serotype O2b Strains Isolated from Farmed Atlantic Cod (*Gadus morhua*) in Norway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51(7)**: 2597–2599.

ÇOŞKUN F, GÜLTEK A, PATRON K, GÜR A (2011). Su Ürünleri Yetiştiriciliği Sektör Raporu. Su Ürünleri Yetiştiricileri Üretici Merkezi Birliği.

Erişim Adresi:[<http://www.suymerbir.org.tr>]

Erişim tarihi: 10/1/2014.

ÇAĞIRGAN H (1993). The First Isolation of *Pasteurella piscicida* From Cultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Hayvancılık Araştırma Dergisi* **3(2)**: 17-19.

ÇAĞIRGAN H (2004). Levrek Yavrularında (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) Vibriozise Karşı Aşı Geliştirilmesi. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi* **21**: 271-274.

ÇAĞIRGAN H, YÜREKLİTÜRK O (1991). First isolation of *Yersinia ruckeri* from a rainbow trout farm in Turkey. Fifth International Conference “Disease of Fish and Shellfish”, Book of Abstracts, 131.

- ÇAĞIRGAN H, TANRIKUL T, BALTA F (1997). Characteristic yellow pigmented bacteria isolated from diseased Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Eighth International Conference "Diseases of Fish and Shellfish" 14 – 19 Sep., Edinburg, Scotland European Association of Fish Pathologists.
- ÇİFTÇİ İH, AŞIK G (2011). *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları. *ANKEM 2011* **25(3)**: 196-207.
- ÇOLAK HS (1999). Deniz Levreklerinde (*Dicentrarchus labrax* L.) Deneysel Olarak Oluşturulan Pasteurellosis Hastalığının Patogenezisi ve Kemoterapatlere Olan Duyarlılığı, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- DALSGAARD I, HOI L, SIEBELING RJ, DALSGAARD A (1999). Indole- positive *Vibrio vulnificus* isolated from disease outbreaks on a Danish eel farm. *Diseases of Aquatic Organisms* **35(3)**:187-194.
- DAVIES J, DAVIES D (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* Sept: 417–433.
- DEFOİRD T, SORGELOOS P, BOSSİER P (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology* **14(3)**: 251-258.
- DEMİRCAN MD, CANDAN A (2006). Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* Gene) Associated with Vibriosis in Marine Fish in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **30**: 305-310.
- DİLER Ö, ALTUN S, ADİLOĞLU AK, KUBİLAY A, İŞIKLI B (2002). First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **22(1)**: 21-26.
- DILER I, GOKOGLU N (2004). Investigation of the sensory properties of the flesh of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with astaxanthin, shrimp waste meal and red pepper meal. *European Food Research and Technology* **219(3)**: 217-222.
- DİLER Ö, ALTUN S, İŞIKLI BI (2003). Kültürü yapılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un fenotipik karakterleri. *S. D. Ü. Fen Bil. Enst. Derg.* **7**: 1-8.
- DURMAZ Y, ONUK EE, ÇİFTÇİ A (2012). Investigation of the presence and antibiotic susceptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout farms (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) in The Middle and Eastern Black Sea Regions of Turkey, *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **59**: 141-146.
- ERDOĞDU AT (2012). Akuatik Canlılarda Antibiyotik Kullanımı. Bilinçli Antibiyotik Kullanımı ve Antimikrobiyal Direnç Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı). 18 Ekim 2012 Sempozyum Kitabı. s.: 87-90.

- EVERETT MJ, JIN YF, RICCI V, PIDDOCK LJ (1996). Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40(10)**: 2380-2386.
- FAO (2005). Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. edited by FAO Fisheries Technical Paper. No.469. Rome, Italy.
- FAO (2010). Fisheries and Aquaculture Department, 2010, The State of World Fisheries and Aquaculture (Cilt 978-92-5-106675-1). Rome: Food and Agriculture Organization of The United Nations.
- FAO (2011). Food and Agriculture Organization of The United Nations. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010*. Edited by FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome, Italy.
- FERRINI AM, MANNONI V, SUFFREDINI E, COZZI L, CROCI L (2008). Evaluation of antibacterial resistance in *Vibrio* strains isolated from imported seafood and Italian aquaculture settings. *Food Analytical Methods* **1(3)**: 164-170.
- FURUSHITA M, OKAMOTO A, MAEDA T, OHTA M, SHIBA T (2005). Isolation of Multidrug-Resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) from a Marine Fish Farm. *Appl Environ Microbiol.* **71(9)**: 5598–5600.
- GKGM (2014). Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü.. Ruhsatlı Veteriner Tıbbi Ürünler. <http://www.gkgm.gov.tr/vtu/RListe.aspx>. Erişim tarihi: 10.12.2016.
- GKGM (2016). Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü.. Ruhsatlı Veteriner Tıbbi Ürünler. Erişim Adresi:[<http://www.gkgm.gov.tr/vtu/RListe.aspx>]. Erişim tarihi: 11/12/2016.
- GONZALEZ SF, OSORIO CR, SANTOS Y (2003). Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples. *Diseases of aquatic organisms* **55(2)**: 109-115.
- GUARDABASSI, L, KRUSE H (2008). Principles of Prudent and Rational Use of Antimicrobials in Animals. In *Guide to Antimicrobial Use in Animals*, edited by Lars Bogø, Jensen Luca Guardabassi, Hilde Kruse. p.:1-12. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- GÜR D (2010). Antibiyotikler ve In-vitro Parametreler. *Ankem Dergisi* **24(Ek 2)**:155- 158.
- GÜRALP H (2012). Deniz Kültür Balıklarında Görülen Bakteriyel Patojenlerin Teşhisi ve Antibakteriyel Maddelere Duyarlılıklarının Belirlenmesi Yüksek Lisans Tezi.
- HAWKE JP (2000). Bacterial Disease Agents, Encyclopedia of Aquaculture. STICKNEY RR, John Wiley & Sons Howgate. p.:67.
- HEUER OE, KRUSE H, GRAVE K, COLLIGNON P, KARUNASAGAR I, ANGULO FJ (2009). Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture. *Clinical Infectious Diseases* **49(8)**:1248-1253.

- HEEPNGOEN P, SAJAPHAN K, FERGUSON JA, SADOWSKY MJ (2008). Genetic and physiological characterization of oxytetracycline-resistant bacteria from giant prawn farms. *J Microbiol Biotechnol* **18**: 199-206.
- HIRONO I, MASUDA T, AOKI T (1996). Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microbial pathogenesis* **21(3)**: 173-182.
- HOLT JG, KRIEG NR, SNEATH PH, STALEY JT, WILLIAMS ST (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology Ninth Edition. Lippincott Williams & Wilkins Company.
- HONG GE, KIM DG, BAE JY, AHN SH, BAI SC, KONG IS (2007). Species-specific PCR detection of the fish pathogen, *Vibrio anguillarum*, using the *amiB* gene, which encodes N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *FEMS microbiology letters* **269(2)**: 201-206.
- HOOPER DC (1999). Mechanisms of Fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates* **2**:38-55.
- HORSBERG TE (1994). Experimental methods for pharmacokinetic studies in salmonids. *Annual Review of Fish Diseases* **4**:345-358.
- IGBINOSA EO (2016). Detection and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* Isolates in Aquaculture Environments: Implications for Public Health. *Microbial Drug Resistance* **22(3)**: 239-245.
- IZUMI S, FUJII H, ARANISHI F (2005). Detection and identification of *Flavobacterium psychrophilum* from gill washings and benthic diatoms by PCR- based sequencing analysis. *J. Fish Dis.*, 28, 559–564. Izumi, S., & Wakabayashi, H. (1997). Use of PCR to detect *Cytophaga psychrophila* from apparently healthy juvenile ayu and coho salmon eggs. *Fish Pathology* **32(3)**: 169-173.
- IZUMI S, WAKABAYASHI H (1997). Use of PCR to detect *Cytophaga psychrophila* from apparently healthy juvenile ayu and coho salmon eggs. *Fish Pathology* **32(3)**: 169-173.
- KALDIRIM K, YILMAZ M (2013). SU ÜRÜNLERİ VE BALIKÇILIK SEKTÖR RAPORU 2013. Orta Karadeniz Kalkınma Ajansı. Erişim adresi: [<http://www.oka.org.tr/NewsDownload/SUURUNLERIVEBALIKCILIKSEKTORRAPORU.pdf>]. Erişim tarihi: 20/1/2014.
- KARATAŞ DÜĞENCİ S, CANDAN A (1997). Marmara bölgesindeki bir gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*) işletmesinde yersiniozis vakası. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu. (17 – 19 Eylül 1997). Eğirdir/Isparta. s.:641 – 648.
- KARATAŞ DÜĞENCİ S, CANDAN A, DEMİRCAN D (2004). Enteric Red Mouth Disease in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) on the Black Sea Coast of Turkey. *The Isreali Journal of Aquaculture* **56(3)**: 226-231.
- KARATAŞ S, CANDAN A, DEMİRCAN D (2005). Atypical *Aeromonas* Infection in Cultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Black Sea, *The Isreali Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **57(4)**: 255-263.

- KAYIŞ S, CAPKIN E, BALTA F, ALTINOK I (2009). Bacteria in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Black Sea Region of Turkey - A Survey. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* **61(4)**: 339-344.
- KEMPER N (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* **8(1)**:1-13.
- KIM S-C, CARLSON K (2007). Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* **387**: 1301-1315.
- KIM SB, NEDASHKOVSKAYA OI, MIKHAILOV VV, HAN SK, KIM KO, RHEE MS, BAE KS (2004). *Kocuria marina* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1617–1620.
- KIM YS, PARK JW, CHOI YJ (2003). New approaches for the effective recovery of fish proteins and their physicochemical characteristics. *Fisheries Science*, 69(6), 1231-1239.
- KIM MJ, HIRONO I, AOKI T (2005). Detection of quinolone-resistance genes in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains by targeting-induced local lesions in genomes. *Journal of fish diseases* **28(8)**: 463-471.
- KORUN J, TİMUR G (2001). Gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma, *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi* **12**: 15-30.
- KORUN J, TİMUR G (2005). The first pasteurellosis case in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at low marine water temperatures in Turkey. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **57(3)**: 197–206.
- KUBİLAY A, ULUKÖY G (2004). First isolation of *Staphylococcus epidermidis* from cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **24(3)**: 137-143.
- KUM C, KIRKAN S, SEKKİN S, AKAR F, BOYACIOĞLU M (2008). Comparison of in vitro antimicrobial susceptibility in *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout fry. *J Aquat Anim Health* **20(4)**: 245-51.
- KUMMERER K (2008). Effects of Antibiotics and Virustatics in the Environment. *In Pharm. in the Environment*, edited by Klaus Kümmerer. p.:223-244. Springer Berlin /Heidelberg.
- LALITHA MK (2004). Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing, Department of Microbiology Christian Medical College Vellore, Tamil Nadu.
- LAJNEF R, SNOUSSİ M, ROMALDE JL, NOZHA C, HASSEN, A (2012). Comparative study on the antibiotic susceptibility and plasmid profiles of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from four Tunisian marine biotopes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28(12)**: 3345-3363.

- LEE CM., TREVINO B, CHAIYAWAT M (1995). A simple and rapid solvent extraction method for determining total lipids in fish tissue. *Journal of AOAC International* **79(2)**: 487-492.
- LEVY SB, MCMURRY LM, BARBOSA TM, BURDE, V, COURVALIN P, HILLEN W, ROBERTS MC, ROOD JI, TAYLOR DE (1999). Nomenclature of new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.***43**: 1523–1524
- LITWIN CM, CALDERWOOD SB (1993). Role of iron in regulation of virulence genes, *Clinical Microbiology Reviews* **6(2)**: 137-149.
- LIU S, LIU Y, ZHOU G, ZHANG X, LUO C, FENG H, YANG H (2001). The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization. *Aquaculture* **192(2)**: 171-186.
- LIU PC, LIN JY, CHUANG WH, LEE KK (2004). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **20**: 495–499.
- LÓPEZ JR., ROCA E, NÚÑEZ S, HERRAN R, NAVAS JI, MANCHAD, M, HERRERA M., TORANZO AE (2009). Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased cultured wedge sole *Dicologlossa cuneata*, *Diseases of Aquatic Organisms* **84**: 209–217.
- LUPIN HM (2009). Human health aspects of drug and chemical use in aquaculture. The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. Zaragoza, *CIHEAM*, 95-103.
- MACDONELL MT, COLWELL RR (1985). Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology* **6(2)**: 171–182.
- MANIATI M, IKONOMIDIS A, MANTZANA P, DAPONTE A, MANIATIS AN, POURNARARS S (2007). A highly carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate with a novel blaVIM-4/blaP1b integron overexpresses two efflux pumps and lacks OprD. *Journal of antimicrobial chemotherapy* **60(1)**: 132-135.
- MARHUAL NP, DAS BK, SAMAL SK (2012). Characterization of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Penaeus monodon*: Antimicrobial resistance, plasmid profiles and random amplification of polymorphic DNA analysis. *African Journal of Microbiology Research* **6(20)**: 4261-4269.
- MARTINEZ JL (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* **157 (11)**:2893-2902.
- MARTINEZ-PICADO, J, BLANCH, AR, JOFRE, J (1994). Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using a specific oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology* **60(2)**:732.

- MARTINEZ M, SILLEY P (2010). Antimicrobial drug resistance. In *Comparative and Veterinary Pharmacology* pp.: 227-264. Springer Berlin Heidelberg.
- MCPHERSON MJ, MØLLER SG (2006). PCR, Taylor & Francis, 0415355478,9780415355476.
- MIRANDA CD, ZEMELMAN R (2002). Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, 212(1), 31-47.
- MIRANDA CD, TELLO A, KEEN PL (2013). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Finfish Aquaculture environments. *Frontiers in Microbiology*. Doi: 10.3389/fmicb.2013.00233.
- MUSTAPHA S, MUSTAPHA EM, NOZHA C (2013). *Vibrio alginolyticus*: an emerging pathogen of food borne diseases. *Int J Sci Tech* **2**: 302-309.
- MULCAHY D (2011). Antibiotic use during the intracoelomic implantation of electronic tags into fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **21(1)**:83-96.
- MUROGA K, TAKASHI S, YAMANIO H (1979). Non-cholera vibrio isolated from diseased ayu. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **45**: 829-834.
- MYHR E, LARSEN JL, LILLEHAUG A, GUDDING R, HEUM M, HASTEIN T (1991). Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. *Applied and Environmental Microbiology* **57(9)**: 2750-2757.
- 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) *Aquacult. Res.* **30**:279-286.
- NASCIMENTO AMA (2011). Use of the rRNA operon and Genomic Repetitive Sequences for the Identification of Bacteria. In: *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*, Edited by F.J. de Bruijn, John Wiley & Sons, 1118010442, 9781118010440.
- NEWTON CR, GRAHAM A (1994). PCR, BIOS Scientific Publishers Limited, 1872748 821.
- NIKAIDO H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-388.
- NOGA E J (2010). *Fish Disease Diagnose and Treatment*. Second ed. Iowa, USA: Wiley - Blackwell.
- NONAKA L, SUZUKI S (2002). New Mg²⁺-dependent oxytetracycline resistance determinant Tet 34 in *Vibrio* isolates from marine fish intestinal contents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46(5)**: 1550-1552.

- NOVOTNY L, DVORSKA L, LORENCOVA A, BERAN V, PAVLIK I (2004). Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Veterinari Medicina-Praha* **49(9)**: 343-358.
- OKAMOTO KI, HIDAKA J, FUKAGAWA M, KANAMORI K. (1992). Structure of triaqua (nitrilotriacetato) vanadium (III) tetrahydrate. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications* **48(6)**: 1025-1027.
- OKUDA N (2001). The costs of reproduction to males and females of a paternal mouthbrooding cardinalfish *Apogon notatus*. *Journal of Fish Biology* **58(3)**: 776-787.
- OKUDA J, HAYAKAWA E, NISHIBUCHI M, NISHINO T (1999). SEQUENCE Analysis of *gyrA* and *parC* homologues of a Wild-Type Strain of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Fluoroquinolone resistance Mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43(5)**: 1156-1162.
- OKUDA Y, YODA H, UCHIKAWA M, FURUTANI-SEIKI M, TAKEDA H, KONDOH H, KAMACHI Y (2006). Comparative genomic and expression analysis of group B1 *sox* genes in zebrafish indicates their diversification during vertebrate evolution. *Developmental dynamics* **235(3)**: 811-825.
- OPPEGAARD H, SØRUM H (1994). *gyrA* mutations in quinolone-resistant isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **38(10)**: 2460-2464.
- OSORIO CR, COLLINS MD, TORANZO AE, BARJA JL, ROMALDE JL (1999). 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis, *Appl Environ Microbiol.* **65**: 2942-2946.
- OTTAVIANI D, MASINI L, BACCHIOCCHI S (2003). A biochemical protocol for the isolation and identification of current species of *Vibrio* in seafood. *Journal of applied microbiology* **95(6)**: 1277-1284.
- ÖZTÜRK RÇ, ALTINOK İ (2014). Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **14**: 275-297.
- PARK SW, CHUN SK (1986). Characteristics of pathogenic *Vibrio* spp. isolated from cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Bull. Korean Fish. Soc.* **19**: 147-154.
- PHILLIPS BW, JOHNSTON CE (2004). Fish assemblage recovery and persistence. *Ecology of Freshwater Fish* **13(2)**: 145-153.
- POWELL JL, LOUTIT MW (1994). The detection of fish pathogen *Vibrio anguillarum* in water and fish using a species-specific DNA probe combined with membrane filtration. *Microbial ecology* **28(3)**: 375-383.
- RAJAN PR, LIN JY, HO MS, YANG HL (2003). Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. *Journal of Applied Microbiology* **95(6)**: 1375-1380.

- REIMSCHUESSEL R, STEWART L, SQUIBB E, HIROKAWA K, BRADY T, BROOKS, D. HODSDON C (2005). Fish drug analysis—Phish-Pharm: a searchable database of pharmacokinetics data in fish. *The AAPS Journal* **7(2)**: E288-E327.
- RODGERS CJ (2003). The Risks Associated With The Use of Veterinary Drugs and Chemicals in Aquaculture: and Control. The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture, Advanced Seminar, İzmir, Turkey, s:21-23.
- RODGERS LJ, BURKE JB (1981). Seasonal variation in the prevalence of 'red spot' disease in estuarine fish with particular reference to the sea mullet, *Mugil cephalus* L. *Journal of Fish Diseases* **4(4)**: 297-307.
- RODKHUM C, MAKI T, HIRONO I, AOKI T (2008). gyrA and parC associated with quinolone resistance in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases* **31**: 395-399.
- ROTTMANN W, FRANCIS-FLOYD R, DURBOROW R (1992). The Role of Stress in Fish Disease Southern Regional Aquaculture Center (SRAC).
- ROQUE A, MOLINA-AJA A, BOLAN-MEJIA C, GOMEZ-GIL B (2001). In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents* **17(5)**: 383-387.
- RUANGPAN L, TENDENCIA EA (2004). Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment. *Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department*.
- RUIMY R, BREITTMAYER V, BOIVIN V, CHRISTEN R (1994) Assessment of the state of individual bacterial cells by hybridization with a ribosomal rRNA targeted fluorescently labeled oligonucleotide probe. *FEMS Microbiol Ecol* **15**:207–214.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- SANDERS P (2005). Antibiotic Use in Animals. *Policies and Control Measures Around Europe*. In *Antibiotic Policies* edited by Ian Gould and Jos Meer, 649-672. Springer US.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**:5463-7.
- SAKAZAKI R, IWANAMI S, FUKUMI H (1963). Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacetia, *vibrio parahaemolyticus*. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* **16(4)**: 161-188.
- SAKAZAKI R, TAMURA K, KATO T, OBARA Y, YAMAI S, HOBOK K (1968). Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. *Japanese journal of medical science and biology* **21(5)**:325-331.

SCARANO C, SPANU C, ZIINO G, PEDONESE F, DALMASSO A, SPANU V, DE SANTIS EP (2014). Antibiotic resistance of *Vibrio* species isolated from *Sparus aurata* reared in Italian mariculture. *New Microbiol* **37(3)**: 329-337.

SAMANIDOU VF, EVAGGELOPOULOU EN (2007). Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. *J.Sep. Sci.* **30**: 2549-2569.

SAPKOTA A, SAPKOTA AR, KUCHARSKÍ M, BURKE J, MCKENZIE S, WALKER P, LAWRENCE R (2008). Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environ Int* **34 (8)**:1215-26.

SARIKAYA A (2008). DNA'nın İzolasyonu ve Analizi, In: Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Editörler: G. Temizkan, N., Arda, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

SAVAŞ H, ALTINOK I, CAKMAK E, FİRİDİN S (2006). Isolation of *Renibacterium salmoninarum* from cultured Black Sea salmon (*Salmo trutta labrax*): first report in Turkey, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **26(6)**: 238.

SEYFRIED EE, NEWTON R J, RUBERT K F, PEDERSEN JA, McMAHON KD (2010). Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline. *Microbial ecology* **59(4)**:799-807.

SCHMİDT AS, BRUUN MS, DALSGAARD I, LARSEN JL (2001). Incidence, Distribution, and Spread of Tetracycline Resistance Determinants and Integron-Associated Antibiotic Resistance Genes among Motile Aeromonads from a Fish Farming Environment. *Applied And Environmental Microbiology* **67(12)**: 5675–5682

SCHMİDT LJ, GAİKOWSKI MP, GİNGERİCH WH (2004). An environmental assessment of the proposed use of oxytetracycline-medicated feed in freshwater aquaculture.

Erişim

Adresi:[http://www.umesc.usgs.gov/documents/reports/2004/schmidt_01_2004.txt]

Erişim Tarihi: 22/7/2015.

SCHIEWE MH, CROSA JH (1981). Molecular characterization of *Vibrio anguillarum* biotype 2. *Canadian Journal of Microbiology* **27(10)**: 1011-1018.

SCHIEWE MH, TRUST TJ, CROSA JH (1981). *Vibrio ordalii* spp. nov: A causative agent of vibriosis in fish. Washington Sea Grant Program, Seattle. s.:31-40.

SEKKİN S, KUM C (2011). Antibacterial Drugs in Fish Farms: Application and Its Effects published in Recent Advances in Fish Farms.

Erişim Adresi:[<http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-fish-farms>] syf: 217-50. Erişim tarihi: 13/6/2013.

SHEWAN JM, McMEEKIN TA (1983). Taxonomy (and ecology) of *Flavobacterium* and related genera. *Annual Reviews in Microbiology* **37(1)**: 233-252.

- SMITH P (2007). A survey of methods and protocols currently being used to determine antimicrobial susceptibility of bacteria associated with fish disease. *Bulletin-European Association Of Fish Pathologists*, **27(1)**: 18.
- SMITH DL, HARRIS AD, JOHNSON JA, SILBERGELD EK, MORRIS JG (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99(9)**: 6434-6439.
- SMITH P, CHRISTOFILOGIANNIS P (2007). Application of Normalised Resistance Interpretation to the detection of multiple low-level resistance in strains of *Vibrio anguillarum* obtained from Greek fish farms. *Aquaculture* **272(1)**: 223-230.
- SMITH PR, LE BRETON A, HORSBERG TE, CORSIN F (2008). Guidelines for Antimicrobial Use in Aquaculture. In *Guide to Antimicrobial Use in Animals*, edited by Lars Bogø Jensen Luca Guardabassi, Hilde Kruse, 207- 218. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- SOTO E, ENDRIS RG, HAWKE JP (2010). In vitro and in vivo efficacy of florfenicol for treatment of *Francisella asiatica* infection in tilapia. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **54(11)**: 4664-4670.
- SRINIVASAN R, KARAOZ U, VOLEGOVA M, MACKICHAN J, KATO-MAEDA M, MILLER S, LYNCH SV (2015). Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PloS one* **10(2)**: e0117617.
- STACHOWIAK M, CLARK S, TEMPLIN R, BAKER K (2010). Tetracycline-Resistant *Escherichia coli* in a Small Stream Receiving Fish Hatchery Effluent. *Water, Air, Soil Pollution* **211**:251-259.
- STICKNEY RR (2000). *Encyclopedia of aquaculture*. Wiley.
- SVOBODOVÁ Z, LLOYD R, MACHOVÁ J, VYKUSOVÁ B (1993): Water quality and fish health. EIFAC Technical Paper, FAO Rome, Italy, 59.
- SUZUKI S (2010). Tetracycline resistance gene in Asian aquatic environments. In *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry–Biological Responses to Contaminants* Hamamura N, Suzuki S, Mendo S, Barrosao CM, Iwata H, Tanabe S (eds.). Tokyo, Japan: TERRABUP, 1-8.
- ŞEN E (2007). Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.1758) Balıklarında *Flexibacter maritimus* Enfeksiyonu Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- TANIR G, ÇÖL N (1999). Antibiyotik Direnci. *Klinik Dergisi* **12(2)**: 47-54
- TELETCHEA F (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **19(3)**:265.

TİMUR G, AKAYLI T (2003). First Study of Staphylococcosis in Farmed Rainbow Trout. International Symposium of Fisheries and Zoology (in memory of Ord. Prof. Dr. Curt KOSSWIG in His 100th Birth Anniversory) Istanbul University Fisheries and Zoology Faculty, 23-25 October, Istanbul, 67-79.

TİMUR G, TİMUR M (1991). An Outbreak of Enteric Redmouth Disease in Farmed Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* **11**: 181-182.

TİMUR G, KORUN J (2004a). First Outbreak of Vibriosis in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *Istanbul University Journal of Aquatic Sciences* **18**: 1-9.

TİMUR G, TİMUR M, KORUN J (2004b). A Study on the Outbreak of Flavobacterium psychrophilum Infection in a Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hatchery in Turkey. *Istanbul University Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* **17**: 21-27.

TİMUR G, TİMUR M (2003). Balık Hastalıkları, İstanbul Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi, ISBN: 975-404-699-9.

THOMPSON FL, GOMEZ-GIL B, VASCONCELOS ATR, SAWABE T (2007). Multilocus Sequence Analysis Reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are Distinct Species, *Appl. Environ. Microbiol.* **73(13)**: 4279–4285.

TOPAL A, ATAMANALP M, ORUC E, KIRICI M, KOCAMAN EM (2014). Apoptotic effects and glucose-6-phosphate dehydrogenase responses in liver and gill tissues of rainbow trout treated with chlorpyrifos. *Tissue and Cell* **46(6)**: 490-496.

TORANZO AE, BARJA JL (1990). A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain, *Diseases of Aquatic Organisms* **9**: 73-82.

TORANZO AE, BEATRIZ M, ROMALDE JL (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems, *Aquaculture* **246**: 37–61.

TREVES-BROWN KM (2000). Applied Fish Pharmacology 3. cilt/Aquaculture Series, Springer, 0412621800, 9780412621802.

TUİK (2010). Su Ürünleri İstatistikleri, Türkiye İstatistik Kurumu,

Erişim Adresi:[http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?tb_id=47&ust_id=13]

Erişim Tarihi: 20/4/2011.

TUİK (2016). Su Ürünleri İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu,

Erişim Adresi:[www.tuik.gov.tr]

Erişim tarihi: 11/5/2016.

TÜRE M, EROĞLU O, AKSAKAL E (2012). Balık Hastalıklarında Moleküler Genetik Belirteçler ve Kullanımları. *Yunus Araştırma Bülteni* **3**:8-17.

TÜRE M, ALP A (2016). Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in *Turkey Journal of Veterinary Research* **60(2)**: 141-146.

TÜRK E, OĞUZ H (2013). Kültür Balıkçılığında İlaç Kullanımı ve Halk Sağlığı Açısından Önemi. *Bornova Vet. Bil. Derg.* **35 (49)**: 35-43

UMS-Türkiye Sağlık Bakanlığı Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (2016). MİK Saptama Yöntemleri AMD -TP-04.

Erişim Adresi:[<http://mikrobiyoloji.thsk.saglik.gov.tr/Dosya/tani-rehberi/uamdss/08-AMD-TP-04-MIK-saptama-yontemleri.pdf>]

Erişim Tarihi: 19/12/2016.

WALKER RD, GİGUÉRE S (2008). Principles of Antimicrobial Drug Selection and Use. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, edited by J.F. Prescott, Baggot, J.D., Walker, R.D., Dowling, P.M., 107-117. Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional.

WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK RE (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* **3(2)**: 163-175.

WHITMAN KA (2004). *Finfish and Shellfish Bacteriology Manual Techniques and Procedures*. Iowa: Iowa State Press A blackweel Publishing Company.

WHO (2011). *Tackling Antibiotic Resistance From a Food Safety Perspective in Europe*. Edited by World Health Organization. Copenhagen, Denmark.

VASEEHARAN B, RAMASAMY P, MURUGAN T, CHEN JC (2005). *In vitro* susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 26, 285-291.

YANONG RPE. (2003). *Use of antibiotics in ornamental fish aquaculture*. University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences; *Circular* **84**:1-4.

YAMAN F, SEÇER S, HALKMAN AK (2003). Ağ Kafeslerde Yetiştiriciliği Yapılan Çipura (*Sparus aurata* L.) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) Balıklarında Vibriosiz ve Pasteurellosis'in Araştırılması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* **1(2)**: 1-36.

YİAGNİSİS M, ATHANASSOPOULOU F (2011). Bacteria isolated from diseased wild and farmed marine fish in Greece. INTECH Open Access Publisher.

YARDIMCI, RE (2011) Kültür levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax* L.) tenacibaculum maritimum'un identifikasyonunda diyagnostik tekniklerinin karşılaştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- YAZICIOĞLU N (2015). Su Ürünleri Sektörüne Genel Bakış Tüketici Davranışları ve Su Ürünlerinin Sağlık Açısından Faydaları Gediz Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü İşletme Bölümü Yüksek Lisans Tezi.
- YU D, YI X, MA Y, YIN B, ZHUO H, LI J, HUANG Y (2009). Effects of administration mode of antibiotics on antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* in aquatic ecosystems. *Chemosphere* **76** (7): 915-920.
- YÜCE A (2001). Antibiyotik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi* **14**(2):41-46.
- ZANETTI S, SPANU T, DERIU A, ROMANO L, SECHI LA, FADDA G (2001). In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *International journal of antimicrobial agents* **17**(5): 407-409.
- ZHOU Y, GREGOR VE, AYIDA BK, WINTERS GC, SUN Z, MURPHY D, ... WEBBER, SE (2007). Synthesis and SAR of 3, 5-diamino-piperidine derivatives: Novel antibacterial translation inhibitors as aminoglycoside mimetics. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **17**(5): 1206-1210.
- ZLOTKIN A, ELDAR A, GHITTINO C, BERCOVIER H (1998). Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR, *J. Clin. Microbiol.* **36**: 983-985.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Farah Gönül Aydın

E-Posta Adresi: farahgonul.aydin@gmail.com

Telefon (İş) 3123170315-4229

Telefon (Cep) 5055116759

Adres :Ankara Üniversitesi/Veteriner Fakültesi/Klinik Öncesi Bilimleri Bölümü/Farmakoloji Ve Toksikoloji Anabilim Dalı/İrfan Baştuğ Cad. 06110, Dışkapı - Ankara

II. Öğrenim Bilgisi

Doktora Ankara Üniversitesi
2010-2016 Sağlık Bilimleri Fakültesi

Tez Adı: Ege Denizinden Yakalanan Doğal Ve Kültür (Levrek Ve Çipura) Balıklarından İzole Edilen Vibrio Ve Photobacterium Türlerinde Kinolon İle Tetrasiklin Grubu İlaç Direncinin Pcr Yöntemiyle Araştırılması Tez Danışmanı:(Emine Baydan)

Lisans Università Degli Studi Di Bologna
2007-2009 Facolta Di Medicina Veterinaria (Erasmus Öğrenci Değişim Programı)

Lisans Ankara Üniversitesi
2004-2010 Veteriner Fakültesi

Yabancı Dil
İngilizce (İleri),İtalyanca(İleri),Fransızca(Başlangıç)

III. Görevler

Araştırma Görevlisi (2011-) Ankara Üniversitesi/Veteriner Fakültesi/Klinik Öncesi Bilimleri Bölümü/Veterinerlik Farmakoloji Ve Toksikolojisi Anabilim Dalı

IV.Mesleki Deneyim

06.2009-09.2009 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Bölümler,Ankara, Stajer
05.2008-09.2009 Bologna Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinik Bölümler,İtalya
05.2007-08.2007 Merkez Veteriner Kontrol Ve Araştırma Enstitüsü,Ankara, Stajer

07.2006-09.2006 TİGEM Karacabey Harası,Bursa, At,Sığır,Yeni Doğan Ünitesi Ve Hayvan Besleme,Stajyer
07.2005-08.2005 Kızılkalesi Belediyesi,Mersin, Stajyer

V. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

1. Veteriner Farmakoloji Ve Toksikoloji Derneği, Yönetim Kurulu Üyesi, 2012
2. Veteriner Farmakoloji Ve Toksikoloji Derneği, Üye,2011
3. Clinical & Laboratory Standards Institute (Clisı), Üye, 2016
4. Türk Farmakoloji Derneği, Üye, 2016
5. World Aquatic Veterinary Medical Association, Üye, 2016

VI. Bilimsel İlgi Alanları

A. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1. Baydan Emine,Küçükersan Seher,Yurdakök Dikmen Begüm,Aydın Farah Gönül,Sevin Sedat,Arslanbaş Emre,Çetinkaya Alp (2016). Comparison Of Nutritional Composition Moisture Ash Crude Protein Nitrogen And Safety Aflatoxin Nitrate Nitrite Or Organic And Conventional Rice And Lentil Samples Consumed İn Ankara. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 63(4), 365-376. (Yayın No: 2924903)
2. Kuzukıran Özgür,Yurdakök Dikmen Begüm,Filazi Ayhan,Sevin Sedat,Aydın Farah Gönül,Tutun Hidayet (2016). Determination Of Polychlorinated Biphenyls İn Marine Sediments By Ultrasound Assisted Isolation And Dispersive Liquid Liquid Microextraction And Gas Chromatography Mass Spectrometry. Analytical Letters, 49(15), 2525-2536., Doi: 10.1080/00032719.2016.1151890 (Yayın No: 2611727)
3. Baydan Emine,Kaya Sezai,Çağırğan Haşmet,Yıldırım Ebru,Altıntaş Levent,Yurdakök Dikmen Begüm,Ekici Hüsamettin,Aydın Farah Gönül,Aslı Gul Kucukosmanoglu (2015). Investigation Of Some Veterinary Drug Residues İn Sea Water Sediment And Wild Fishes Captured Around Fish Farms İn The Aegean Sea Oxytetracycline İvermectin And Emamectin. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (Yayın No: 1354310)
4. Filazi Ayhan,Şireli Ufuk Tansel,Yurdakök Dikmen Begüm,Aydın Farah Gönül,Aslı Gul Kucukosmanoglu (2015). The Effect Of Cooking And Storage On Florfenicol And Florfenicol Amine Residues İn Eggs. Italian Journal Of Food Science, 27(3) (Yayın No: 1708595)
5. Öztürk Hakan,Salgırlı Demirbaş Yasemin,Aydın Farah Gönül,Pişkin İlksin,Ünler Ferhunde Melis,Emre Mehmet Bahri (2015). Effects Of Hydrolyzed And Live Yeasts On Rumen Microbial Fermentation İn A Semicontinuous Culture System Rusitec. Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences(39), Doi: Doi:10.3906/Vet-1506-16 (Yayın No: 1708546)
6. Filazi Ayhan,Şireli Ufuk Tansel,Yurdakök Dikmen Begüm,Aydın Farah Gönül,Aslı Gul Kucukosmanoğlu (2014). Depletion Of Florfenicol And Florfenicol Amineresidues İn

Chicken Eggs. British Poutry Science, Doi: 10.1080/00071668.2014.935701 (Yayın No: 1354308)

7. Baydan Emine,Kaya Sezai,Çağırğan Haşmet,Yıldırım Ebru,Altıntaş Levent,Yurdakök Dikmen Begüm,Ekici Hüsamettin,Aydın Farah Gönül,Aslı Gul Kucukosmanoglu (2014). Determination Of Veterinary Drug Residues In Seawater Sediment And Natural Fish In The Aegean Sea. Fresenius Environmental Bulletin, 23, 2602-2609. (Yayın No: 1354306)

B. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında (Proceedings) Basılan Bildiriler :

1. Filazi Ayhan,Şireli Ufuk Tansel,Yurdakök Dikmen Begüm,Aydın Farah Gönül (2012). Effect Of Cooking And Storage Times On Florfenicol And Florfenicol Amine Residues In Eggs. Eavpt (/)(Yayın No:1354311)

2. Yurdakök Dikmen Begüm,Kuzukıran Özgür,Tutun Hidayet,Sevin Sedat,Aydın Farah Gönül,Filazi Ayhan (2016). Antropogenic Ecotoxicity Evaluation İn Vitro And İts Relation To The Occurence Of Some Persistent Organic Pollutants İn Water And Sediment Samples Collected From Ankara River. 52nd European Congress Of The European Societies Of Toxicology, Doi: Doi: 10.1016/J.Toxlet.2016.06.1754 (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:2924910)

2. Aydın Farah Gönül, Yurdakök Dikmen Begüm,Kısmalı Görkem (2016). The Potential Cytotoxic Effects Of Valeriana Officinalis Extract On Prostate Cancer Cell Lines Du 145 And Pc 3. 52nd European Congress Of The European Societies Of Toxicology (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:2924916)

3. Yurdakök Dikmen Begüm, Kuzukıran Özgür, Aydın Farah Gönül,Tutun Hidayet,Sevin Sedat,Filazi Ayhan (2016). Occurrences Distributions And Monthly Variations Of Some Persistent Organic Pollutants İn Water And Surface Sediments From Ankara River Turkey. Society Of Toxicology 55th Annual Meeting And Toxexpo (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:2924908)

4. Yurdakök Dikmen Begüm,Tutun Hidayet,Sevin Sedat,Aydın Farah Gönül (2015). Evaluation Of Antropogenic Ecotoxicity İn Ankara River Using Rtg2 Cell Line. Eavpt (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:1708696)

5. Ozgur Kuzukıran,Yurdakök Dikmen Begüm,Filazi Ayhan,Sevin Sedat,Aydın Farah Gönül,Tutun Hidayet (2015). A Novel Method Based On Ultrasound Assisted Extraction With Low Density Solvent And Dispersive Liquid Liquid Microextraction For The Determination Of Selected Polychlorinated Biphenyls İn Marine Sediments By Gas Chromatography Mass Spectrometry. Eavpt (/)(Yayın No:1708683)

6. Baydan Emine,Kaya Sezai,Çağırğan Haşmet,Yıldırım Ebru,Altıntaş Levent,Yurdakök Dikmen Begüm,Aydın Farah Gönül,Aslı Gul Kucukosmanoglu (2015). Investigation Of Veterinary Drug Residues İn Sea Water Sediment And Wild Fishes Captured Around Fish Farms İn The Aegean Sea Sulfonamides Sulfamerazine Smr Sulfadimidine Smt Sulfamethoxazole Smxz Sulfadimethoxine Sdmx. Eavpt, 38 (/)(Yayın No:1708659)

7. Kuzukıran Ozgur,Yurdakök Dikmen Begüm,Filazi Ayhan,Sevin Sedat,Aydın Farah Gönül (2013). Investigation Of Selected Pcb's İn Water Samples From Ankara River By Ultrasound Assisted Emulsification Microextraction Usaeme And Gas Chromatography

Mass Spectrometry Gc Ms. Food Safety:Toxicology From Farm To Fork (/)(Yayın No:1354313)

C. Yazılan Ulusal/Uluslararası Kitaplar Veya Kitaplardaki Bölümler:

Yazılan Ulusal/Uluslararası Kitaplardaki Bölümler:

1. Livestock Science, Bölüm Adı:(Contaminants In Animal Products) (2017)., Baydan Emine,Kanbur Murat,Arslanbaş Emre,Aydın Farah Gönül,Gürbüz Semra,Tekeli Muhammet Yasin, Intech's Publication, Editör:Selim Sekkin, Basım Sayısı:1, İngilizce(Bilimsel Kitap), (Yayın No: 3218979)
2. Veteriner Hekimlikte Antibiyotikler Pratik Bilgiler Rehberi Özgün, Bölüm Adı:(Balık Ve Hamster Hastalıklarında Kullanılan Antibiyotikler) (2013)., Yarsan Ender,Altıntaş Levent,Yurdakök Dikmen Begüm,Ekici Hüsamettin,Aydın Farah Gönül, Güneş Tıp Kitabevleri, Editör:Yarsan Ender, Isbn:978-975-277-510-7, Türkçe(Bilimsel Kitap), (Yayın No: 941148)

D. Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler :

1. Yurdakök Begüm, Aydın Farah Gönül (2013). Sentetik Misk Kalıntıları. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 27(3), 173-176. (Kontrol No: 941019)
2. Baydan Emine, Yurdakök Begüm, Aydın Farah Gönül (2012). Balıklarda Antibiyotik Kullanımı. Türkiye Klinikleri, 3(3), 45-52. (Kontrol No: 940984)

E. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

1. Aydın Farah Gönül,Baydan Emine (2016). Su Hayvanları Yetiştiriciliğinde Biyogüvenlik Yönünden Dezenfeksiyon İşlemleri. V. Ulusal Veteriner Farmakoloji Ve Toksikoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:2924918)
2. Aydın Farah Gönül, Baydan Emine (2013). Balık Patojenlerinde Antibakteriyel Direnç Gelişimi. Iv. Ulusal Veteriner Farmakoloji Ve Toksikoloji Kongresi, (/)(Yayın No:941164)
3. Yurdakök Begüm, Aydın Farah Gönül (2013). Hayvansal Gıdalarda Sentetik Misk Kalıntısı. Iı.Bölgesel Toksikoloji Sempozyumu (/)(Yayın No:941172)
4. Aydın Farah Gönül, Baydan Emine, Yurdakök Begüm (2013). Balıklarda Bulunabilen Kirleticiler. Iı. Bölgesel Toksikoloji Sempozyumu (/)(Yayın No:941180)
5. Tutun Hidayet, Sevin Sedat, Yurdakök Begüm, Altıntaş Levent, Aydın Farah Gönül (2012). Bazı Albendazol Preparatlarının Etken Madde Miktarının Belirlenmesi. Iv. Ulusal Veteriner Farmakoloji Ve Toksikoloji Kongresi (/)(Yayın No:941127)

Diğer Yayınlar

1. Aydın Farah Gönül,Baydan Emine (2016). Balık Hastalıklarının Önlenmesi Ve Sağaltımında İmmunostimulantlar. Türkiye Klinikleri Dergisi, 2(1), 22-28. (Ulusal) (Hakemli) (Makale Derleme Makale) (Yayın No: 3219519)
2. Aydın Farah Gönül,Baydan Emine,Arslanbaş Emre (2016). Balık Yetiştiriciliğinde Kimyasal Dezenfektan Kullanımı. Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri, 2(1), 14-21. (Ulusal) (Hakemli) (Makale Derleme Makale) (Yayın No: 3219437)

3. Aydın Farah Gönül, Yurdakök Dikmen Begüm, Kısmalı Görkem (2016). The Potential Cytotoxic Effects Of Valeriana Officinalis Extract On Prostate Cancer Cell Lines Du 145 And Pc 3. *Toxicology Letters*, 258, 299, Doi: 10.1016/J.Toxlet.2016.06.2037 (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 3219720)
4. Baydan Emine, Kaya Sezai, Çağırğan Haşmet, Yıldırım Ebru, Altıntaş Levent, Yurdakök Dikmen Begüm, Ekici Hüsamettin, Aydın Farah Gönül, Aslı Gul Kucukosmanoglu (2015). Investigation Of Veterinary Drug Residues İn Sea Water Sediment And Wild Fishes Captured Around Fish Farms İn Theaegian Sea Sulfonamides Sulfamerazine Smr Sulfamididine Smt Sulfamethoxazole Smxz Sulfadimethoxine Sdmx. *Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics*(38), 115-116. (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 2350253)
5. Ozgur Kuzukıran, Yurdakök Dikmen Begüm, Filazi Ayhan, Sevin Sedat, Aydın Farah Gönül, Tutun Hidayet (2015). A Novel Method Based On Ultrasound Assisted Extraction With Low Density Solvent And Dispersive Liquid Liquid Microextraction For The Determination Of Selected Polychlorinated Biphenyls İn Marine Sediments By Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics*(38), 169 (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 2350417)
6. Yurdakök Dikmen Begüm, Tutun Hidayet, Sevin Sedat, Aydın Farah Gönül (2015). Evaluation Of Antropogenic Ecotoxicity İn Ankara River Using rgt2 Cell Line. *Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics*(38), 31 (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 2350574)

E. Teknik Not, Vaka Takdimi, Araştırma Notu Vb.

1. Derleme Makale, Aydın Farah Gönül, Baydan Emine, Arslanbaş Emre (2016). Balık Yetiştiriciliğinde Kimyasal Dezenfektan Kullanımı. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri*, 2(1), 14-21. (Yayın No: 3219437)
2. Özet, Aydın Farah Gönül, Yurdakök Dikmen Begüm, Kısmalı Görkem (2016). The Potential Cytotoxic Effects Of Valeriana Officinalis Extract On Prostate Cancer Cell Lines Du 145 And Pc 3. *Toxicology Letters*, 258, 299, Doi: 10.1016/J.Toxlet.2016.06.2037 (Yayın No: 3219720)
3. Özet, Yurdakök Dikmen Begüm, Kuzukıran Özgür, Tutun Hidayet, Sevin Sedat, Aydın Farah Gönül (2016). Antropogenic Ecotoxicity Evaluation İn Vitro And Its Relation To The Occurrence Of Some Persistent Organic Pollutants İn Water And Sediment Samples Collected From Ankara River. *Toxicology Letters*, 258, 207, Doi: 10.1016/J.Toxlet.2016.06.1754 (Yayın No: 3219762)
4. Özet, Baydan Emine, Kaya Sezai, Çağırğan Haşmet, Yıldırım Ebru, Altıntaş Levent, Yurdakök Dikmen Begüm, Ekici Hüsamettin, Aydın Farah Gönül, Aslı Gul Kucukosmanoglu (2015). Investigation Of Veterinary Drug Residues İn Sea Water Sediment And Wild Fishes Captured Around Fish Farms İn Theaegian Sea Sulfonamides Sulfamerazine Smr Sulfamididine Smt Sulfamethoxazole Smxz Sulfadimethoxine Sdmx. *Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics*(38), 115-116. (Yayın No: 2350253)

VII. Bilimsel Etkinlikler

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Florfenikolün Yumurtaya Geçiş Kinetiğinin Belirlenmesi Ve Yumurtadaki Kalıntıya Yönelik Etkilerin Araştırılması , Diğer, Araştırmacı, 2010-2011)
2. Balık Kafesleri Çevresinden Avlanan Doğal Ortam Balıkları İle Kafes Ve Çevresindeki Su Ve Sedimentin Bazı Veteriner İlaç Kalıntıları Yönünden İncelenmesi, Diğer, Araştırmacı, 2010-2013)
3. Nuclear Pharmacy Integrated Course For Students İn Pharmacy Medicine Medical Physics And Nuclear Chemistry Nuphicos , Diğer, Bursiyer, 2012-2013)
4. Ege Denizinden Yakalanan Doğal Ve Kültür Levrek Ve Çipura Balıklarından İzole Edilen Vibrio Ve Photobacterium Türlerinde Kinolon İle Tetrasiklin Grubu İlaç Direncinin Per Yöntemiyle Araştırılması, Bap, Araştırmacı, 2014 (Devam Ediyor) (Ulusal)
5. Antropojenik Kaynaklı Sucul Toksisitenin Belirlenmesinde Alternatif Ve Yeni Bir Yaklaşım Olarak Plhc 1 Ve Rtg 2 Hücre Hatlarının Kullanılması Ve Cyp1a1 Biyobelirteci İle Birlikte Değerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, , 05/10/2013 - 20/10/2016 (Ulusal)
6. Sağlıklı Ve Lactococcus Garvieae İle Enfekte Alabalık Oncorhynchus Mykiss Walbaum 1792 Ve Kalkan Psetta Maxima Balıklarında Florfenikol Ün Farmakokinetiğinin Ve İn Vivo Etkinliğinin Belirlenmesi, Diğer Kamu Kuruluşları (Yükseköğretim Kurumları Hariç), Araştırmacı, , 01/01/2015 (Devam Ediyor) (Ulusal)

VIII. Diğer

Sertifika

1. İlk Yardım Eğitici Eğitmeni, İlk Yardım Eğitici Eğitmeni, Ankara, Sertifika, 04.04.2015 (Uluslararası)
2. Deney Hayvanları Kullanma Sertifikası. , Deney Hayvanları Kullanma, Ankara Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı, Sertifika, 16.01.2011 (Ulusal)
3. Tehlikeli Madde Güvenlik Danışmanlığı, Karayolu Tehlikeli Madde Güvenlik Danışmanlığı, Ankara, Sertifika, 20.05.2016 (Uluslararası)

Organizasyonlar

Uluslararası Kızılay Kampı,2009

FIBA Dünya Basketbol Şampiyonası,2010

Universiade Erzurum Kış Olimpiyatları (İtalya Baş Ateşeliği),2011

Otizm Vakfı Hareket Eğitimi Projesi,2011