

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EGE BÖLGESİNDEKİ ALABALIK ÇİFTLİKLERİNDEN *Yersinia ruckeri*
İZOLASYONU VE E- TEST YÖNTEMİ İLE DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve Renci

(Y150107005)

Su Ürünleri Anabilim Dalı

Prof.Dr. Tevfik Tansel TANRIKUL

EYLÜL 2018

İKÇÜ, Fen Bilimleri Enstitüsünün Y150107005 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Merve RENCİ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “EGE BÖLGESİNDEKİ ALABALIK ÇİFTLİKLERİNDEN *Yersinia ruckeri* İZOLASYONU VE E-TEST YÖNTEMİ İLE DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. T. Tansel TANRIKUL

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Ramazan SEREZLİ

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Edis KORU

Ege Üniversitesi

Teslim Tarihi : 04.09.2018

Savunma Tarihi : 04.09.2018

Anneme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve ‘EGE BÖLGESİNDEKİ ALABALIK ÇİFTLİKLERİNDEN *Yersinia ruckeri* İZOLASYONU VE E-TEST YÖNTEMİ İLE DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ’ konulu tez çalışmam boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen, laboratuvar denemelerinde her zaman yanımda olan ve sabırla eksik olduğum noktaları öğrenmemi sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. T. Tansel TANRIKUL’a, tez çalışmamı gerçekleştirebilmem için gerekli olan tüm materyalin ve çalışma alanının temin edildiği T.C. İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarının daki herkese teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, yaşamım boyunca hep yanımda olan ve eğitim hayatım boyunca beni destekleyen babam Özkan RENCİ, sevgili kardeşim Ceren RENCİ ve 2014 yılında kaybettiğim ve tezimi kendisine ithaf ettiğim canım annem Nalan RENCİ’ye teşekkür ederim.

Eylül 2018

Merve RENCİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
TABLO LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET	xix
ABSTRACT.....	xxi
1. GİRİŞ	1
2. YERSİNİOSİS	4
2. 1. Etiyoloji	4
2. 2. Klinik Semptomlar Ve Otopsi Bulguları	5
2. 3. Korunma Ve Tedavi	6
3. ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ	8
4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ (ANTİBİYOGRAMLAR)	11
4.1 Tüp Dilüsyon	11
4.2 Agar Dilüsyon	12
4.3 Disk Difüzyon.....	12
4.4 E-Test.....	13
5. MATERYAL VE METOD.....	15
5.1 Bakteri	15
5.2 E-test Ve Disk Difüzyon Diskleri.....	16
5.3 Mueller Hinton Agar.....	17
5.4 Tryptic Soy Agar.....	17
5.5 Tryptic Soy Broth	18
5.6 Yöntem.....	18
5.7 E-Test Yapılışı	21
5.8 Disk Difüzyon Yapılışı	23
6. BULGULAR.....	24
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	27
KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	38

KISALTMALAR

AMC,XL	: Amoksisilin/ Klavulanik asit
AML,AC	: Amoksisilin
AMP,AM	: Ampisilin
CFU	: Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim)
DO,DC	: Doksisiklin
E,EM	: Eritromisin
ENR, EF	: Enrofloksasin
ERM	: Enteric Redmouth Disesases
E test	: Epsilometer test
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
FOS,FM	: Fosfomisin
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
ICAAC	: Antimikrobiyal Ajanlar ve Kemoterapi
MHA	: Mueller- Hinton Agar
mg/kg	: Miligram/ Kilogram
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
MLK	:Minimal Letal Konsantrasyonu
SW	: Shoots- Waltmann
SXT, TS	: Trimetoprim/ Sülfametoksazol
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptone Soy Broth
µm	: Mikro Metre

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 6.1: İzole edilen <i>Y.ruckeri</i> suşlarının lokasyonları.....	24
Tablo 6.2: <i>Y.ruckeri</i> izolatlarının disk difüzyon yöntemine göre duyarlılık değerleri	25
Tablo 6.3: <i>Y.ruckeri</i> izolatlarının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.....	26
Tablo 7.1: Y1 izolatının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.....	30
Tablo 7.2: Y2 izolatının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.....	31
Tablo 7.3: Y3 izolatının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.....	32
Tablo 7.4: Y4 izolatının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.....	32
Tablo 7.5: Y5 izolatının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.....	33

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: <i>Y. ruckeri</i> 'nin Gram boyama sonrası mikroskopta 1000x görüntüsü ..5	
Şekil 4.1: E-test stripinin görüntüsü	14
Şekil 5.1: Koloni oluşturan <i>Y. ruckeri</i>	15
Şekil 5.2: E-test stripleri	16
Şekil 5.3: Disk difüzyon diskleri.....	17
Şekil 5.4: MHA'ın pH değeri.....	19
Şekil 5.5: TSB sıvı besi yerinin pH ölçümü.....	20
Şekil 5.6: TSB içerisindeki bakteri kolonisinin Mc Farland 0.5 standardına göre ayarlanması.....	21
Şekil 5.7: E-test striplerinin yerleştirilmesi.....	22
Şekil 5.8: Striplerin etrafında oluşan zonlara göre MİK değerlerinin belirlenmesi	22
Şekil 5.9: İnkübasyondan sonra disk etrafında oluşan zonlar.....	23
Şekil 5.10: Diskler etrafında oluşan zon çaplarının ölçümü.....	23

EGE BÖLGESİNDEKİ ALABALIK ÇİFTLİKLERİNDEN *Yersinia ruckeri* İZOLASYONU VE E-TEST YÖNTEMİ İLE DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

ÖZET

Yersinia ruckeri'nin neden olduğu yersiniozis, ERM (Enterik Kızıl Ağız Hastalığı) ülkemizde yaygın olarak görülen, *Salmonidae* familyasında akut ve kronik olarak seyir gösteren bir enfeksiyondur. Özellikle gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) duyarlılık gösterdiği bu hastalık yavru alabalıklarda yüksek oranda mortaliteye sebep olmaktadır. Enfeksiyonun tedavisinde, antibiyotiklerin bilinçsiz ve fazla miktarda kullanılması sonucu antibakteriyel direnç gelişir. Bunun sonucunda hastalığın tedavisi ve kontrolü zorlaşır. Hastalıkla mücadelenin gerçekleşmesi için; doğru antibiyotiğin, gerekli miktarda ve hızlı bir şekilde verilmesi gerekir. Bu nedenle uygulaması kolay ve doğru olan test kitlerine ihtiyaç duyulur.

Bu çalışmada Ege Bölgesindeki alabalık çiftliklerinden izole edilen *Yersinia ruckeri*'nin E-test ve disk difüzyon ile antibiyotik duyarlılıkları ve MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyon) değerleri araştırılmıştır. Bu amaçla Ege Bölgesinde bulunan, beş farklı alabalık işletmesindeki hasta balıklardan izole edilen *Y.ruckeri* suşları incelenmiştir. Api 20E test kitleri ile identifiye edilen *Y. ruckeri* suşları; trimetoprim/sülfametoksazol, doksisisiklin, ampisilin, amoksisilin/ klavulanik asit, amoksisilin, eritromisin, enrofloksasin, fosfomisin antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları E-test ve disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Araştırmanın sonucunda E-test ve disk difüzyon yönteminde; trimetoprim/sülfametoksazol, ampisilin, amoksisilin/ klavulanik asit, amoksisilin, fosfomisine karşı tüm suşların duyarlı olduğu tespit edilmekle beraber E-test ile duyarlılığın dereceleri belirlenmiştir. E-test ile MİK değerlerinin tespiti, tedavide kullanılacak antibiyotik dozunun düşük tutulması ve direnç gelişiminin engellenmesi avantajını sunmaktadır.

ISOLATION OF *Yersinia ruckeri* FROM RAINBOW TROUT FARMS IN AEGEAN REGION AND DETERMINATION OF SUSCEPTIBILITY WITH E-TEST METHOD

ABSTRACT

Yersiniosis caused by *Yersinia ruckeri*, ERM (Enteric Red Mouth Disease) is an infectious disease which is common in our country. *Y.ruckeri* is primarily a disease of Salmonids and observed with acute and chronic cases. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is particularly susceptible to this pathogen and it causes high mortality, especially in fingerling size. Antibiotic resistance develops in order to careless and excessive use of antibiotics in the treatment of infection. As a result, it is more difficult to treat and control the disease. The effective antibiotic treatment should be practiced for prevention and control of the disease. For this reason, the test kits are necessary for easy and fast decision.

In this study, antimicrobial susceptibilities and MIC (Minimum Inhibitor Concentration) values of *Y. ruckeri* isolated from trout farms in Aegean Region were investigated. The isolated *Y. ruckeri* strains identified by Api 20E test kits. The sensitivities of *Y.ruckeri* to trimethoprim/ sulfamethoxazole, doxycycline, ampicillin, amoxicillin/ clavulanic acid, amoxicillin, erythromycin, enrofloxacin and fosfomycin antibiotics were determined using E test and disc diffusion method.

As a result of the study, all isolated strains were determined susceptible to trimethoprim/ sulfamethoxazole, ampicillin, amoxicillin/ clavulanic acid, amoxicillin and fosfomycin with both E test and disc diffusion method. Determination of MIC values by E-test offers the advantage of lowering the antibiotic dose to be used in treatment and inhibiting resistance development.

1. GİRİŞ

Yersiniosis ‘Enterik Kızıl Ağız Hastalığı (Enteric Redmouth Diseases- ERM), *Salmonidae* familyasında akut ve kronik olarak seyreden, ülkemizde yaygın olarak görülen bakteriyel bir enfeksiyondur. Hastalığın etkeni *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir bakteri olan *Yersinia ruckeri* (*Y.ruckeri*) dir.

Hastalık ilk kez 1950 yılında ABD’de alabalık çiftliklerinde tespit edilmiştir. Alabalık yetiştiriciliği yapılan pek çok ülkede (Kanada, Fransa, Almanya, Macaristan, Yunanistan, Şili, Venezüella vb.) görüldüğü bildirilmiştir. Yayıldığı ülke sayısı gün geçtikçe artan hastalık Türkiye’de ilk defa 1990 yılında Ege Bölgesi’ndeki bir alabalık çiftliğinden izole edilmiştir [1].

Hastalık enfekte veya taşıyıcı olan balıklar ile temasla, direk su aracılığı ile ya da ördek, kaz, sığan, sucul omurgasızlar ve kerevit gibi canlılardan bulaşabilir. Stres, hastalığın ortaya çıkmasında önemli bir etkidir. Bu sebeple çevresel faktörlerin etkisi büyüktür. Su sıcaklığı, stoklamadaki yoğunluk, su kirliliği, oksijen miktarındaki yetersizlik veya balıklara fiziksel temas gibi faktörler stresin oluşmasına sebep olurlar. Stres faktörlerinin varlığı aynı zamanda hastalığın şiddetini de etkiler. Hastalığın şiddetine etki eden bir diğer etken de balığın yaşıdır. Yavru ve genç balıklarda hastalığın şiddeti, büyük balıklara göre daha yüksektir. Hasta balıklarda egzoftalmus, solungaçlarda solgunluk, dil mukozası, gözlerde peteşi ve hemoraji, deride kararma, karında şişlik ve uyuşukluk belirgin semptomlardır [2]. Özellikle ağız çevresindeki yaralar hastalık için ayırt edici bir bulgudur. Yersiniosis özellikle yavru balıklarda çok sık ortaya çıkan mortalitesi yüksek bir enfeksiyondur. Sıcaklık artışıyla birlikte mortalite oranının da artış görülür. *Yersinia ruckeri*’nin çamurda 2-4 ay canlı kalabildiği ve yıl içerisinde birkaç defa nüks ettiği bilinmektedir.

Y.ruckeri suşlarının 5 farklı serotipi olduğu bildirilmekle birlikte özellikle serotip 1 (Hagerman türü) ve serotip 2 (Big creek) epizootilerden sorumludurlar. Enfeksiyonun periyodik olarak ortaya çıkışı aşılama ve antibiyotik tedavisi ile kontrol edilebilmektedir [3].

Hastalığın tedavisi için çeşitli antibiyotikler kullanılır. Bu antibiyotiklerin fazla miktarlarda kullanılmaları sebebiyle bakteriler antibiyotiğe karşı direnç geliştirir. Bakterilerin direnç kazanması sebebiyle hastalığın tedavisi de antibiyotik kullanımı da başarısızlık ile sonuçlanır. Hastalığın tedavi edilememesi fazla miktarda balık ölümüne neden olmakta ve işletmeler de maddi kayıplara yol açmaktadır. Bu da sektörde önemli ekonomik kayıplara neden olur. Ayrıca aşırı miktarda kullanılan antibiyotikler akuatik sistemde antibakteriyel dirençle ilgili çevresel sorunlara neden olacaktır.

Bu nedenle hastalık etkenlerinin, kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanıp kazanmadığı duyarlılık testleri ile tespit edilir. Duyarlılık tespiti için genel olarak 'Disk difüzyon' yöntemi kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda ortaya çıkan ve yeni bir yöntem olarak kullanılmaya başlanan E-test (BioMerieux, Fransa), gerek pratikliği, gerek uygulama kolaylığı ile duyarlılık tespiti çalışmalarında tercih edilmeye başlanmıştır.

Düşük seviyelerdeki direnç değerlerini ve nadir üreyen mikroorganizmaların direnç seviyelerini belirleyebilmesi, E-test'in önemli avantajları arasındadır. Ayrıca çift taraflı antibiyotik içeren stripler ile aynı anda farklı antibiyotikler kullanılarak MİK değerlerinin tespit edilebilmesi de önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bu yöntemin dezavantajı ise pahalı olmasıdır. [4, 5].

E-test (BioMerieux, Fransa), şerit (strip) şeklinde plastik çubuklardan oluşur. Bu çubukların bir yüzünde antibiyotik diğer yüzünde ise 15 dilüsyonlu konsantrasyon aralığını gösteren rakamlar bulunmaktadır. Antibiyotiklerin, antimikobakteriyel ve antifungal ajanların MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyonu) değerlerinin belirlenmesinde kullanılan E-Test (BioMerieux, Fransa) nadir ve zor üreyen organizmalar dahil bir çok tür için kullanılabilir.

Bakterilerin besiyerine inokülümü gerçekleştirildikten sonra bu stripler yerleştirilir ve MİK değerleri tespit edilir. Bu değerlerin karşılaştırılması ile antibiyotiklere karşı hastalık etkenlerinin direnç kazanıp kazanmadığı tespit edilir.

Balık hastalıkları ile ilgili araştırmalarda E-test (BioMerieux, Fransa) metodunun kullanımını çok yaygın olmasa da, birçok araştırmada kullanıldığı bilinmektedir [3, 6].

Bu çalışmada Ege Bölgesindeki alabalık işletmelerinden izole edilen *Y.ruckeri* suşlarının antibiyotiklere karşı direnç geliştirip geliştirmediği incelendi. E-test ve antibiyogram yapılarak zon çapları ölçüldü ve MİK değerleri hesaplandı. Sonrasında *Y.ruckeri*'nin hangi antibiyotik türüne ne seviyede direnç gösterdiği tespit edilerek ülkemizde yaygın olarak görülen Yersiniosis'in tedavisinde başarı oranının arttırılması amaçlandı.

2. YERSİNİOSİS

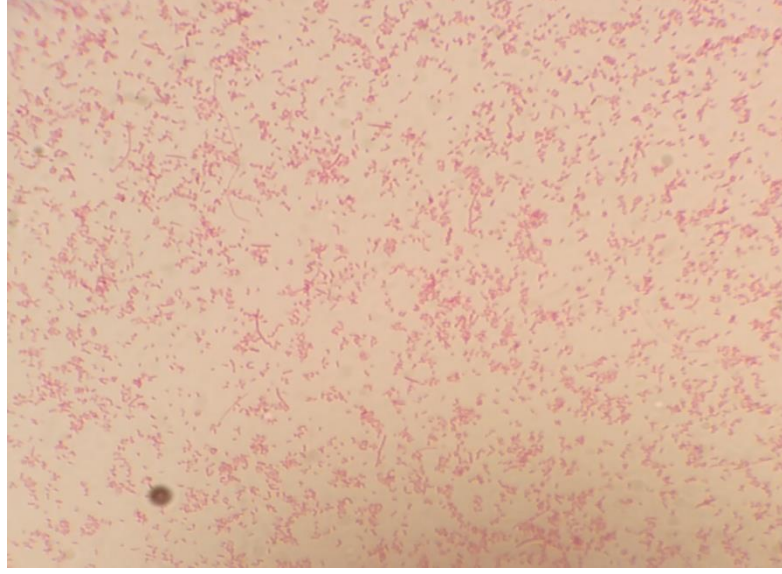
Yersiniosis Salmonidae familyasında akut ve kronik olarak görülebilen yüksek mortaliteye sahip bir bakteriyel hastalıktır. Salmonidler arasında en çok gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) duyarlılık göstermektedir. Özellikle fingerling gökkuşağı alabalıkları hastalıktan ciddi kayıplar vermektedir. Yersiniosis'in alabalık dışında sazan ve yılan balıklarında da görüldüğü bilinmektedir. Bunların dışında deneysel çalışmalar için bazı levrek (*Dicentrarchus labrax*), çipura (*Sparus aurata*) ve kalkan (*Scophthalmus maximus*) balıklarında da enfeksiyon meydana getirilmiştir [7].

İlk defa 1950 yılında ABD' de Hagerman Vadisinde teşhis edilen Yersiniosis günümüzde Avrupa'dan Afrika'ya, Amerika'dan Avustralya'ya kadar birçok ülkede (Kanada, Fransa, Almanya, Macaristan, Yunanistan, Şili, Venezüella vb.) görülmüştür [1, 8].

1966 yılında Rucker tarafından tanımlanan etken, Ewing ve arkadaşlarının yaptığı DNA hibridizasyon çalışmaları ile *Y. ruckeri* olarak adlandırıldı [9, 10]. Hastalık 1975'de American Fisheries Society tarafından ERM adı verildi [8]. Yersiniosis ülkemizde ilk defa 1990 yılında Ege Bölgesindeki bir alabalık çiftliğinden izole edilmiştir [1].

2. 1. Etiyoloji

Yersiniosis'in etkeni olan *Y.ruckeri*, *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir bakteridir. *Y. ruckeri*, Gram (-), Oksidaz (-), Katalaz (+), 0.5- 0.8 µm eninde, 1.0- 1.3 µm boyunda kokbasil veya basil formda aktif hareketli bir bakteridir (Şekil 2.1)



Şekil 2.1: *Y.ruckeri*'nin Gram boyama sonrası mikroskopta 1000x görüntüsü.

37°C'de hareketsiz olduğu hareket muayenelerinde tespit edilmiştir. 21-25°C'de Tryptic Soy Agar (TSA), Shoots- Waltmann (SW) ve Mueller Hinton Agar (MHA) besi yerlerinde 24- 48 saat aralığında 1- 3 mm çaplarında beyaz renkte koloniler verir [1, 11].

Y. ruckeri suşlarının 5 farklı serotipi olduğu bildirilmekle birlikte özellikle serotip 1 (Hagerman türü) ve serotip 2 (Big creek) epizootilerden sorumludurlar. Enfeksiyonun periyodik olarak ortaya çıkışı aşılama ve antibiyotik tedavisi ile kontrol edilebilmektedir [3, 11, 12].

2. 2. Klinik Semptomlar Ve Otopsi Bulguları

Hastalığın en önemli belirtisi ağız çevresinde, yüzgeçlerde, gözlerde, solungaçlarda, anüs ve operkulumda görülen hemorojilerdir. Özellikle de ağız çevresi ve içine doğru yayılan bu hemorojiler hastalığa kızıl ağız adı verilmesine neden olmuştur. Bunun dışında hasta balıklarda; renkte koyulaşma, karında şişlik, karaciğer ve dalakta büyüme, bağırsaklarda sarı renkli sıvı birikimi, iştahın azalması, durgunluk, su yüzeyine yakın yüzme gibi belirtiler görülür [11,13, 14,15]. Otopside iç organlarda, dokularda ve hava kesesinde yine kanamalar gözlenir.

Hastalığın bulaşması taşıyıcı olan balıklar ile temasla direk, su aracılığı ile veya kaz, ördek, sıçan, sucul omurgasızlar ve kerevit gibi canlılar aracılığı ile olur. Hastalığın ortaya çıkmasındaki en önemli etkenlerden biri de strestir [8]. Stres immün sistemini baskıladığı için hastalığın meydana gelmesi kolaylaşır. Çevre şartları aynı zamanda birer stres faktörüdür. Su sıcaklığı, stok yoğunluğu, suda bulunan askı madde miktarı ve kirlilik, pH, oksijen miktarındaki yetersizlik ile usulüne uygun olmayan elleme ve sınıflama balıklarda stresin ortaya çıkmasına neden olur [16]. Hastalığın şiddeti stres faktörlerine, balığın yaşına ve su sıcaklığına bağlı olarak değişebilir.

Fingerling alabalıklar, erişkin olan alabalıklara göre hastalığa karşı daha duyarlıdır ve mortalite oranları daha yüksektir [8]. Su sıcaklığı mortalite oranını etkileyen bir faktördür. Sıcaklık düşük ise inkübasyon süresi uzun olacağı için mortalite miktarı az olacaktır. Mortalite en çok 15-18 °C'de görülür [8, 11].

Hastalık üretim periyodu içerisinde birkaç kez tekrar edebilir. Bunun en önemli nedenlerinden biri hastalık etkeninin çamurda 2 ay kadar canlı kalabilmesidir. Bir diğer neden de salgından kurtulan asemptomatik portör balıklardır [17]. Hasta balıkların dışkıları ile su ortamına yayılan hastalık etkeni sağlıklı balıklara ağız veya derideki portantreler aracılığı ile bulaşmaktadır [18, 19]. Hasta veya portör balıkların sağlıklı balıklar ile ayrılmaması hastalığın yayılmasına ve tekrarlanmasına neden olur.

2. 3. Korunma Ve Tedavi

İşletmeler için ciddi ekonomik kayıplara yol açan yersiniosis' in ortaya çıkmasını engellemek için bazı korunma tedbirlerinin alınması gerekir;

1) Öncelikle işletmede çalışan personelin bilinçli olması ve iyi gözlem yapması gerekmektedir. Davranışlarında farklılık görülen balıkların önceden tespit edilmesi hastalıkların hızlı tespiti için önemli bir adım olacaktır.

2) Hasta olduğundan şüphe duyulan balıklar ya da hasta olan balıkların sağlıklı olan balıklardan ayrılması gerekir.

3) Strese yol açan çevre koşulları optimum seviyede ayarlanmalıdır. (Stok yoğunluğunun yüksek tutulmaması, pH değerlerinin ve oksijen seviyesinin düşmemesi gibi).

4) Hastalık görülmüş ise hasta balıklar tedavi edilmeli ve bu işletmede kullanılan ekipmanlar dezenfekte edilmelidir.

5) Diğer korunma yöntemi de sağlıklı balıkların aşılmasıdır. İmmersiyon, sprey oral veya enjeksiyon yolları ile balıklar üretilen ticari aşılar aracılığıyla hastalığa karşı aşılanarak korunabilir.

Korunma önlemlerine rağmen ortaya çıkan yersiniosis vakaları için antibiyotik ile oral tedavi yapılır. Tedavi için gerekli antibiyotik çeşitleri ve miktarları şöyledir [20].

- Sulfamerazin (200 mg/ kg, 3 gün), takiben Oksitetrasiklin (50 mg/ kg, 3 gün) yeme katılarak.
- Metilen mavisi (1 g/ kg, 5 gün), takiben Oksitetrasiklin (66 mg/ kg,10gün) takiben tekrar aynı dozda Metilen mavisi yeme katılarak.
- Sulfadimetoksim ve Ormetoprim (50 mg/ kg, 5gün)
- Okzolinik asit (10 mg/ kg, 10 gün)
- Tiamulin (5 mg/ kg, 14 gün)

Kemoterapötik maddelerin kullanımı ile hastalığın tedavisi sağlanır ve balık ölümlerinin önüne geçilerek işletmelerin mali açıdan zarara uğraması engellenir. Hastalığın etkeni izole edildikten sonra antibiyogram yapılarak, kullanılması gereken uygun antibiyotik çeşitleri ve dozu belirlenir. Çünkü bilinçsiz bir şekilde kullanılan antibiyotikler hastalık etkeni olan mikroorganizmaların direnç kazanarak, işletmelerin maddi açıdan ekonomik zarara uğramasına, hastalık ile yapılan mücadelenin zorlaşmasına ve akuatik ortamda kirliliğin oluşmasına neden olacaktır.

3. ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ

Enfeksiyon kaynaklı hastalıkların tedavisinde antimikrobiyal (kemoterapötik) maddelerin kullanımının 17.yüzyıla kadar dayandığı bilinmektedir. Bilim insanlarının yaptığı çalışmalar ile yeni ilaçlar geliştirilmiş ve bu maddelerin nasıl etki gösterdikleri hakkında yeni bilgiler elde edilmiştir.

20.yüzyılın başlarında Paul Ehrlich'in ortaya koyduğu 'seçici toksik etki' kavramı ile modern anlamda kemoterapinin temeli atılmış oldu [21]. Seçici toksik etki; kullanılan kemoterapötik maddenin hastalık etkeni mikroorganizmaya zarar verip, kullanan canlıya zarar vermemesi durumudur.

İlk kez Pasteur tarafından tanımlanan antibiyotik terimi; bakteri, mantar, aktinomisetler gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenen veya sentetik olarak hazırlanan, son derece düşük yoğunluklarda bile, bakterilerin gelişmesini engelleyen veya onları öldüren madde olarak tanımlanır [22, 23]. Antibiyotik terimi yaygın olarak, tedavilerde kullanılan tüm kemoterapötik maddeleri ifade eden genel bir kavramdır.

1928'de Alexander Fleming'in penisilini bulması ve 1935'te Domogk'un sülfamidleri bulması ile kemoterapötik maddelerin gelişimi ve tedavilerde kullanılması konusunda büyük bir gelişme sağlandı [24, 25].

Antibakteriyel ilaçların kullanımı yaygınlaştıkça direnç sorunu ortaya çıkmış ve yeni antibakteriyel ilaçların bulunması için çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu bulunan her yeni antibakteriyel ilaç ile birlikte direnç sorunu da artış göstermiştir.

Direnç; uygun dozda antibakteriyel ajan kullanılmasına rağmen, ilaçların öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine bakterilerin karşı koyabilmesi durumudur. İlaçtan etkilenmeyen bu bakterilere de dirençli bakteri denilmektedir.

1940 yıllarında 2. Dünya Savaşı sırasında penisilin enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlandı ve kullanımı yaygınlaştı.

1967 yılında penisiline karşı ilk direnç vakası Avustralya'da *Streptococcus pneumoniae* bakterisinde görüldü 1980'lerde geniş spektrumlu sefalosporinler ve 1990'larda ise florokinolonlar geliştirilmiş olsa da günümüzde bakteriler bu antibiyotiklere karşı da direnç geliştirdiler [26].

Tarım ve hayvancılık alanlarında antibiyotiklerin kullanılması ile birlikte direnç gelişimi daha da hız kazanmaya başladı. Kullanılan ilaçlar toprağa, suya, yer altı sularına, nehirlere ve denize karışabilmekte böylece hem çevresel kirlilik sorununa hem de direnç sorununa yol açmaktadır.

Hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik büyümeyi hızlandırma ve verim artırma amacıyla da kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin gereğinden fazla kullanımı sonucunda bu maddeler hayvanların doku ve organlarında, süt, yumurta gibi hayvansal ürünlerde rezidüye neden olmaktadır. Bu hayvansal ürünler ile beslenen insanlar da aynı şekilde rezidüye maruz kalmakta ve direnç gelişimi meydana gelmektedir. Dirençli suşların gelişmesi nedeniyle antibiyotikler hastalıkların tedavisin de işe yaramaz hale gelir [27].

Balık çiftliklerinde hasta balıkların tedavisinde kullanılan antibakteriyel ilaçların aşırı kullanımı akuatik ortamda kirliliğe yol açar. Kirlilik yayılarak deniz canlılarında biyoakümülyasyona neden olur ve antibakteriyel direnç ortaya çıkar [28]. Bazı çalışmalarda, antibiyotiklerin sucul ortam ve sedimentlerde uzun süreler boyu etkin kaldığı belirlenmiştir [29, 30].

Direnç oluşumu 3 yolla meydana gelebilir,

1) Doğal direnç; bakterilerin kendi özellikleri nedeniyle antibiyotiklere doğal olarak direnç göstermesi durumudur. İlacın kullanılmasıyla veya bakteri genetiği ile ilgisi yoktur. Bakterilerin L formlarında hücre duvarı bulunmadığı için hücre duvarına etki eden penisiline doğal dirençli olması buna bir örnektir.

2) Kazanılmış direnç; genetik kaynaklı dirençtir. Bakterilerin antibiyotik maddeler ile temasa geçmesi sonucu direnç kazanmalarıdır. Bakteri kromozomunda meydana gelen mutasyonlar sonucu veya plazmid ve transpozonlar aracılığı ile bakteri DNA yapısında meydana gelen değişimler ile direnç kazanılır.

3) Çapraz direnç; Belli bir ilaca dirençli olan bakterinin, aynı veya benzer mekanizmaya sahip olan diğer ilaçlara da direnç göstermesi durumudur [31]. Antibiyotik direnci aslında evrimin ve bakteri genetiğinin doğal bir ifadesidir [32]. Çeşitli nedenler ile bakteri genetiğinde meydana gelen değişimler direnç oluşmasına ve dirençli bakterilerin yayılmasına neden olur. Seleksiyon sonucu direnç geliştiren bakteriler ilaçlardan etkilenmeyerek çoğalmaya ve genetik materyallerini aktarmaya devam eder.

Direnç oluşumunu önleyebilmek için enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde;

1) Uygun dozlarda ve tedavide etkili olan antibiyotik kullanılmalı

2) Bilinçsiz antibiyotik kullanımının önüne geçilmeli

3) Direnç sorunu ile karşılaşılan antibiyotikler tedavide kullanılmamalı

4) Geniş spektrumlu antibiyotikler gerekmedikçe kullanılmamalı

5) Hayvan yetiştiriciliğinde verimi arttırmak için yemlerde antibiyotik kullanılmamalı

6) Tedaviye başlamadan önce antibiyotik duyarlılık testleri yapılarak kullanılacak antibiyotik türü belirlenmelidir.

4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ (ANTİBİYOGRAMLAR)

Antibiyotiklerin hastalıkların tedavisinde verimli bir şekilde kullanılabilmesi için enfeksiyon kaynağına etki edecek türde antibiyotiğin uygun dozlarda verilmesi gerekir. Duyarlılık testleri ile tedavide kullanılan antibiyotiğin in-vitro etkinliğinin saptanması amaçlanır. Antimikrobiyal maddenin mikroorganizma üzerindeki etkisi; Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) veya Minimal Lethal Konsantrasyonu (MLK) olarak belirlenerek mikroorganizmanın antimikrobiyal maddeye karşı duyarlı olup olmadığı tespit edilir [33, 34].

Duyarlılık testleri şunlardır;

1) Kantitatif / Dilüsyon Yöntemi

- Tüp Dilüsyon (Makro veya Mikro Dilüsyon)
- Agar Dilüsyon

2) Kalitatif / Difüzyon Yöntemi

- Disk Difüzyon
- E test

4.1 Tüp Dilüsyon

Tüp dilüsyon yöntemi ‘mikro’ ve ‘makro’ olarak ikiye ayrılır. Her iki yöntemde temelde aynı olmakla birlikte makro dilüsyonda tüpler kullanılırken, mikro dilüsyonda mikro plaklar kullanılır. Besi yeri olarak katyon (kalsiyum ve magnezyum) eklenmiş Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır.

Makro dilüsyon; kullanılacak her bir tüpün içine 1ml sıvı besiyeri konulur. Sonra ilk tüpten başlayarak kullanılacak antibiyotiğin iki katlı veya on katlı dilüsyonları yapılır. Yani kademeli bir oranda seyreltilir [35]. Besiyeri içeren bir tüpe ise antibiyotik eklenmez, kontrol grubu olarak kullanılır. Duyarlılığı belirlenecek olan mikroorganizmanın bulanıklığı 0,5 McFarland standardına uygun olacak şekilde inokulumu hazırlanır. Daha sonra bu tüplere duyarlılığı tespit edilecek bakteri süspansiyonundan eşit miktarlarda (5×10^5 CFU/ ml) konulur.

35 °C'de bir gecelik inkübasyondan sonra bakteri üremesi bulanıklık yönünden incelenir [17]. Bulanıklığın olmadığı tüpte bakteri üremesi olmamıştır. Üremenin gerçekleşmediği bu tüpteki antibiyotiğin konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenir.

Mikro dilüsyonda temelde aynı şekilde yapılır. Bu yöntemde küçük kuyucuklardan oluşan mikropaklar kullanılır. Sıvı besi yeri 0,1 ml olacak şekilde her kuyucuğa eklenir ve aynı makro dilüsyon testindeki gibi devam edilir [17].

4.2 Agar Dilüsyon

Tüp dilüsyon ile benzer şekilde gerçekleştirilir. Bu yöntemde sulandırılmış antibiyotikler önce agar içine dökülür daha sonra petri plaklara aktarılır. Her plak antibiyotiğin farklı konsantrasyonlarını içerir. Test için kullanılacak bakteriler 1:10 oranında sulandırılarak 0,5 Mc Farland bulanıklığına göre yoğunlukları ayarlanır (10^7 CFU/ ml). Bu süspansiyon daha sonra pipet aracılığı ile antimikrobiyal madde içeren agara 1-2 ml olacak şekilde inoküle edilir.

İnokülasyonun yapıldığı plaklar $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilir. Üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olacaktır [36].

4.3 Disk Difüzyon

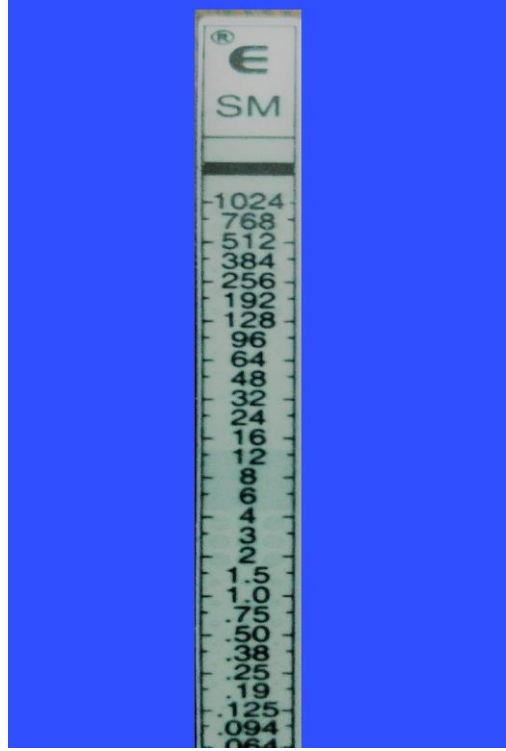
Antibiyotik duyarlılığının tespit edilmesinde ucuz olması ve uygulama kolaylığından dolayı disk difüzyon kullanımı yaygındır. Bu yöntem Kirby-Bauer tarafından geliştirildiği için bu isimle de anılmaktadır. Bu testin prensibi kağıt disklere yedirilmiş olan antibiyotiğin, mikroorganizmanın inoküle edilmiş olduğu besi yerine difüze olması şeklindedir. Antibiyotik içeren diskler mikroorganizmanın bulunduğu besi yerine yerleştirilir. Disklerdeki antibiyotiğin çözünerek agara geçmesi ve mikroorganizmanın üremesi için inkübasyon süresinin tamamlanması beklenir. İnkübasyon süresi geçtikten sonra diskin çevresinde üreme olup olmadığına bakılır. Mikroorganizma eğer ilaca karşı duyarlı ise, disk etrafında inhibisyon zonu oluşur. İnhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülür ve uluslararası duyarlılık tabloları yardımıyla değerlendirilmeleri yapılır.

Bu yöntemde hastalık etkeni mikroorganizma kolonisinden eküvyon yardımıyla alınarak Tryptone Soy Broth (TSB) besi yeri bulunan tüpe eklenir. 18- 24 saat boyunca 37°C’de inkübe edilir. Daha sonra Mc Farland 0,5 (1×10^8 CFU/ ml)’ye göre bulanıklık ayarlanır. Hazırlanan süspansiyondan alınan örnek Mueller- Hinton agar yüzeyine inoküle edilir. Sonra farklı antibiyotikler içeren diskler steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirilir. Zonların üst üste oluşmaması için diskler arasında en az 25-30 mm, petri kenarından ise 15 mm uzaklıkta konulmasına dikkat edilmelidir. Besi yerleri daha sonra 18- 24 saat 35°C’de inkübe edilir ve daha sonra inhibisyon zonları cetvel yardımıyla mm olarak belirlenir [35].

4.4 E-Test

E-test (Epsilometer test), son yıllarda kullanımı yaygınlaşan bir duyarlılık testi yöntemidir. 1950’li yıllarda AB Biodisk’in bilimsel kurucusu mikrobiyoloji profesörü Hans Ericsson tarafından, disk difüzyon yöntemini standartlaştırmak, tekrarlanabilirlik ve güvenilirliği arttırmak amacıyla geliştirildi. Disk difüzyon sonucu oluşan zon boyutları ile agar dilüsyon yöntemine dayanarak bulunan MİK değerleri karşılaştırılmış, zon çaplarının alanları ve MİK değerleri değerlendirilmiştir. Korelasyon ve regresyon analizleri ile yapılan değerlendirmelerin sonucunda, duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak değerlendirilen sonuçlara karşılık gelen MİK sınır değerleri için regresyon çizgileri kullanılmıştır. 1988 yılında Los Angeles’ ta Antimikrobiyal Ajanlar ve Kemoterapi (ICAAC) konulu İnterscience konferansında yeni bir MİK tayini yöntemi olarak sunulmuştur. Ve Eylül 1991’de ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)’dan izin alınarak piyasaya sürülmüştür. Ticari olarak üretimi ilk olarak İsveçli firma AB Biodisk tarafından 1991 yılında gerçekleştirilmiştir. 2008 yılında BioMerieux’un AB Biodiski satın almasıyla E- test üretimini yapmaya başlamıştır [37, 38]. Bu yöntem disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemlerinin bir araya getirilmiş halidir. Plastik çubuklardan (strip) oluşan bu testin bir yüzeyinde artan konsantrasyon aralığına sahip antibiyotik içeriği, diğer tarafında ise bu konsantrasyon aralıklarını gösteren rakamsal değerler bulunur [39]. Stripin tamamı tek bir antibiyotiği içerebileceği gibi iki ucunda da farklı antibiyotikleri içeren çift taraflı versiyonları da bulunur.

Stripin üzerinde E harfinin altında her antibiyotiği simgeleyen harflerden oluşan antibiyotik kodları bulunmaktadır. Kullanımı kolay olan bu yöntem ile hızlı bir şekilde MİK değerleri tespit edilebilmektedir (Şekil 4.1).



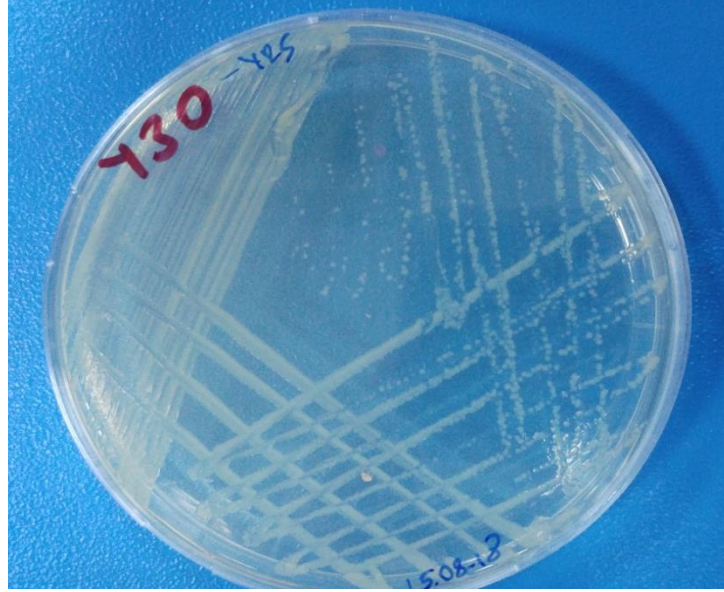
Şekil 4.1: E-test stripinin görüntüsü.

Uygulama için öncelikle -20°C 'de saklanılan E-test stripleri uygulamadan yarım saat önce muhafaza edildikleri soğutucudan çıkarılarak oda sıcaklığına ulaşması sağlanır. Ardından 0,5 Mc Farland standardına uygun şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonları Mueller Hinton Agar'a ekilir. Daha sonra ekim yapılan plaklara E-test stripleri yerleştirilir ve 35°C 'de 18-24 saat inkübasyona bırakılır. Inkübasyon için geçen sürenin sonunda şerit etrafında elips şeklinde bir inhibisyon zonu oluşur. Oluşan bu zonun sribi kestiği noktanın değeri antibiyotiğin MİK değeri olarak kabul edilir. E-test yöntemi, uygulamasının kolay olması, üremesi yavaş ya da zor olan mikroorganizmalar için kullanışlı bir metod olması gibi nedenler ile kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Ancak maliyetinin yüksek olması dezavantajıdır. Sıklıkla tıp alanında *Brucella spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* ve *Candida spp.* türlerinin duyarlılıklarının tespitinde E-test kullanımı yaygındır [40, 41, 42, 43, 44].

5. MATERYAL VE METOD

5.1 Bakteri

Araştırmada kullanılan *Y.ruckeri* suşları alabalık çiftliklerinde ortaya çıkan yersiniosis vakalarından izole edilmiştir. Klinik semptom gösteren hasta balıkların, karaciğer, böbrek ve dalaklarından TSA (Tryptic Soy Agar) ve SW (Shoots-Waltmann) katı besi yerine ekimler yapılarak, 21°C’de 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Besi yerinde üreyen bakteriler Api 20E test kitleri kullanılarak tanımlanmıştır. Antibiyoqram testleri *Y. ruckeri* olarak tanımlanmış edilen suşlardan elde edilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Koloni oluşturan *Y. Ruckeri*.

5.2 E-test Ve Disk Difüzyon Diskleri

Antibiyotik duyarlılık testlerinde,

Trimetoprim/sülfametoksazol (0,002-32 µg/ml), doksisisiklin (0,016-256 µg/ml), ampisilin (0,016-256 µg/ml), amoksisilin/klavulanik asit (0,016-256 µg/ml), amoksisilin (0,016– 256 µg/ml), eritromisin (0,016–256 µg/ml), enrofloksasin (0,02– 32 µg/ml) ve fosfomisin (0,64–1024 µg/ml) antibiyotiklerini içeren E-test (BioMerieux, Fransa) stripleri kullanıldı (Şekil 5.2).



Şekil 5.2: E-test stripleri.

Disk difüzyon yönteminde trimetoprim/ sülfametoksazol (25 µg) doksisisiklin (30 µg), ampisilin (10 µg), amoksisilin/ klavulanik asit (30µg), amoksisilin(10µg), eritromisin (15 µg), enrofloksasin (5µg) ve fosfomisin (50µg) antibiyotik disketleri kullanıldı. E-test ve diskler besi yerine konuluncaya kadar -20°C’de muhafaza edildi (Şekil 5.3).



Şekil 5.3: Disk difüzyon diskleri.

5.3 Mueller Hinton Agar

Antibakteriyel duyarlılığın tespitinde Mueller Hinton Agar (Merc) (MHA) kullanıldı. MHA 100 ml distile suya 3,4 gr katılarak ısı ile eritilerek pH 7.4 (\pm 2) ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Daha sonra 14 cm ölçülü cam petri kutularına her birine 50 ml hacminde dökülerek besi yeri hazırlandı. Hazırlanan MHA besi yerleri antibiyogram testi yapılana kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

5.4 Tryptic Soy Agar

Antibakteriyel duyarlılığın tespiti için Tryptic Soy Agar (Merc) kullanıldı. TSA 200 ml distile suya 8 gr katılıp ısı ile eritilerek pH 7.3 (\pm 2) olacak şekilde ayarlandı. 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Daha sonra 14 cm ölçülerindeki cam petri kutularına TSA besi yerleri antibiyogram testi yapılincaya kadar buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

5.5 Tryptic Soy Broth

MHA besi yerine bakteri inokülasyonunu gerçekleştirmek için Tryptic Soy Broth (TSB) sıvı besi yeri kullanıldı. TSB 100 ml distile suya 3 gr katılarak ısıtılmadan hazırlandı. pH değeri 7.3 (± 2) olacak şekilde ayarlandı ve daha sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilize edilen TSB 5 ml'lik hacimli tüplere konuldu.

5.6 Yöntem

Ege Bölgesindeki alabalık çiftliklerinden izole edilen *Y.ruckeri* örneklerinin antibakteriyel duyarlılıklarının incelenmesi için yaptığımız çalışmada öncelikle laboratuvarımızda bulunan bakteri stoklarının açılması için TSA besi yeri hazırlandı.

Bunun için 40 gr toz maddeye 200 ml distile su ilave edildi ve karıştırılarak kaynatıldı. Kaynatılıp berrak bir hale gelen besi yeri soğutulurak pH metre ile ölçülerek pH'ı 7.3 olarak ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra tekrar soğutulurak petri kaplarına döküldü ve donması beklenildi.

Duyarlılık tespiti için MHA hazırlandı. 100 ml besi yeri hazırlayabilmek için hassas terazide 3.4 gr toz besi yeri tartıldı.

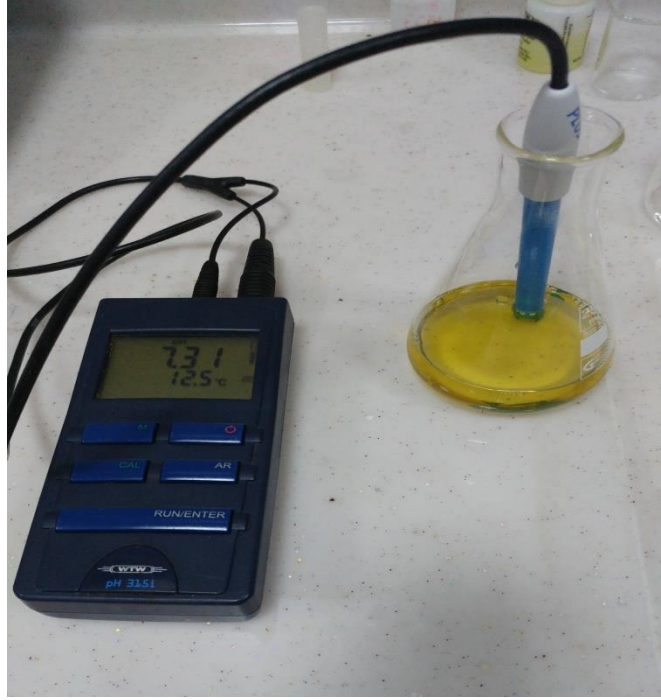
Ölçüm yapıldıktan sonra toz halindeki besi yeri erlene dökülüp 100 ml distile su ilave edilerek alevde kaynatıldı. Rengi berrak bir hale gelmesinin ardından kaynamış olan besi yeri soğumaya bırakıldı. Soğuma gerçekleştikten sonra pH metre ile pH ölçümü gerçekleştirildi. Gerekli pH değeri 7.4 olarak ayarlanmasından sonra erlen'in ağzı pamuk veya alüminyum folyo yardımıyla kapatılarak otoklavda sterilize edildi (Şekil 5.4).



Şekil 5.4: MHA'ın pH değeri.

Sterilizasyonu yapılmış olan sıvı halindeki karışım petri kaplarına dökülerek donması sağlandı ve ardından buzdolabına konularak kullanılıncaya kadar muhafaza edildi. Önceden hazırlamış olduğumuz TSA besi yerine laboratuvarımızdaki stoklardan ekim yaparak üremeleri sağlandı. 24 saat içerisinde üreme gösteren bakterileri kolonilerinden öze ile alarak tüp içerisindeki % 8'lik Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) içerisine daldırdık. Karışması için tüp vortex ile veya el ile karıştırılarak bulanıklığı ayarlanıldı. Koloni alımı FTS bulanıklığının Mc Farland standardına uygun 0.5 (1×10^8 CFU/ml) hale gelene kadar devam etti. Bulanıklığı ayarlanılan bakteri süspansiyonu cam petri içerisinde hazırlanmış MHA üzerine dökülerek süspansiyonun besi yerine yayılması sağlandı. Yayma işleminden sonra petri kapları kurumaları için 10-15 dk ağzı açık bir şekilde bekletildi. Kuruma işlemi sürerken E-test ve disk difüzyon diskleri dondurucudan çıkarıldı. Kuruma gerçekleştiikten sonra disk ve stripler pens yardımı ile cam petrilerdeki MHA üzerine yerleştirildi ve inkübasyon süresi beklenildi.

Yaptığımız çalışmada FTS ile hazırladığımız bakteri süspansiyonunun MHA homojen yayılımı iyi gerçekleşmediği için çalışmamıza TSB sıvı besi yeri ile devam edildi. 100 ml distile suya 3 gr toz besi yeri ilave edip homojen bir şekilde, kaynatmadan karıştırıldı. pH 7.3 olarak ayarlandı (Şekil 5.5).



Şekil 5.5: TSB sıvı besi yerinin pH ölçümü.

Daha sonra 5ml'lik cam pipet ile küçük cam tüplere TSB konulup tüplerin ağzlarını pamuk ile tıkararak otoklavda sterilize edildi. Sterilizasyon işleminden sonra TSA besi yerinde üremiş olan bakteri kolonisinden öze yardımıyla alınıp 5 ml'lik tüp içindeki TSB'a ekildi. Bulanıklık bakteri süspansiyonu Mc Farland 0.5 (1×10^8 CFU/ml) standardına ayarlandı (Şekil 5.6) ve 1 saat süre ile inkübe edildi.

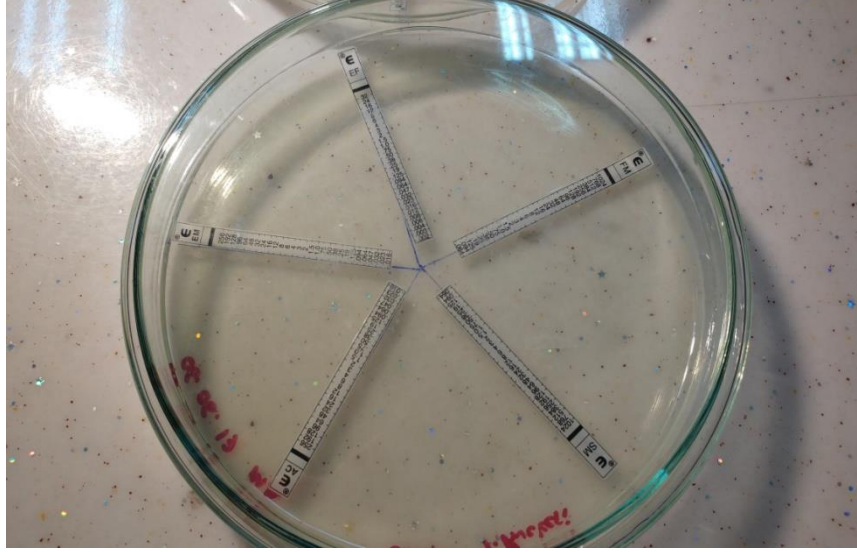


Şekil 5.6: TSB içerisindeki bakteri kolonisinin Mc Farland 0.5 standartına göre ayarlanması.

1 saat sonra bakteri süspansiyonu cam petri içerisinde hazırlanmış MHA üzerine dökülerek süspansiyonun besi yerine yayılması sağlandı ve kuruduktan sonra E-test stripleri ve diskler pens ile yerleştirildi.

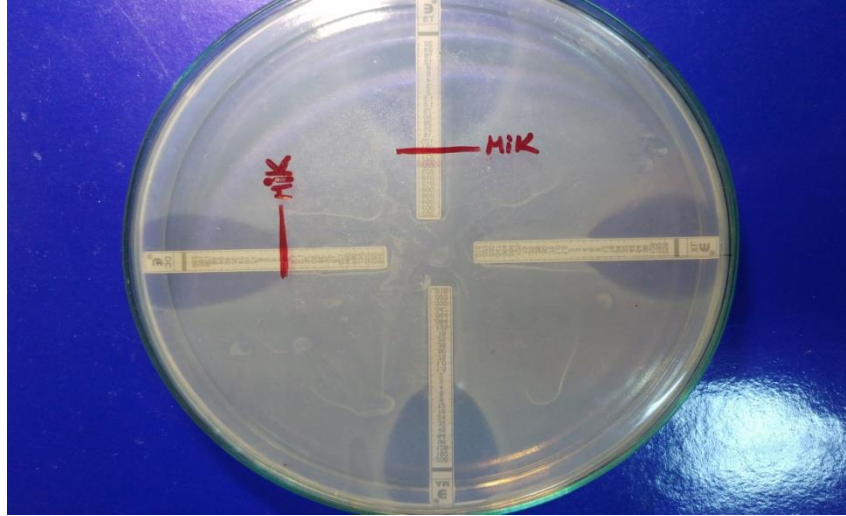
5.7. E-Test Yapılışı

Dondurucuda -20°C 'de saklanan E-test stripleri çıkarılarak oda sıcaklığında bekletildi. Isınan stripler, 10 ml metanol içine batırılıp sonra alevden geçirilen pens aracılığı ile MHA bulunan cam petrilere simetrik bir şekilde yerleştirildi. Stripler yerleştirildikten sonra 35°C 'de 18 – 24 saat inkübe edildi (Şekil 5.7).



Şekil 5.7: E-test striplerinin yerleştirilmesi.

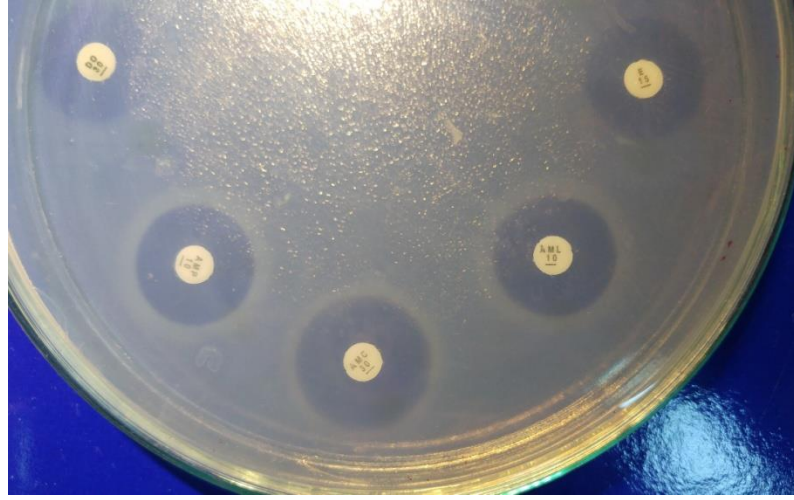
İnkübe edilen stripler etrafında oluşan simetrik inhibisyon zonlarına göre MİK değerleri belirlendi (Şekil 5.8).



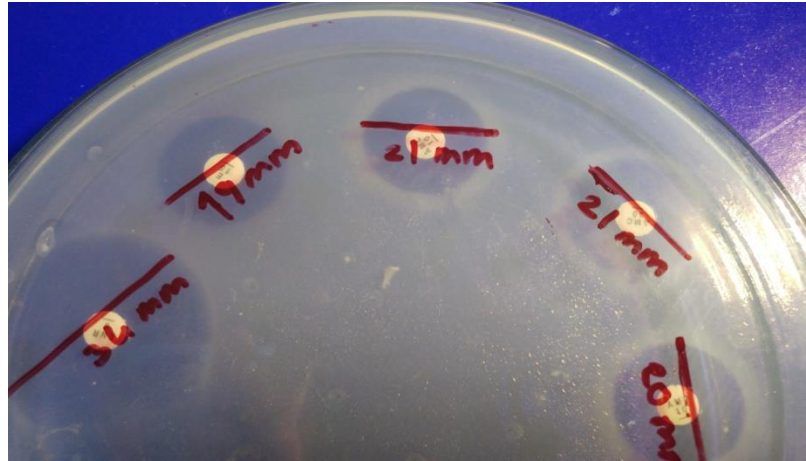
Şekil 5.8: Striplerin etrafında oluşan zonlara göre MİK değerlerinin belirlenmesi.

5.8 Disk Difüzyon Yapılışı

Dondurucuda $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen antibiyotik içeren diskler oda sıcaklığında bekletilip ısınmaları sağlandı. Daha sonra methanole batırılıp alevden geçirilen pens yardımıyla MHA besi yeri bulunan cam petri içerisine yerleştirilip 18-24 saatlik inkübasyon süresi beklenildi (Şekil 5.9). Bu sürenin sonun da disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları cetvel ile ölçülerek MİK değerleri belirlendi (Şekil 5.10).



Şekil 5.9: İnkübasyondan sonra disk etrafında oluşan zonlar.



Şekil 5.10: Diskler etrafında oluşan zon çaplarının ölçümü.

6. BULGULAR

Beş farklı alabalık çiftliğindeki yersiniozis vakalarından izole edilen *Y.ruckeri* suşları saflaştırıldıktan sonra identifiye edilen bakteriler antibiyogram testine tabi tutulmak için buzdolabında stoklandı. (Tablo 6.1).

Tablo 6.1: İzole edilen *Y.ruckeri* suşlarının lokasyonları.

İZOLE EDİLEN SUŞ	BÖLGE
Y1	Muğla\Fethiye
Y2	Muğla\Fethiye
Y3	Muğla\Fethiye
Y4	Muğla\Fethiye
Y5	Kütahya

Bu suşlardan daha sonra disk difüzyon yöntemi ve E-test yöntemi kullanılarak antibiyotiklere karşı olan duyarlılıkları belirlendi [9].

Disk difüzyon çapları, Trimetoprim/ sülfametoksazol (SXT) 31- 36 mm, doksisiklin (DO) 18-21 mm, ampisilin (AMP) 19- 21 mm, amoksisilin/ klavulanik asit (AMC) 20- 25 mm, amoksisilin (AML) 20-22 mm, eritromisin (E) 18- 21 mm, enrofloksasin (ENR) 30-34 mm, fosfomisin (FOS) 33-45 mm aralığında belirlendi.

E-test MİK değerleri, Trimetoprim/ sülfametoksazol (TS) 0,016-0,094 µg/ml, doksisiklin (DC) 1,0- 3 µg/ml, ampisilin (AM) 1,5- 3 µg/ml, amoksisilin/ klavulanik asit (XL) 1,5- 4 µg/ml, amoksisilin (AC) 1,5-4 µg/ml, eritromisin (EM) 1,5- 6 µg/ml, enrofloksasin (EF) 0,19 - 0,38µg/ml, fosfomisin (FM) 0,50-1,5 µg/ml.

İnhibisyon zonlarının çapları ve MİK değerleri belirlendikten sonra duyarlılık durumlarının tespit edilmesi için European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Komitesi sınır değer tablosu 2018 sürümü kullanıldı.

Bu tabloda belirtilen antibiyotik duyarlılık değerlerine göre karşılaştırılarak beş farklı işletmeden alınmış olan örneklerin sekiz farklı antibiyotik ile yapılan duyarlılık testleri şu şekilde yorumlandı (Tablo 6.2), (Tablo 6.3).

Tablo 6.2: *Y.ruckeri* izolatlarının Disk difüzyon yöntemine göre duyarlılık değerleri.

<i>Y.ruckeri</i> izolatları.	SXT (25 µg)	DO (30 µg)	AMP (10 µg)	AMC (30 µg)	AML (10 µg)	E (15 µg)	ENR (5 µg)	FOS (50 µg)
Y1	32 mm	18mm	19 mm	20 mm	20 mm	19 mm	30 mm	35 mm
Y2	32 mm	18 mm	19 mm	20 mm	20 mm	19 mm	30 mm	40 mm
Y3	35 mm	18 mm	20 mm	25 mm	22 mm	21 mm	30 mm	33 mm
Y4	36 mm	21 mm	21 mm	25 mm	21 mm	18 mm	32 mm	33 mm
Y5	31 mm	20 mm	20 mm	21 mm	21 mm	19 mm	34 mm	45 mm

EUCAST'a göre, Duyarlı


Sınır değer yok. Duyarlılığın test edilmesi önerilmemektedir.


Tabloda bulunmamaktadır.

Tablo 6.3: *Y.ruckeri* izolatlarının E-test'e göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.

<i>Y.ruckeri</i> izolatları.	TS (0,002- 32 µg/ml)	DC (0,016- 256 µg/ml)	AM (0,016- 256 µg/ml)	XL (0,016- 256 µg/ml)	AC (0,016- 256 µg/ml)	EM (0,016- 256 µg/ml)	EF (0,02- 32 µg/ml)	FM (0,64- 1024 µg/ml)
Y1	0,047	1,5	1,5	1,5	3	6	0,38	0,50
Y2	0,047	1,5	1,5	2	1,5	1,5	0,19	0,50
Y3	0,016	1,0	1,5	2	3	2	0,19	1,5
Y4	0,064	3	3	4	4	6	0,25	1,0
Y5	0,094	2	3	4	3	4	0,25	0,75

EUCAST'a göre,  Duyarlı.

 Sınır değer yok. Duyarlılığın test edilmesi önerilmemektedir.

 Tabloda bulunmamaktadır.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Salmonidae familyasında akut ve kronik olarak seyir gösteren Yersiniosis, ülkemizde yaygın olarak görülen, etkeni *Y.ruckeri* olan bakteriyel bir enfeksiyondur. Salmonidler arasında en çok gökkuşuğu alabalığı'nın (*Oncorhynchus mykiss*) duyarlılık gösterdiği bilinen yersiniosis'in özellikle genç gökkuşuğu alabalıklarında ciddi boyutta mortaliteye sebebiyet verdiği bilinmektedir. Hastalık tedavisinde çok sayıda antibiyotik kullanılmaktadır. Kemoterapötiklerin antibiyogram testi yapılmadan tedavide kullanılması hastalık ile mücadele de başarı sağlamamakla birlikte antibakteriyel direnci de olumsuz bir faktör olarak beraberinde getirmektedir. Direnç gelişmesi durumunda bakteriye karşı etkisiz antibiyotikler ile tedavi yapılamamakta ve kayıplar devam etmektedir. Mortalitenin işletmelerde artması ekonomik olarak kayıplara neden olduğu gibi hastalığın yayılması da devam etmektedir.

Hastalığın tedavi edilebilmesi, mortalitenin önlenmesi, işletmelerin ekonomik açıdan zarara uğramaması ve su ürünleri sektörünün zarar görmemesi açısından bilinçli antibiyotik kullanımı ciddi önem arz etmektedir. Ayrıca gereksiz antibiyotik kullanımı akuatik çevrede ve tüm doğada kimyasal kirliliğe neden olmaktadır. Bu nedenle hastalıkların tedavisinde kullanılan kemoterapötik maddelerin bilinçli kullanılması önemlidir. Bilinçli kullanımın önemli olduğu kadar direnç durumunun da takip edilmesi gereklidir. Hastalık ile mücadelede duyarlı antibiyotiklerin belirlenerek tedavide kullanılması önemlidir. Çünkü tedavinin başarılı olabilmesi için uygun kemoterapötik maddenin, uygun dozlarda ve uygun zaman aralığında verilmesi gerekir.

Kemoterapötiklere karşı duyarlılığın belirlenmesinde yaygın olarak disk difüzyon testi kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda MİK değerlerini de belirleyen Epsilometer Test olarak bilinen E-test yöntemi de kullanılmaya başlanmıştır. Disk difüzyon yöntemi, ucuz olması nedeniyle çalışmalarda çok fazla tercih edilse de, E-test uygulama kolaylığı, hızlı sonuç vermesi ve üremesi ağır veya zor olan mikroorganizmalar için daha hassas direnç tespiti yapabilmesi nedeniyle tercih edilmektedir [36].

Ayrıca E-test ile tespit edilen MİK değerleri ile net bir konsantrasyon düzeyi belirlenmektedir. Bu da tedavi için kullanılacak antibiyotiğin türünü belirlememizde bize yardımcı olacaktır. E-test genel olarak insanlardan izole edilen mikroorganizmalar için yapılan duyarlılık çalışmalarında kullanılmakla beraber bakteriyel balık patojenleri için nadir olarak kullanılmaktadır.

Lactococcus garvieae suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi çalışmasında gökkuşağı alabalığından izole edilmiş olan suşların duyarlılıkları disk difüzyon ve E-test (BioMerieux, Fransa) kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda suşların hepsinin eritromisine duyarlı olduğu görülmüştür [45].

Gökkuşağı alabalığından (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) izole edilen patojenik bakterilerin in-vitro antibiyotik duyarlılıkları çalışmasında *Yersinia ruckeri*, *Enterococcus seriolicida*, *Aeromonas salmonicida* bakterilerine ait olan suşlar için E-test ve agar dilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. Araştırmada siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin ve eritromisin'e ait MİK değerleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan E-test ve agar dilüsyon yöntemleri sonucunda tüm izolatların %100'nün siprofloksasine duyarlı olduğu saptanmıştır [6].

Şilideki çiftlik atlantik somonu *Salmo salar*'dan izole edilen *Y. ruckeri* suşları arasında serolojik ve moleküler heterojenite çalışmasında trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin, oksitetrasiklin, ampisilin ve enrofloksasin için MİK değerlerinin belirlenmesinde E-test (BioMerieux, Fransa) ve disk difüzyon yöntemleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda her iki duyarlılık metodu da trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin, oksitetrasiklin, ampisilin ve enrofloksasin için yüksek duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir [3].

Bu çalışmada Ege Bölgesindeki alabalık işletmelerinden alınmış örnekleri inceleyerek, *Y.ruckeri*'nin antibiyotiklere karşı direnç geliştirip geliştirmediğini E-test ve disk difüzyon testi yaparak tespit ettik. Çalışmada E-test kullanarak; uygulama kolaylığı, MİK değerlerinin belirlenmesindeki rahatlığı ve üremesi zor mikroorganizmaların tedavisi için gereken konsantrasyon değerlerinin belirlenebilmesi gibi özellikleri nedeniyle, geleneksel bir yöntem olan disk difüzyon gibi kullanılabilir bir metod olduğunu göstermeyi amaçlanmıştır.

Bu araştırmada beş farklı alabalık işletmesinden izole edilen *Y.ruckeri* suşlarının belirlenen antibiyotiklere karşı duyarlılıkları tespit edilmiştir. Trimetoprim/sulfametoksazol, doksisisiklin, ampisilin, amoksisilin/ klavulanik asit, amoksisilin, eritromisin, enrofloksasin, fosfomisine karşı duyarlılığın belirlenmesinde Disk difüzyon ve E-test birlikte kullanılmıştır. Test sonuçları EUCAST 2018 sınır değer tablosuna göre yorumlanmıştır.

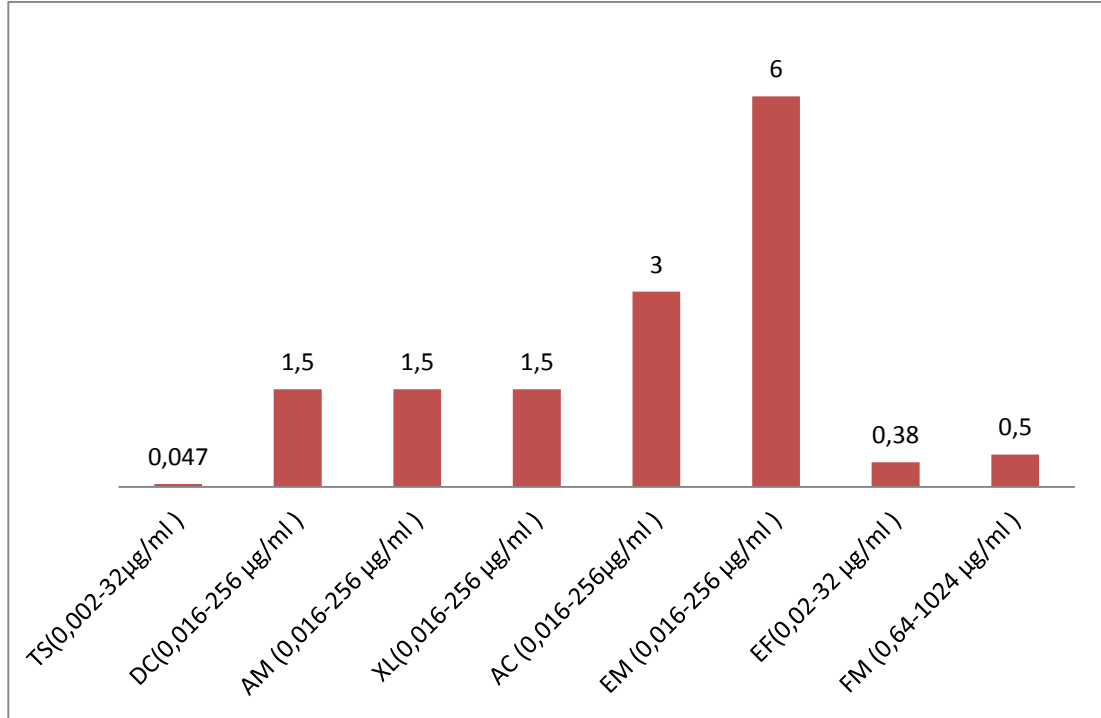
Yapılan araştırma sonucunda, disk difüzyon yönteminde trimetoprim/sulfametoksazol, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, amoksisilin ve fosfomisine karşı tüm izolatların %100 (5/5) duyarlı olduğunu belirlenmiştir [42]. Doksisisiklin ve eritromisin ise EUCAST tablosunda sınır değerleri olmadığı ve bu nedenle duyarlılık testi önerilmediği için değerlendirmeye alınmamıştır. Enrofloksasin ise EUCAST tablosunda olmadığı için yorumlanmamış ve değerlendirmeye alınmamıştır. E-test yönteminde de, trimetoprim/sulfametoksazol, ampisilin, amoksisilin/ klavulanik asit, amoksisilin, fosfomisin'e karşı tüm izolatların %100 (5\5) duyarlı olduğu belirlenmiştir. Doksisisiklin ve eritromisin ise EUCAST tablosunda sınır değerleri olmadığı ve bu nedenle duyarlılık testi önerilmediği için değerlendirmeye alınmamıştır. Enrofloksasin ise EUCAST tablosunda olmadığı için yorumlanmamış ve değerlendirmeye alınmamıştır [42].

Disk difüzyon yöntemi ile Y1, Y2 ve Y5 izolatları, fosfomisine karşı yüksek duyarlılık gösterir iken, Y3 ve Y4 izolatları en çok trimetoprim/sulfametoksazole karşı duyarlılık göstermiştir. Y1, Y2, Y3 ve Y5 izolatları antibiyotikler içerisinde en az duyarlılığı ampisiline gösterir iken, Y4 ampisilin ve amoksisiline karşı daha az duyarlılık göstermiştir.

E-test yönteminde ise Y1 ve Y3 izolatları en az amoksisiline karşı duyarlılık gösterirken, Y2 ve Y5 en az amoksisilin/klavulanik asite karşı duyarlılık göstermiştir. Y4 izolatında ise hem amoksisiline hem de amoksisilin/klavulanik asit'e karşı duyarlılık azdır. Antibiyotiklerin içerisinde trimetoprim/sulfametoksazol, tüm izolatların en etkin antibiyotik olarak tespit edilmiştir [42].

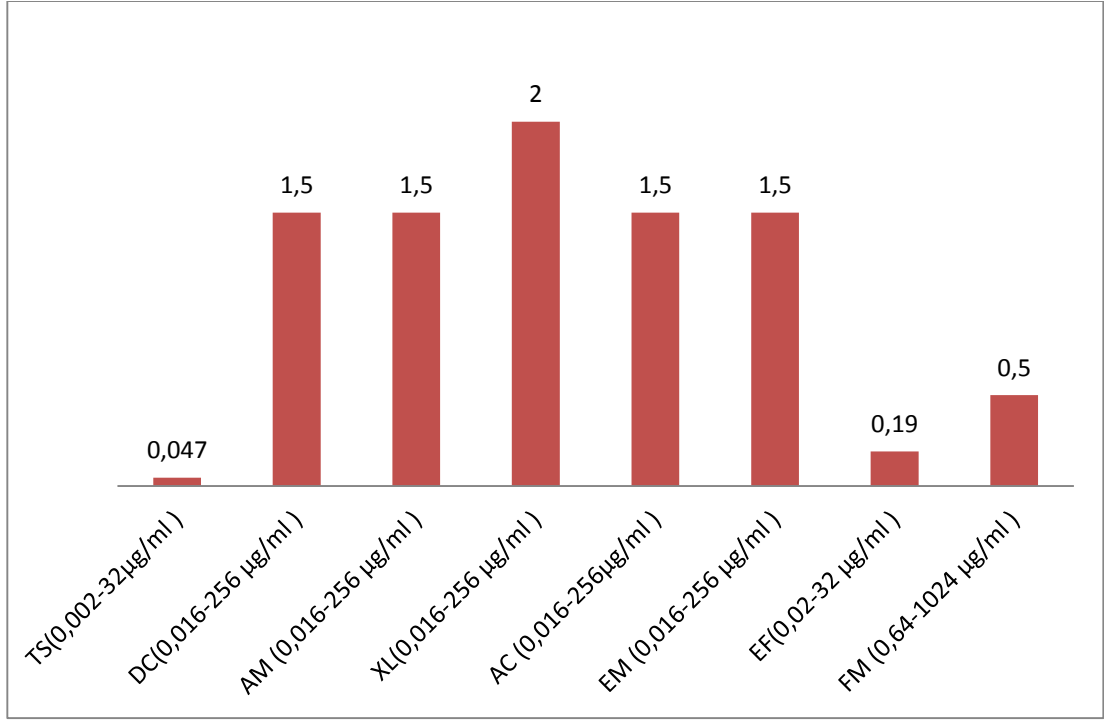
Y1 disk difüzyonda en fazla fosfomisine duyarlılık göstermiştir. E-test yönteminde ise en fazla trimetoprim/sülfametoksazole karşı duyarlılık gösterirken en az amoksisiline karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. (Tablo 7.1). Eritromisin EUCAST tablosunda sınır değeri belirtilmediği için dikkate alınmamıştır.

Tablo 7.1: Y1 izolatının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.



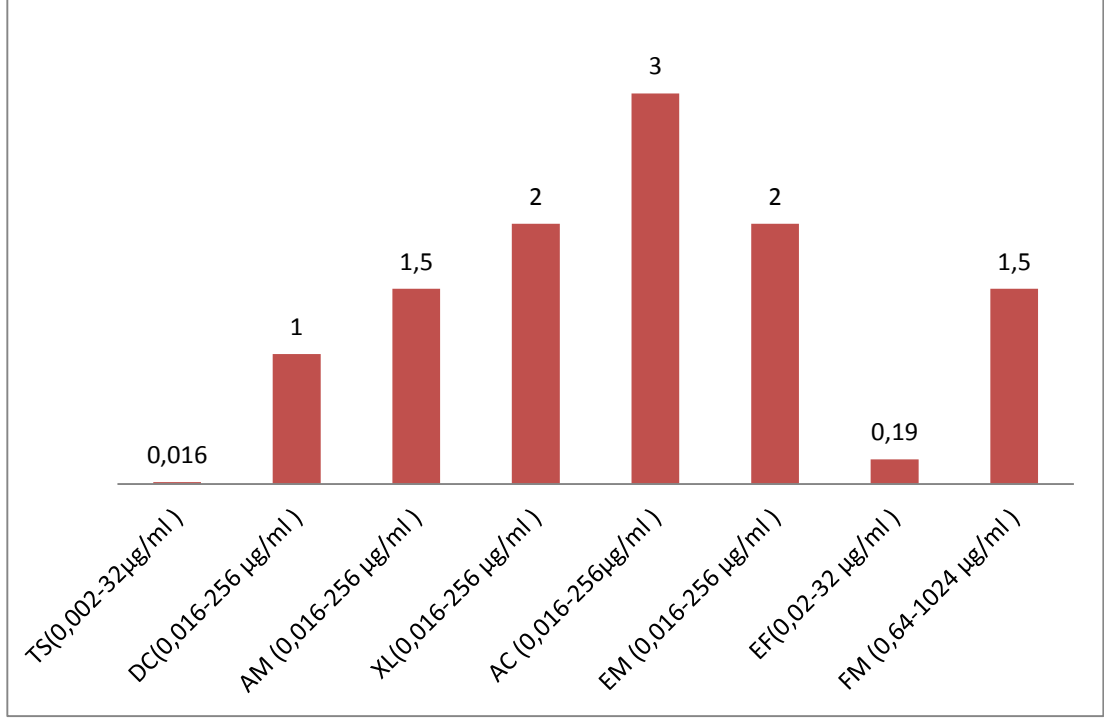
Y2 disk difüzyonda en fazla fosfomisine karşı duyarlı iken, E-testte en fazla trimetoprim/sülfametoksazole, en az amoksisilin/klavulanik asite karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 7.2).

Tablo 7.2: Y2 izolatının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.

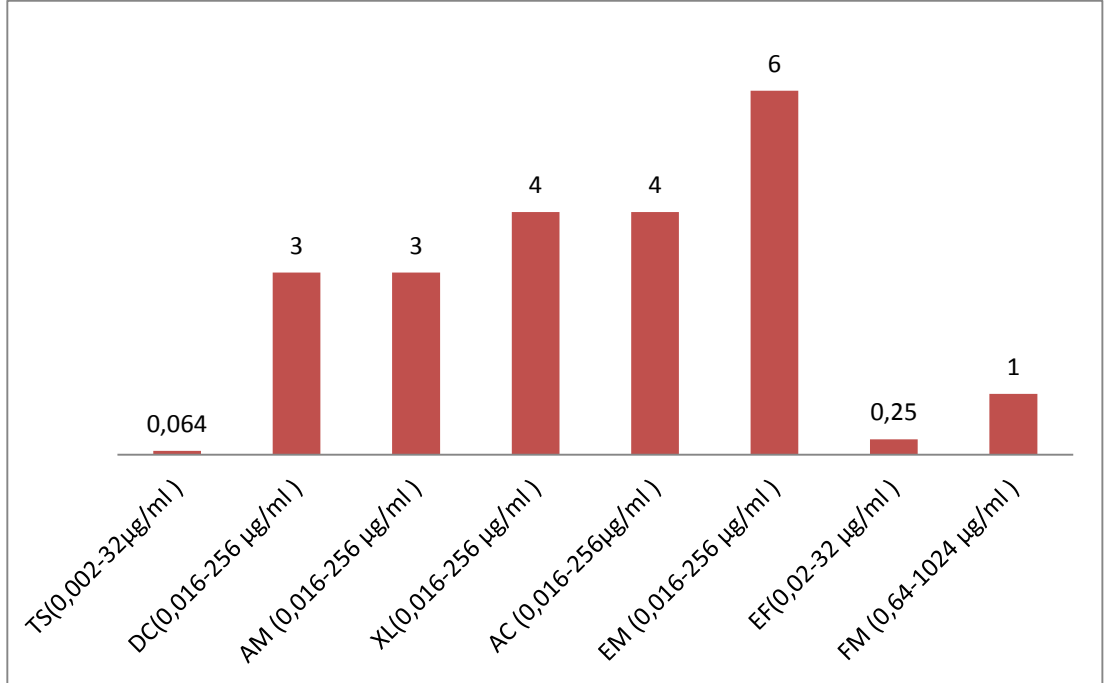


Y3 ve Y4 izolatları hem disk difüzyonda hem de E-testte en çok trimetoprim/ sülfametoksazole karşı duyarlıdır. Y3 disk difüzyonda en az ampisiline karşı duyarlı iken, E-testte en az amoksisiline karşı duyarlıdır (Tablo 7.3). Y4 ise disk difüzyonda en az amoksisilin ve ampisiline karşı duyarlı iken, E-testte amoksisilin ve amoksisilin/ klavulanik asite karşı duyarlılığı azdır (Tablo 7.4).

Tablo 7.3: Y3 izolatının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.

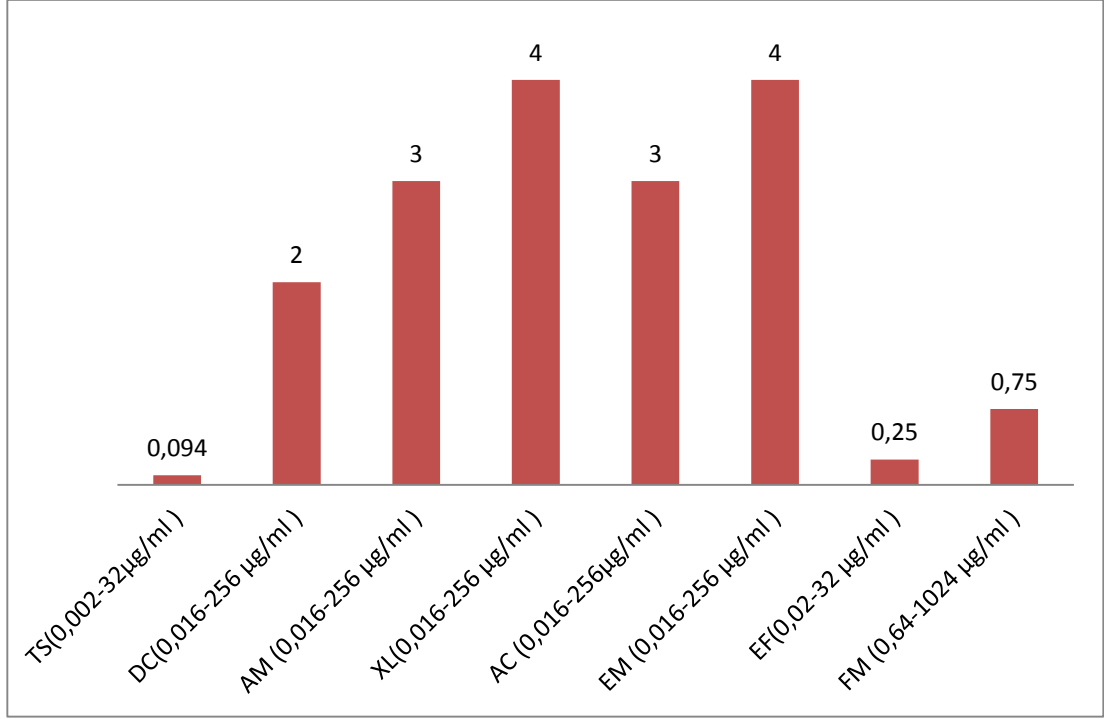


Tablo 7.4: Y4 izolatının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.



Y5 izolatu için disk difüzyonda en fazla duyarlılık Fosfomisine karşı tespit edilmiştir. E-testte ise en çok Trimetoprim/ Sülfametoksazole karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 7.5).

Tablo 7.5: Y5 izolatının E-teste göre duyarlılıkları ve MİK değerleri.



Ayrıca teste tabi tutulan bakteriler disk difüzyon testine göre, zon çapları Y1 (35 mm), Y2 (40 mm) ve Y5 (45 mm) olan izolatlar Fosfomisine, Y3 (35 mm) ve Y4 (36 mm) zon çapları ile Trimetoprim/Sülfametoksazole yüksek duyarlılık göstermiştir. E-test sonuçlarına göre ise, Y1 (0,047 µg/ml), Y2 (0,047 µg/ml), Y3 (0,016 µg/ml), Y4 (0,064 µg/ml), Y5 (0,094 µg/ml) izolatlarının MİK değerleri ile en çok Trimetoprim/ Sülfametoksazol' e karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Ege Bölgesindeki beş farklı alabalık işletmesindeki hasta balıklardan izole edilen *Y.ruckeri* suşlarının sekiz farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları E-test ve disk difüzyon yöntemleri ile belirlenmiştir. Çalışmada gökkuşacağı alabalığından (*Oncorhynchus mykiss*) izole edilen *Y.ruckeri* suşlarının E-test ile MİK değerleri saptanmış ve EUCAST tablosu ile antibiyotiklere karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. *Enterobacteriaceae spp.* grubu için belirtilen değerler referans alınarak, *Y.ruckeri* suşlarının kullanılan antibiyotiklere duyarlı olup olmadığı saptanmıştır. Alabalık çiftliklerinde yersiniosisden kaynaklanan kayıpların azaltılmasında ve antibiyotiklere karşı duyarlılığın tespitinde MİK değerlerinin kolay ve hızlı belirlenebilmesi önemlidir. Çiftliklerdeki hastalık vakalarından izole edilen *Y.ruckeri* suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının daha hassas ve doğru tespit edilebilmesi, E-testlerin kullanılması ile gerçekleştirilmiş olur. Bunun sonucunda *Y.ruckeri* suşlarının hastalık tedavisinde kullanılacak kemoterapötiklere karşı duyarlılıkları belirlenip MİK değerleri tespit edilerek antibiyotik dozunun düşük tutulması ve antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin engellenmesi sağlanır.

KAYNAKLAR

- [1] Çağırğan, H., Yürekli Türk, O. (1991). First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout farm in Turkey, In: The Fifth Conference of EAAP, Disease of Fish and Shellfish, 131.
- [2] Carson, J., Wilson, T. (2002). Yersiniosis in fish, Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures, 1–12.
- [3] Bastardo, A., Bohle, H., Ravelo, C., Toranzo, A. E., Romalde, J. L. (2011). Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile, Disease of aquatic organisms, 93: 207- 214.
- [4] Altay, G. (2008). Kültür pozitif 70 bruselloz hastasının klinik ve laboratuvar verilerinin değerlendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının E test yöntemi ile incelenmesi (Uzmanlık tezi). TC. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği. www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/enfeksiyon/dr_gulustan_altay.pdf
- [5] Öcal, D. (2012). Gram Negatif Bakterilerde Antibakteriyal Direncin Fenotipik Yöntemler İle Tayin Ve Bildirimi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKEM Derg. 26 (3): 154- 164.
- [6] Kırkan, Ş., Göksoy, E. Ö., Kaya, O., Tekbıyık, S. (2006). İn-vitro antimicrobial susceptibility of pathogenic bacteria in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), Turk, J. Vet. Anim. Sci., 30: 337- 341.
- [7] Vigneulle, M. (1990). Susceptibility of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and turbot, *Scophthalmus maximus*, to *Yersinia ruckeri*, Percins, O. And Cheng, T.C. (ed.), Pathology in Marine Science, Academic Press.Inc, San Diego, Newyork, 117-122.
- [8] Çağırğan, H. (1995). Ege Bölgesinde görülen Yersinioz vakaları ve tedavisi. Doğu Anadolu Bölgesi II. Su Ürünleri Sempozyumu, 14- 16 Haziran, Erzurum, www.akuademi.net
- [9] Ewing, W.H., Roos, A.J., Fahne, G.R. (1978). *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth bacterium, Int. Syst. Bacteriol. 28: 37–44.
- [10] Rucker, R. (1966). Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Bull. Off. Int.Epi.65: 825–830.
- [11] Busch R.A. (1978). Enteric redmouth disease (Hagerman strain), Mar. Fish. Rev. 40 (3), 42–51.
- [12] Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium. Journal of Fish Diseases, 30: 257- 268.
- [13] Arda, M., Seçer, S., Sarıyüpoğlu, M. (2002). Balık Hastalıkları, Medisan Yayın Serisi, Ankara 56: 60– 61.
- [14] Balta, F., Balta, Z. D., Özgümüş, O. B., Çağırğan, H. (2016). Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Çiftliklerinde *Yersinia ruckeri*'nin Portörlük Yönünden Tetkiki ve Antimikrobiyal Direncin Tespiti. Journal of Anatolian Environment & Sciences, 3: 72- 76.

- [15] Üstünakın, K., Durmaz, Y., Gürcan, Ö. C. (2015). Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi Gökkuşluğu Alabalığı Çiftliklerinde *Yersinia ruckeri* İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Belirlenmesi. Yunus Araştırma Bülteni (1): 59- 65.
- [16] Türk, N. (2009). Kızıl Ağız Hastalığı (Yersiniozis), Makaleler, Bornova Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü, <http://www.bornovavet.gov.tr/makale.htm>
- [17] Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS). AMD-TP-04, MIK Saptama Yöntemleri (Gradient difüzyon, sıvı dilüsyon ve agar dilüsyon). T. C. Sağlık Bakanlığı.
- [18] Cengizler, İ. (2000). Balık Hastalıkları Ders Kitabı, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, (7): 17.
- [19] Austin, B., Austin, D.A. (1993). Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wildfish, U.K, 208–227: Springer Netherlands.
- [20] Austin, B., Austin, D. A. (1999). Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish. 3 rd. (Revised) ed. Chichester, UK, 457.
- [21] Akalın, E. (1990). Antibiyotikler, Türk Tabipler Birliği Yayını, Ankara.
- [22] Corvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between gram positive and gram negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother.Vol.38: 1447–1451.
- [23] Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. Vol. 406: 775- 781.
- [24] Chambers, H. F. (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. United States, Morb. Mortal. Wkly. 51: 67- 565.
- [25] Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine, Elsevier. 119 (6A): 3- 10.
- [26] Doern, G.V. et.al., (2001). Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999–2000, including a comparison of resistance rates since 1994–1995. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6):1721– 1729.
Dergipark.gov.tr
- [27] Aarestrup, F. M. (1998). Association between decreased susceptibility to a new antibiotic for treatment of human diseases, everinomicin, and resistance to an antibiotic used for growth promotion in animals, avilamycin. *Microbial Drug Resistance*, 4: 137- 141.
- [28] OIE (Office International des Epizooties). (2006). Antimicrobial Use in Antimicrobial Resistance. Report of a Joint FAO/ OIE/ WHO Expert Consultation. Seoul, Republic of Korea, 13- 16 June, WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.
- [29] Pouliquen, H., Le, B. (1996). Sorption of oxolinic acid and tetracycline to marine sediments. *Chemosphere*, 33: 801–815.
- [30] Hirsch, R., Terns, T., Haberer, K., Kratz, KL. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total. Environ*, 225: 109–118.
- [31] Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G. F., Bulet, J.S., Ornston, L. N. (1995). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. Prentice Hall International. London. 20 th. ed.

- [32] Opal, S. M., Pop- Vicas, A. (2010). Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandel, G. L., Bennet, J.E., Dolin, R., (eds). Principles and Practise of Infection Diseases, 7 th. Ed. Churchill Livingston Elsevier, Philadelphia, 95- 279.
- [33] Ustaçelebi, Ş. (1999). Tıbbi ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi.
- [34] Sezgin, N. (2002). Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Baran Ofset, Ankara.
- [35] Antibiyotik duyarlılık testi modülü, 725TTT107. (2011). Ankara, T.C. Milli Eğitim Bakanlığı.
- [36] Ulusoy, S., Arda, B., Özer, Ö., Çetin, B., Özinel, M. A. (1995). E Test: Yeni Bir Antimikrobiyal Duyarlılık Testinin Disk Difüzyon Yöntemi İle Karşılaştırılması. ANKEM Derg. 9 (No.1) 85- 89.
- [37] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed.M 100, (ISBN 1-56238-804-5).
- [38] Kronvall, G. (2007). Antibiotic sensitivity testing – Report of an International Collaborative Study- Commentary. Apmis, Denmark, 115: 619- 620.
- [39] Berzeg, D. (2005). Çeşitli klinik materyallerden izole edilen enterokok suşlarında antibiyotik direnci, yüksek düzey aminoglikozid direnci ve E test ile vankomisin MİK değerlerinin değerlendirilmesi (Uzmanlık tezi). TC. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği. www.istanbul.saglik.gov.tr/w/tez/pdf/enfeksiyon/dr_denef_berzeg.pdf
- [40] Azap A. (2000). *Helicobacter pylori* Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesinde E- test Yönteminin Etkinliğinin Araştırılması. (Uzmanlık tezi). T. C. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı. acikarsiv.ankara.edu.tr/browse/29010/tez.pdf
- [41] Çoban, A. Y., Bilgin, K., Uzun, M., Akgunes, A., Yusuf, Anne., Durupinar, B. (2008). Comparative Study for Determination of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibility to First and Second Line Antituberculosis Drugs by the E test Using 7H11, Blood, and Chocolate Agar. Journal of Microbiology, 4095- 4098.
- [42] EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2018). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8. 0. <http://www.eucast.org>
- [43] Gül, M., Şensoy, A., Çetin, B., Korkmaz, F., Seber, E. (2004). Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Seftazidime Duyarlılığın E test ve Disk Difüzyon Yöntemleri ile Araştırılması. Türk Mikrobiyal Cem. Derg. 34: 33- 36.
- [44] Özcan, M. (2005). İmmünsüprese Hastalardan Soyutlanan Kandida Suşlarının Tiplendirilmesi ve Antifungal İlaçlara Karşı Duyarlılıklarının E test Yöntemi İle Araştırılması. T. C. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
- [45] Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G., Diler, Ö. (2005). *Lactococcus garvieae* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğridir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi 1 (1): 39- 48.

ÖZGEÇMİŞ

20 Aralık 1987’de İzmir’de doğdu. İlk öğrenimini Metin Aşıkloğlu İlk Öğretim Okulu’nda tamamladı. Lise eğitimini İzmir Namık Kemal Lisesi’nde bitirdi. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi’nden 2014 yılında mezun oldu. Bitirme tezi olarak ‘Mikroalglerden Tek Hücre Proteini Eldesi’ konulu çalışması vardır. 2015 yılında İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans eğitimine başladı.