

Pathological and Microbiological Investigations of Naturally Infected Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with *Flavobacterium psychrophilum*

Erkmen T. EPIKMEN¹, Hamdi AVCI¹, T. Tansel TANRIKUL², S. Serap BİRİNCİOĞLU³, Ahmet AYDOĞAN^{4*}

¹Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

²Department of Aquaculture and Fish Diseases, Faculty of Fisheries, İzmir Katip Çelebi University, İzmir, Turkey

³Special A Pathology Laboratory, İzmir, Turkey

⁴Department of Pathology, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Çukurova University, Adana, Turkey

ABSTRACT

It was aimed to identify and evaluate the pathological and microbiological findings in rainbow trout naturally infected with *Flavobacterium psychrophilum* in two trout farms of Aydın and Muğla within this study. A total of 77 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (weighing 1 ± 02 g and 5-6 cm in size) were collected from two separate trout farms. The most common lesion seen in macroscopic examination was petechial hemorrhages that formed on the skin in different parts of the body. In addition, skin erosion and ulcers, exophthalmus and periocular hemorrhages were observed in the eyes. Microscopically, erosive foci in some areas, and ulcers in which the destructions reached the muscle layer in some areas were noted. There were bacteria clusters, hemorrhages and inflammatory cell infiltrations consisting of macrophages and lymphocytes in the ulcer foci. As a result of the bacteriological examination, the isolated bacteria were identified as *Flavobacterium psychrophilum* based on their morphological and biochemical character.

Keywords: *Flavobacterium psychrophilum*, pathology, microbiology, rainbow trout, natural infection

Flavobacterium psychrophilum ile Doğal Enfekte Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Patolojik ve Mikrobiyolojik İncelemeler

ÖZ

Bu çalışma ile Aydın ve Muğla illerinde bulunan iki alabalık işletmesinde *Flavobacterium psychrophilum* ile doğal enfekte gökkuşığı alabalıklarında şekillenen patolojik ve mikrobiyolojik bulguların tanımlanarak birlikte değerlendirilmesi amaçlanmıştır. İki ayrı alabalık işletmesinden toplanan 1 ± 02 g ağırlığında ve 5-6 cm büyüklüğünde toplam 77 adet gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) incelendi. Makroskobik incelemede en yaygın görülen lezyon, vücudun değişik bölgelerinde deride şekillenen peteşiyel kanamalardı. Buna ek olarak, deride erozyon ve ülserler, gözlerde ekzoftalmus ve perioküler kanama görüldü. Mikroskobik olarak, bazı alanlarda epidermin yüzeysel olarak yıkımlandığı eroziv odaklar, bazı alanlarda ise yıkımlanmaların kas tabakasına dek ulaştığı ülserler dikkati çekti. Ülser odaklarında bakteri kümeleri, kanamalar ile makrofa ve lenfositlerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonları mevcuttu. Yapılan bakteriyolojik inceleme sonucu, izole edilen bakteri morfolojik ve biyokimyasal karakterine göre *Flavobacterium psychrophilum* olarak tanımlandı.

Anahtar Kelimeler: *Flavobacterium psychrophilum*, patoloji, mikrobiyoloji, gökkuşığı alabalığı, doğal enfeksiyon

To cite this article: Epikmen E.T, Avci H, Tanrikul T.T, Birincioglu S.S, Aydogan A. Pathological and Microbiological Investigations of Naturally Infected Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with *Flavobacterium psychrophilum*. Kocatepe Vet J. (2020) 13(2):172-178

Submission: 14.02.2020

Accepted: 20.05.2020

Published Online: 22.05.2020

ORCID ID; ETE: 0000-0003-2641-2321, HA: 0000-0002-7776-5373, TTT: 0000-0002-1684-7965, SSB: 0000-0001-5815-6508,

AA: 0000-0003-2504-8150

*Corresponding author e-mail: aaydogan@cu.edu.tr

GİRİŞ

Günümüzde sürekli bir gelişim içinde olan kültür balıkçılığı sektöründe balık hastalıklarına bağlı kayıplar işletmelerde önemli ekonomik sorunlara neden olmaktadır. Bu kayıpların nedenleri arasında bakteriyel hastalıklar geniş yer tutar. Bu hastalıklardan biri de son 20 yılda tüm dünyada salmonidlerde ve özellikle de yavrularında çok ciddi sorunlara yol açan, düşük su sıcaklıklarında (<10 °C) meydana geldiğinden dolayı bakteriyel soğuk su hastalığı olarak da bilinen, *Flavobacterium psychrophilum* (*F. psychrophilum*)'un neden olduğu hastalıktır (Roberts 2001, Ekman ve Norrgren 2003). Avrupa'da hastalığın etiyojisinin tanımlanmadığı dönemlerde fry mortalite sendromu ya da gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) fry sendromu (RTFS) olarak adlandırılmıştır (Roberts 2001, Nematollahi ve ark. 2003). Etken, Flavobacteriaceae familyasının *Flavobacterium* genusunda yer alan, gram negatif, sporsuz, kapsülsüz, aerobik ya da fakültatif aerobik bir basildir. Gökkuşağı alabalıkları *F. psychrophilum* enfeksiyonuna karşı oldukça duyarlıdır. Özellikle 0.5-2.0 g'lık yavru balıkların enfeksiyondan çok fazla etkilendiği ve yüksek (%50-70) mortalite oranlarının kaydedildiği bildirilmiştir (Roberts 2001, Madsen ve ark. 2005). Sunulan çalışmada, Aydın ve Muğla illerinde bulunan iki alabalık işletmesinde yavru gökkuşağı alabalıklarında *F. psychrophilum*'un oluşturduğu doğal enfeksiyonun patolojik ve bakteriyolojik bulgularının tanımlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Çalışmanın materyalini Aydın ve Muğla illerinde bulunan iki alabalık işletmesinden toplanan 1±0.2 g ağırlığında ve 5-6 cm uzunluğunda, hasta ya da hastalık şüphesi olan, yeni ölmüş veya öldürülen toplam 77 adet gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) oluşturdu.

Patolojik Analiz

Nekropsiyi takiben alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi, trimleme işleminden sonra rutin olarak alkol ve ksilol serilerinde takip edildi, daha sonra parafinde bloklandı. Bu bloklardan mikrotomda alınan kesitlerin tamamı (4-6 µm) hematoksilin-eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

İzolasyon ve İdentifikasyon

Mikrobiyolojik inceleme için balıkların böbrek ve dalağından aseptik olarak alınan örneklerden Cytophaga Agar üzerine bakteriyolojik ekim yapıldı. Besi yerinde 15±2 °C'de 14 gün inkübe edildi. İzole edilen bakteri morfolojik ve biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak identifiye edildi (Austin ve Austin 1987). Bakterinin API 20E stripine

inokulasyonunda steril PBS'de Mac Farland No: 4 yoğunluğunda homojenize edilmiş kültür kullanıldı ve API 20E test (Bio Merieux S.A.) sonuçları değerlendirildi (Austin ve Austin 2007). Bakterinin morfolojik yapısı hem natif hem de Gram boyama yöntemiyle boyandıktan sonra incelendi. Dalaktan hazırlanan sürme froti metanol ile tespit edildikten sonra fuksin ile boyandı. Biyokimyasal testlerden kitin ve agar hidrolizasyonu (Reichenbach ve Dworkin 1981), nişasta ve euskilin hidrolizi, jelatin ve kazein hidrolizasyonu (Pacha ve Porter 1968) yapıldı. Bakterilerin farklı sıcaklıklarda üreme kabiliyeti Anacker ve Ordal Broth (AOB)'da, tuza karşı toleransı % 0.5, 1,2,3 NaCl ilave edilen tuzlu AOB'de tespit edildi. Tributrin, tween 20 ve tween 80 degradasyon testleri Anacker ve Ordal Agar (AOA) üzerinde yapıldı.

BULGULAR

Balıklarda klinik olarak durgunluk, yem tüketiminde azalma ve su yüzeyine yakın yüzmeler ile düzensiz yüzmeye hareketleri gözlemlendi.

Makroskobik incelemede en yaygın görülen lezyon vücudun değişik bölgelerinde deride şekillenen peteşiyel kanamalar (Şekil 1). Derinin renginde koyulaşma (Şekil 2) ve pullarda dökülme ile erozyon ve derin kas katmanlarına kadar yerleşim gösteren ülserler (Şekil 3) deride görülen diğer makroskobik bulgular. Gözlerde ekzoftalmus ile birlikte birçok balıkta perioküler kanamalar saptandı (Şekil 4A ve B). Bazı solungaçlarda anemi (Şekil 4C), bazılarında ise hiperemi ve peteşiyel kanamalar görüldü. Birçok balıkta asites oldukça belirgindi. Karaciğer, dalak (Şekil 4D) ile böbrekler şişkin ve yumuşak kıvamlıydı. Hava kesesinde ödem ve yer yer kalınlaşmalar dikkati çektirdi.

Mikroskobik olarak, birçok balıkta epidermiste erozyon belirlendi. Bazı alanlarda eroziv odakların derin kas tabakalarına kadar ulaşan ülserlere dönüştüğü görüldü. Ülser alanlarında bakteri kümeleri, kanamalar ile makrofaj ve lenfositlerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonları mevcuttu (Şekil 5). Solungaçlarda yaygın olarak primer lamellerde hiperemi ile sekonder lamellerde ödem, epitellerde dejenerasyon ve dökülmeler gözlemlendi (Şekil 6). Bazı balıklarda lameller arasında yabancı partiküller belirlendi. Kalpte epikarditis önemli bir bulgu olarak dikkati çektirdi. Epikard yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları ile kalınlaşmıştı (Şekil 7). Peritonda kanama ve mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü. Benzer kanamalara abdominal yağ dokuda da rastlandı. Karaciğerde damarlar hiperemikti ve hepatositlerde dejenerasyon görüldü. Dalakta sinüzoidler eritrositler ile doluydu. Böbrekte damarlar hiperemikti ve tubulus epitellerinde dejenerasyon ile

birlikte sitoplazmalarında eozinofilik hyalin damlacıkları dikkati çekti (Şekil 8). Mikrobiyolojik olarak Cytophaga Agar üzerinde 10 günde saf sarı renkli koloniler üredi. Dalaktan hazırlanan sürme frotide çok miktarda ince uzun basiller görüldü. Sarı renkli bu koloniler bakterinin

identifiye edilmesi için biyokimyasal test besi yerlerine inokule edilerek fenotipik özellikleri saptandı. Bakterinin morfolojik ve biyokimyasal karakterlerine göre (Tablo 1 ve 2) hastalığın etkeni *F. psychrophilum* olarak identifiye edilmiştir.



Şekil 1: *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonu, deride peteşiyel kanama (oklar) ve karın boşluğunda asites (okbaşı), gökkuşuğu alabalığı

Figure 1: *Flavobacterium psychrophilum* infection, petechial hemorrhage on the skin (arrows) and ascites in the abdominal cavity (arrowhead), rainbow trout



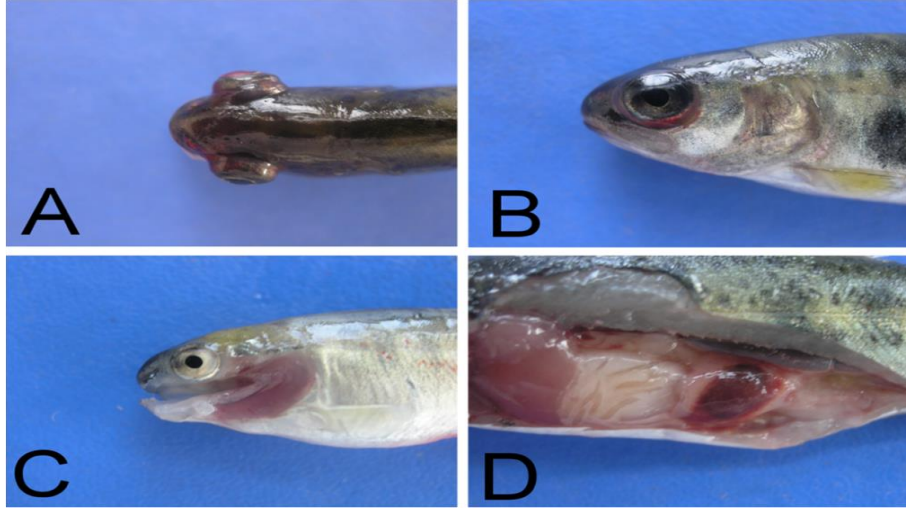
Şekil 2: *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonu, deride renkte koyulaşma (A), kontrol (B), gökkuşuğu alabalığı

Figure 2: *Flavobacterium psychrophilum* infection, darkening in skin (A), control (B), rainbow trout



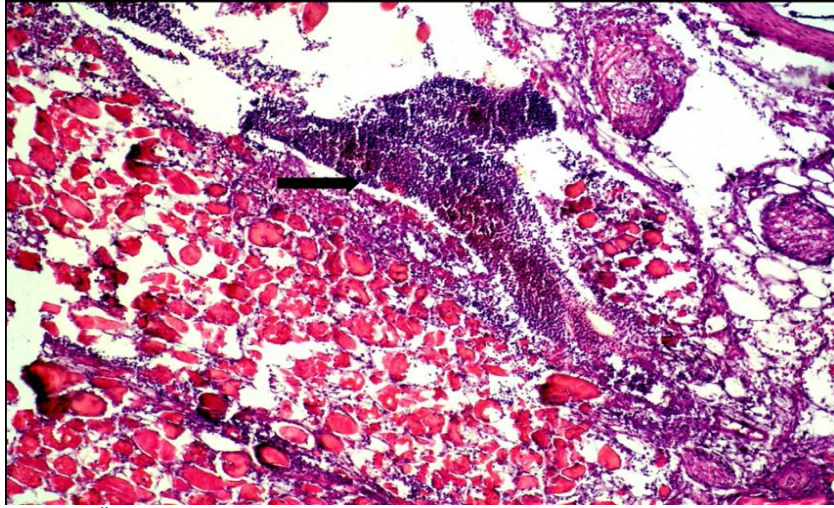
Şekil 3: *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonu, deride derin ülser (oklar), gökkuşuğu alabalığı

Figure 3: *Flavobacterium psychrophilum* infection, deep ulcer on the skin (arrows), rainbow trout



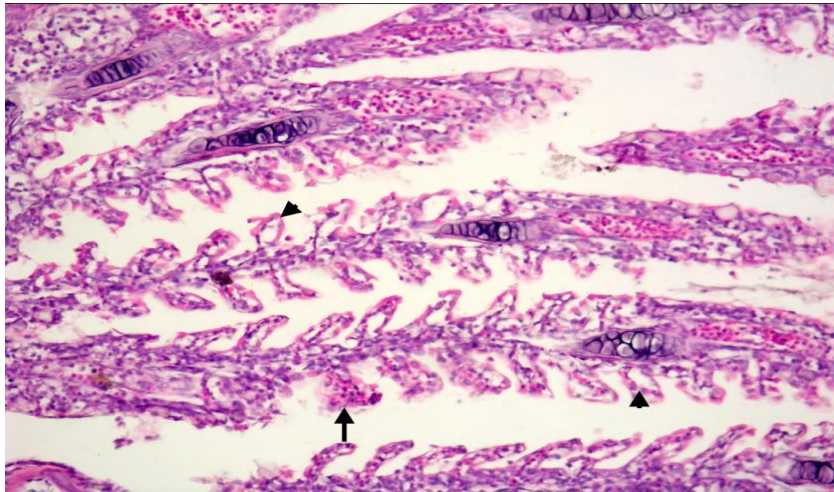
Şekil 4: *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonu, gözde bilateral ekzoftalmus (A), perioküler kanama (B), solungaçlarda anemi (C), dalakta şişkinlik, konjesyon ve çevresinde kanama (D)

Figure 4: *Flavobacterium psychrophilum* infection, bilateral exophthalmus in the eye (A), periocular hemorrhage (B), anemia in the gills (C), swelling of the spleen, congestion and hemorrhage around it (D)



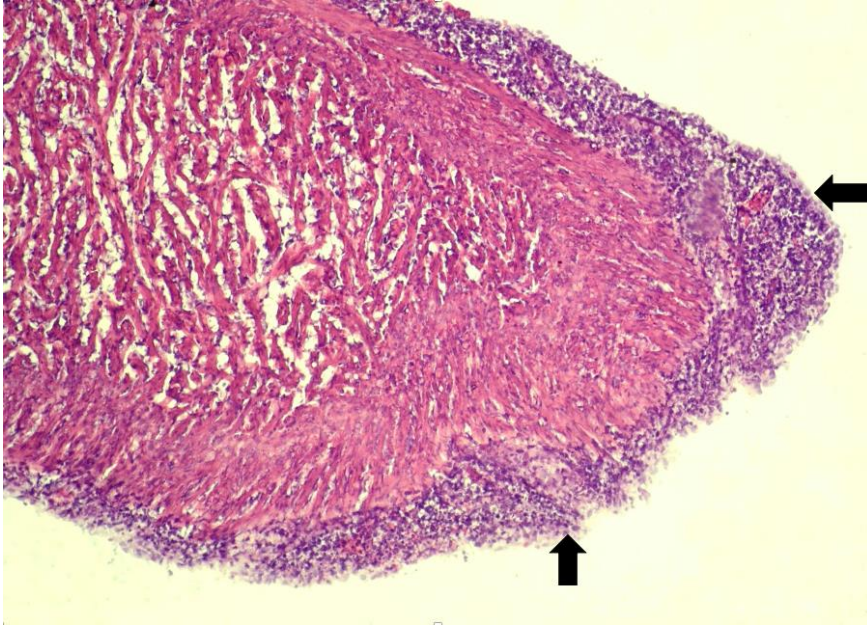
Şekil 5. Ülser ve yangısal hücre infiltrasyonu (ok), deri, H.E., X10

Figure 5. Ulcer and inflammatory cell infiltration (arrow), skin, H.E., X10

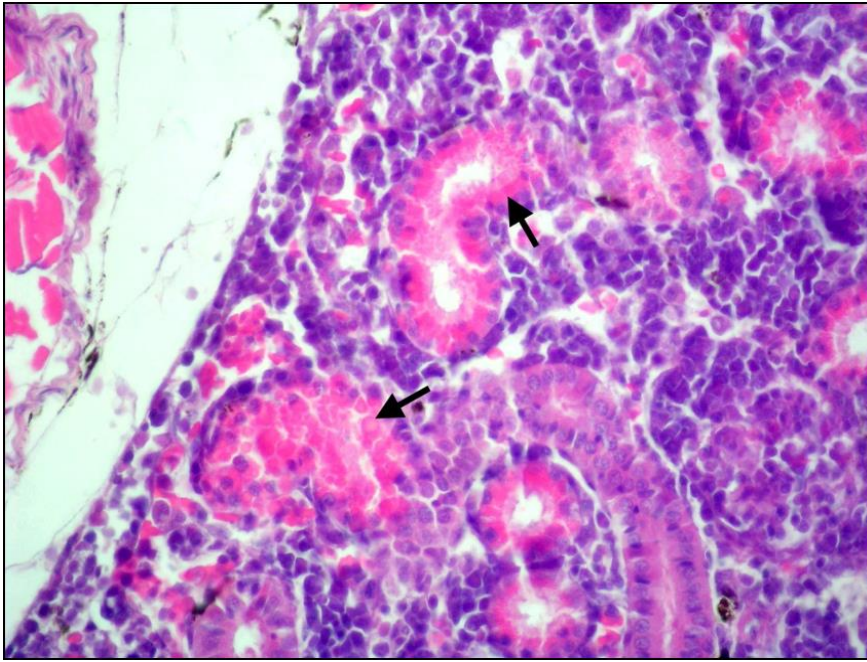


Şekil 6: Sekonder lamellerde ödem (ok başı) ve telangiektazi (ok), solungaç, H.E., X20

Figure 6. Edema (arrowhead) and telangiectasia (arrow) in secondary lamellae, gill, H.E., X20



Şekil 7: Epikartta yangısal hücre infiltrasyonu (oklar), kalp, H.E., X10
Figure 7. Inflammatory cell infiltration (arrows) in the epicardium, heart, H.E., X10



Şekil 8. Tubulus epitellerinde eozinofilik hyalin damlacıkları (oklar), böbrek, H.E., X40
Figure 8. Eosinophilic hyaline droplets (arrows) in tubulus epithelium, kidney, H.E., X40

Tablo 1. Alabalıklardan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Table 1. Morphological and biochemical properties of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trouts

	Sonuç	Hidrolizasyon	Sonuç	Üreme	Sonuç
Sarı Pigmentli Koloni	+	Eskulin	-	4 °C	+
Gliding Hareket	+	Kitin	-	25°C	-
Gram Boyama	-	Agar	-	37°C	-
O/F Metabolizma	O	Jelatin	+	%0,5 NaCl	+
Katalaz	+	Nişasta	-	%1 NaCl	-
Oksidaz	-	Kazein	+	%2 NaCl	-
İndol	-	Tributirin	+	%3 NaCl	-
Nitrat	-	Tween 20	+	%1 Tripton	+
H ₂ S	-	Tween 80	+		

Tablo 2. Alabalıklardan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un API 20E identifikasyon sistemi ile belirlenen biyokimyasal özellikleri

Table 2. Biochemical properties of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trouts determined by API 20E identification system

	Sonuç	Şekerden asit üretimi	Sonuç
ONPG	-	Glukoz	-
ADH	-	Mannitol	-
LDH	-	İnositol	-
ODC	-	Sorbitol	-
Sitrat	-	Ramnoz	-
H ₂ S	-	Sukroz	-
Üre	-	Melibioz	-
TDA	-	Amigdalın	-
İndol	-	Arabinoz	-
VP	-	Oksidaz	-
Jelatin	+		

TARTIŞMA

F. psychrophilum'un neden olduğu bakteriyel soğuk su hastalığı, dünyanın birçok yerinde bulunan alabalık çiftliklerinde hastalık salgınlarına ve önemli ekonomik sorunlara yol açmaktadır (Roberts 2001, Nematollahi ve ark. 2003). Gökkuşluğu alabalıklarında, *F. psychrophilum* enfeksiyonunda klinik olarak anoreksi, letarji, deri renginde koyulaşma, asites, bilateral ekzoftalmus ve perioküler kanama gibi bulguların görüldüğü bildirilmiştir (Roberts 2001, Nematollahi ve ark. 2003, Yıldırım ve Özer 2010). Çalışmada durgunluk, yem tüketiminde azalma ve su yüzeyine yakın yüzmeler ile düzensiz yüzme hareketleri şeklinde saptanan klinik bulgular önceki bildirimlerle uyum sağlamış, sıklıkla bildirilen iskelet lezyonlarına bu araştırmada rastlanmamıştır (Madsen ve ark. 2005, Kubilay ve ark. 2009). Pek çok literatürde

belirtildiğinin aksine ise karaciğerde solgunluk yerine konjesyon ve şişkinlik belirlenmiştir (Roberts 2001, Ekman ve Norrgren 2003, Yıldırım ve Özer 2010). Sunulan çalışmada dikkati çeken hava keselerinde ödem ve kalınlaşmalara ise önceki çalışma ve raporlarda rastlanmamıştır.

Değişik çalışmalarda deride şekillendiği bildirilen tek taraflı ve derin ülser odakları sunulan çalışmada da yaygın olarak saptanmıştır (Madetoja ve Wiklund 2002, Nematollahi ve ark. 2003). Bu ülserlerdeki yoğun bakteri kümelerinin varlığı, derinin portantre olarak rol oynadığı ve bakterilerin suya katılımına kaynak oluşturduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Bazı çalışmalarda böbrekte tubulus epitellerinde tanımlanan intrasitoplazmik eozinofilik hyalin damlacıkları sunulan çalışmada da yaygın olarak

görülmüş, bu bulgular böbreklerdeki proksimal tubulus epitellerinin dejenerasyonlarının bir sonucu olarak değerlendirilmiştir (Ostland ve ark. 2000, Madetoja ve Wiklund 2002, Nematollahi ve ark. 2003).

Dalakta konjesyon, kırmızı ve beyaz pulpada ödematöz değişiklikler, yaygın hemoraji, splenomegali ve nekroz gibi patolojik bulguların en belirgin olarak gökkuşuğu alabalıklarında görüldüğü bildirilmiş (Roberts 2001, Ekman ve Norrgren 2003), bu çalışmada ise dalakta makroskopik olarak şişkinlik ve yumuşama; mikroskopik olarak ise sinüzoidlerin eritrositler ile dolu olduğu görülmüştür.

Bazı kronik enfeksiyon vakalarında kalpte perikarditis görüldüğü belirtilmiş (Roberts 2001) ve sunulan çalışmada epikarditis en önemli histopatolojik bulgulardan biri olarak kaydedilmiştir. Balıklarda yaygın olarak görülen hiperemi ve kanamalar da kalp yetmezliği ile ilişkilendirilmiş ve epikarditis görülen balıklarda bunun birincil ölüm nedeni olduğu sonucuna varılmıştır.

F. psychrophilum enfeksiyonunda alabalıklarda solungaçlarda anemiye bağlı solgunluk, hiperemi ve peteşiyel kanama gibi bulguların görüldüğü bildirilmiş (Roberts 2001, Nematollahi ve ark. 2003), sunulan çalışmada da solungaçlarda yaygın olarak primer lamellerde hiperemi ile sekonder lamellerde ödem, epitellerde dejenerasyon ve dökülmeler belirlenmiştir. Bilinen solungaç lezyonlarının yanı sıra solungaçlarda bol miktarda yabancı partikülün bulunması, su kirliliği ile hastalığın şiddetini ve mortalite oranını artıran bir faktör olarak yorumlanmıştır. Bu durum, su kirliliğinin, enfeksiyonun yayılması ile patogenezinde oynadığı rol (Roberts 2001) ve işletmeye verdiği zararın oldukça önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Hastalığın teşhisinde patolojik incelemelerin yanında mikrobiyolojik izolasyon ve identifikasyon da önemli yer tutmaktadır. Özellikle etkenin izolasyonunda klasik agarlara göre Cytophaga Agar daha sık kullanılmakta, bu agarda kenarları ince ve parlak sarı kolonilerin ürediği dikkati çekmektedir (Nematollahi ve ark. 2003). Bu çalışmada da Cytophaga Agar üzerinde 10 günde saf olarak sarı renkli koloniler üremiş ve etkenin morfolojik ve biyokimyasal karakterleri incelendiğinde, etken *F. psychrophilum* olarak identifiye edilmiştir.

SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada, iki ayrı alabalık işletmesinde ortaya çıkan *F. psychrophilum* enfeksiyonu patolojik bulguları ve bakteriyolojik analizleri ile tanımlanmıştır. Yavru alabalıklarda doğal olarak şekillenen ve bu enfeksiyonun ortalama 1 ± 02 g ağırlığındaki yavru balıklarda klinik olarak ekzofthalmus, makroskopik ve mikroskopik olarak

erozyon, ülser ve yine mikroskopik olarak epikarditis ile seyrettiği düşünüldüğünde; benzer bulguların işletmelerde fark edilmesi durumunda, mortalite oranı oldukça yüksek olabilen bu hastalığın göz önüne alınarak buna ilişkin koruma ve kontrol önlemlerinin alınması gerektiği kanısına varılmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Austin D, Austin DA.** Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish, Ellis Horwood Ltd. 1987.
- Austin D, Austin DA.** Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish, 4th Ed., Springer and Praxis Publishing, Chichester, UK. 2007.
- Boyacıoğlu M, Akar F.** Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* causing rainbow trout fry syndrome and determination of an effective antibacterial treatment in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2012; 18 (2): 197-203.
- Ekman E, Norrgren L.** Pathology and immunohistochemistry in three species of salmonids after experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum*. J Fish Dis. 2003; 26: 529-538.
- Kubilay A, Altun S, Didinen BI, Ekici S, Diler Ö.** Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* izolasyonu. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2009, 15: 709-715.
- Madetoja J, Wiklund T.** Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms. Syst Appl Microbiol. 2002; 25: 259-266.
- Madsen L, Moller JD, Dalsgaard I.** *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) hatcheries: Studies on broodstock, eggs, fry and environment. J Fish Dis. 2005; 28: 39-47.
- Nematollahi A, Decostere A, Pasmans F, Haesebrouck F.** *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. J Fish Dis. 2003; 26: 563-574.
- Ostland VE, Byrne PJ, Hoover G, Ferguson HW.** Necrotic myositis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Proteolytic characteristics of a crude extracellular preparation from *Flavobacterium psychrophilum*. J Fish Dis. 2000; 23: 329-336.
- Pacha RE, Porter S.** Characteristics of Myxobacteria Isolated from the Surface of Freshwater Fish. Appl Microbiol. 1968; 16: 1901-1906.
- Reichenbach H, Dworkin M.** The order myxobacterales, In: The Prokaryotes, Ed; Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG, Springer-Verlag, Berlin, Germany. 1981; pp. 356-379.
- Roberts RJ.** Fish Pathology, W.B. Saunders. 2001; pp. 299-304.
- Yıldırım S, Özer S.** Mersin ili çağlarca köyündeki gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum, 1792) kuluçkahanelerinde *Flavobacterium* spp. varlığı. J Fish Sci. 2010; 4 (1): 112-122.