



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MİK-YL-2015-0011

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN *LACTOCOCCUS*  
*GARVIEAE* İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİKLERE  
DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Oğuzhan DOLGUN**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN**

**AYDIN - 2015**

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
MİK-YL-2015-0011

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN *LACTOCOCCUS*  
*GARVIEAE* İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİKLERE  
DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Oğuzhan DOLGUN**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Şükrü KIRKAN**

**AYDIN - 2015**

**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Oğuzhan DOLGUN tarafından hazırlanan “GÖKKUŞAĞI ALBALIKLARINDAN *LACTOCOCCUS GARVIEAE* İDENTİFİKASYONU VE ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez, 01/09/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

**Ünvanı, Adı ve Soyadı :**

**Üniversitesi :**

**İmzası:**

1- Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

2- Doç. Dr. Ertan Emek ONUK

OMÜ, Veteriner Fakültesi

3- Yrd. Doç. Dr. Göksel ERBAŞ

ADÜ, Veteriner Fakültesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... Sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN  
Enstitü Müdürü

---

**Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 09100- AYDIN**  
**Santral : (256) 218 20 00 Direkt Telefon : 218 20 44 Fax : (256) 218 20 44**

## ÖNSÖZ

Su ürünleri yetiştiriciliğinde 1990'lara kadar balıklar için 15 - 20 bakteri türü patojen olarak değerlendirilirken, günümüzde ise 70'e yakın bakteri türünün patojen olarak izole edildiği rapor edilmiştir.

*Lactococcus garvieae*, özellikle yaz aylarında su sıcaklıklarının artmasıyla, deniz ve tatlı su balıklarında septisemi ile meningoensefalitis etkeni olan ve işletmelerde ciddi ekonomik kayıplara yol açan Gram pozitif bir patojendir.

Hastalığın meydana geldiği bölgelerde hastalığın sağaltımı için antimikrobiyal maddelerin kullanılması gerektiği ve özellikle porsiyonluk balıklarda bu enfeksiyonun görülmesi halinde önemli ekonomik kayıpların önlenmesi amacıyla zamanında uygun antibiyotik ve doz kullanımı önem taşımaktadır.

Araştırmamızda 2 farklı çiftlikten toplanan 100 adet 80 - 200 gr ağırlığındaki Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) örneğinin 34 adedinden (% 34) biyokimyasal testler PCR kullanılarak *L. garvieae* izole edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen 34 izolata Penisilin G, Florfenikol, Amoksisilin - Klavulonik asit, Ampisilin, Sefoperazon, Eritromisin, Metisilin, Gentamisin, Oksasilin ve Kloksasilin etken maddelerini içeren antibiyotik diskleri kullanılarak disk diffüzyon yöntemi ile antibiyogram testi uygulanmıştır. Çalışmada identifiye edilen *L. garvieae* suşlarının Amoksisilin - Klavulanik asit'e % 90 oranında duyarlı, Florfenikol'e % 65 oranında orta derecede duyarlı, kullanılan diğer antibiyotiklere karşı dirençli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Yapılan bu çalışmada bölgemiz de bulunan alabalık çiftliklerinde görülen *Lactococcus* hastalığında rol alan en önemli etkenlerden biri olan *L. garvieae* bakterisi gerek konvansiyonel gerekse de moleküler yöntemler aracılığı ile tespit edilmiş ve de ticari olarak kullanımda olan bir çok antibiyotiğe karşı olan duyarlılıkları saptanmış olup, hem yetiştiriciliğe hem de literatür bilgiye bir katkıda bulunulmuştur.

Araştırmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: VTF-15005) tarafından desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	4
1.2. Genel Özellikleri ve Kültür	5
1.3. Epidemiyoloji	10
1.4. Semptomlar	11
1.5. Tedavi	12
1.6. Koruma	13
2. GEREÇ ve YÖNTEM	15
2.1. Gereç	15
2.1.1. İzolasyon Örnekleri	15
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Solusyonlar, Ayıraçlar	15
2.1.2.1. Besiyerleri	15
2.1.2.1.1. İzolasyon Besiyerleri	15
2.1.2.1.1.1. Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458)	15
2.1.2.1.1.2. Gliserollü Buyyon	15
2.1.2.1.1.3. Trypticase Soy Brot (TSB) (Oxoid)	16
2.1.2.1.1.4. Mueller Hinton Medium (Difco)	16
2.1.2.2. Solusyonlar	16
2.1.2.2.1 TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer	16
2.1.2.2.2. Tris (1M)	17
2.1.2.2.3. Gel Loading Buffer (6X)	17
2.1.2.2.4. NaCL (1M)	17
2.1.2.2.5. TE Buffer (10mM Tris + 1mM EDTA)	17
2.1.2.3. Ayıraçlar	18
2.1.2.3.1. Katalaz Testi	18
2.1.2.3.2. Oksidaz Testi	18

2.1.3. PCR	18
2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar	18
2.1.3.2. MgCL <sub>2</sub> , Taq DNA Polymerase, 10x Taq Buffer, dNTP Set	18
2.1.3.3. Primerler	18
2.1.4.1. Elektroforez Cihazı	19
2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı	19
2.1.4.2. Etidium Bromür	19
2.1.4.3. Marker	19
2.1.4.4. Pozitif Kontrol	20
2.1.5. DNA Ekstraksiyon Kiti	20
2.2. Yöntem	20
2.2.1. Örneklerin Alınması	20
2.2.2. <i>Lactococcus spp.</i> İzolasyonu	20
2.2.3. DNA İzolasyonu	20
2.2.3.1. PCR İşlemi	21
2.2.3.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	23
2.2.3.3. Jelde Yürütme	23
2.2.3.4. Görüntüleme ve Değerlendirme	23
2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	24
3. BULGULAR	25
3.1. İzolasyon Bulguları	25
3.2. PCR Bulguları	25
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Bulguları	26
4. TARTIŞMA	29
5. SONUÇ	33
ÖZET	34
SUMMARY	35
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	48
TEŞEKKÜR	49

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b>	<i>Lactococcus</i> cinsinin türleri	7
<b>Çizelge 1.2.</b>	<i>L. garvieae</i> 'nin biyokimyasal, kültürel ve fizyolojik karakterizasyonu	9
<b>Çizelge 2.1.</b>	PCR amplifikasyonlarında kullanılan primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları	19
<b>Çizelge 2.2.</b>	Mastermiks hazırlanma miktarları	22
<b>Çizelge 2.3.</b>	PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	23
<b>Çizelge 2.4.</b>	Standart zon çapları	24
<b>Çizelge 3.1.</b>	İzole ve identifiye edilen <i>L. garvieae</i> suşlarının disk difüzyon test sonuçları	27

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b>	Keban Barajı'nda faaliyet gösteren alabalık tesislerinden örnekler	1
<b>Şekil 1.2.</b>	Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	2
<b>Şekil 1.3.</b>	Laktik asit bakterilerinin filogramı	6
<b>Şekil 1.4.</b>	<i>Lactococcus garvieae</i> 'nin kanlı agar üzerinde ve Gram boyama sonrası görünümü	8
<b>Şekil 1.5.</b>	Pilorik kese serozal yüzeyinde peteşiyal kanamalar	12
<b>Şekil 3.1.</b>	PCR pozitif örneklerin elektroforez görüntüsü	26



# 1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği, Dünya besin ihtiyacını büyük ölçüde karşılayan önemli sektörlerden biridir. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) su ürünleri sektörünün en hızlı gelişen gıda sektörü olduğunu bildirmiştir. Dünya’da su ürünleri üretimi 1950’li yıllarda 1 milyon tonun altında iken, 1980’lerde 7 milyon tona, 2013 yılında ise 70 milyon tona ulaşmıştır (FAO 2015).

Türkiye’de alabalık yetiştiriciliği 1970’li yıllardan itibaren çeşitli kültür sistemleriyle yapılmaya başlanmış olup günümüze kadar önemli gelişmeler göstermiştir. Günümüzde deniz ve iç sularda kafes sistemlerinde yetiştiriciliğe izin verilmesiyle ve devlet desteğiyle birçok işletme su ürünleri yetiştiriciliğinde faaliyet göstermektedir. Ağ kafes sistemlerinin teknolojik olarak ilerlemesi sektörel büyümeye katkı sağlamıştır (Emre ve ark 2008) (Şekil 1.1.). TUİK (2015) verilerine göre 2013 yılında iç sularda yapılan alabalık yetiştiriciliği miktarı 122.823 tondur. FAO’ya göre Dünya’da su ürünleri yetiştiriciliği üretiminde Çin birinci sırada yer almakta olup bu ülkeyi Hindistan, Vietnam, Tayland gibi ülkeler takip etmektedir. Türkiye ise bu sıralamada 26. sırada bulunmaktadır (Anonim 1).

**Şekil 1.1.** Keban Barajı’nda faaliyet gösteren alabalık tesislerinden örnekler (Anonim 2)



Alabalıklar *Salmonidae* familyasına ait balıklardır. Soğuk, berrak ve bol oksijenli akarsu, kaynak suları ve göllerde yaşarlar. Genellikle ince uzun, iğne şeklinde olurlar. En karakteristik özellikleri sırt yüzgeci ve kuyruk yüzgeci arasında yağ yüzgeci (adipoz) taşımalarıdır (Çelikkale 2002) (Şekil 1.2.). Karnivor balıklardır ve türlere göre değişen sayıda dişleri vardır (Özdemir 1996, Tekelioğlu 2005). Alabalıklar tamamen iç sularda yaşayanlar ve hayatlarının bir kısmını tatlı sularda, diğer kısmını denizlerde geçirenler (anadrom) olmak üzere iki büyük grup altında toplanırlar (Çelikkale 2002). Alabalık türleri coğrafik olarak Avrupa kökenli ve Kuzey Amerika kökenli olarak iki gruba ayrılırlar. Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan en yaygın tür Kuzey Amerika kökenli olan Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)'dir (TUIK 2015).

Gökkuşığı alabalığının kuyruk yüzgeci çatallıdır. Ağız yarığı gözün arka kısmına kadar uzanır. Renkleri değişken olup yan hat boyunca gökkuşığı renginde bir bant bulunur. Üreme dönemlerinde bu bant iyice belirginleşir. Cinsi olgunluk 2 - 3 yaşında gerçekleşir ve üreme Mayıs - Aralık ayları arasında olur. 100 yılı aşkın bir süredir yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde 1969 yılından beri kültürü yapılan bu balığın uygun koşullarda 1 yılda 250-300 gram ortalama ağırlığa ulaştığı bildirilmiştir. Çevre koşullarına çok iyi uyum sağlaması, aktif yem alması sayesinde iyi gelişme göstermesi, sağım, döl alımı, yavruların yapay yemlerle beslenme işlemlerinin daha kolay olması ve bu sayede ekonomik olması bu balığın kültürünün tercih edilmesinin başlıca nedenleri olduğu söylenebilir (Çelikkale 2002).

**Şekil 1.2.** Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (Anonim 3)



Su ürünleri yetiştiriciliğinde 1990'lara kadar balıklar için 15 - 20 bakteri türü patojen olarak değerlendirilmiş (Munro 1982), günümüzde ise 70'e yakın bakteri türünün patojen olarak izole edildiği bildirilmiştir (Woo ve Bruno 2003). Gökkuşuğu alabalıklarında farklı coğrafik bölgelerde yapılan araştırmalara göre *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Streptococcus spp.*, *Flexibacter spp.*, *Yersinia spp.* gibi etkenlerin enfeksiyona neden olan bakteriyel patojenler olduğu rapor edilmiştir. Özellikle *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* ve *Lactococcus garvieae* türlerinin balıklarda ciddi mortaliteye sebep olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Burka ve ark 1997, Schmidt ve ark 2000, Kum ve ark 2004, Akinbowale ve ark 2006).

*Yersinia ruckeri*, salmonidlerde enterik kızıl ağız hastalığına neden olan önemli bir patojendir. Çiftliklerde bu hastalık nedeniyle büyük ekonomik kayıpların meydana geldiği rapor edilmiştir (Austin ve ark 2003, Wiens ve ark 2010, Deshmukh ve ark 2012).

*Aeromonas salmonicida*, kültür balıkçılığında frunkulozis hastalığı etkeni olarak bilinen ve yüksek mortaliteye yol açan önemli patojenlerden biridir (Rattanachaikunsopon ve ark 2012). Hastalık deride nekrotik lezyonlara ve iç organlarda hemorajilere yol açar (Burr ve ark 2005).

*Vibrio anguillarum*'un balıklarda vibriosis hastalığı etkeni olduğu bildirilmiştir (Norqvist ve ark 1989). Zorunlu bir patojen olmasada balığın çevresinde bulunması durumunda er ya da geç hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Post 1987).

*Lactococcus garvieae*, özellikle yaz aylarında su sıcaklıklarının artmasıyla, deniz ve tatlı su balıklarında septisemi ile meningoensefalitis etkeni olan ve ciddi ekonomik kayıplara yol açan Gram pozitif bir patojendir (Barnes ve ark 2002, Vendrell ve ark 2006). Aynı etkene meme içi enfeksiyonlu ineklerde (Devriese ve ark 1999) ve mastitisli su buffalolarında da duyarlılık görülürken (Carvalho ve ark 1997), çiğ inek sütlerinden (Villani ve ark 2001), et ürünlerinden (Rantsiou ve ark 2005), kümes hayvanlarının etlerinden (Barakat ve ark 2000) ve kedi ve köpek tonsillerinden de (Eldar ve ark 1996) izole edilmiştir. Etken Amerika'da insanlarda solunum sisteminde, üriner kanalda, deride ve kanda tespit edilmiş ayrıca Uzak Doğu'da birkaç vakada da insandan izole edildiği bildirilmiş ve böylece potansiyel zoonoz olabileceği düşünülmüştür (Elliot ve ark 1991).

Etken özellikle su sıcaklıklarının 16°C'nin üzerine çıkmasıyla birlikte birçok akuatik türü etkileyerek ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. (Austin ve Austin 1999).

Özellikle Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Avrupa, Avustralya, Güney Afrika, Japonya, Tayvan ve İngiltere gibi ülkelerde salgınlara neden olmuştur (Ravelo ve ark 2006, Vendrell ve ark 2006).

*Lactococcus garvieae*'nin neden olduğu *lactococcosis* enfeksiyonu, hemorojik septisemi ile karakterize sistematik bir enfeksiyondur (Ksuda ve Salati 1999, Austin ve Austin 1999). Bu hastalığın kontrolünde profilaktif tedbirlerin alınması oldukça önem taşımaktadır. Hastalığın meydana geldiği bölgelerde hastalığın sağaltımı için antimikrobiyal maddelerin kullanılması gerektiği ve özellikle porsiyonluk balıklarda bu enfeksiyonun görülmesi halinde önemli ekonomik kayıpların önlenmesi amacıyla zamanında uygun antibiyotik ve doz kullanımı önem taşımaktadır. Balık etinde oluşacak rezidü ve bakterinin direnç geliştirebileceği göz önünde bulundurulursa hastalığa karşı gerek koruyucu amaçla gerekse sağaltım için kullanılacak antimikrobiyal ilaçların spesifik hastalık etkenine karşı olan bakteriyostatik ve bakterisidal etkisinin çok iyi belirlenmesi ve uygun antibiyotiğin seçilerek yeterli sürede ve dozda uygulanması gerekmektedir (Kubilay ve ark 2005).

### 1.1. Tarihçe

*Lactococcus garvieae* ilk olarak Britanya'da sığır mastitislerinden izole edilmiştir (Vendrell ve ark 2006). Daha sonra 1974 yılında Japonya'da Sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*) balığından izole edildiği bildirilmiştir (Ksuda ve ark 1991). 1991 yılında yaz aylarındaki salgından sonra İtalya ve İspanya'da Gökkuşığı alabalıklarında yüksek mortaliteye neden olduğu rapor edilmiştir (Barnes ve ark 2002). Etkenin ilerleyen zamanlarda Tayvan'daki Tekir balıklarında (*Mullus surmuletus*) ve tatlı su karideslerinde (*Macrobrachium rosenbergii*) salgınlara neden olduğu bildirilmiştir. (Chen ve ark 2001, 2002, Chang 2002). Türkiye'de ise bu hastalığın ilk defa 2001 yılında Ege Bölgesi'ndeki bir Gökkuşığı alabalığı işletmesinde meydana geldiği rapor edilmiş (Diler ve ark 2002) ve 2008 yılından itibaren birçok bölgedeki Gökkuşığı alabalığı üretim çiftliklerinde görülmüştür.

Günümüzde ise Gökkuşığı alabalığı çiftliklerinde salgınlar halinde Fransa'da, Balkanlar'da, İsrail'de (Eyngor ve ark 2004) ve İngiltere'de (Bark ve Mc Gregor 2001) görülmüştür. Kore'de deniz türlerinde izole edildiği bildirilmiştir (Baeck ve ark 2006). Salgınlardan izole edilen patojen Japonya'da 1950 yılının sonlarına kadar *Streptococcus spp.* olarak tanımlandı. Gelişen tekniklerle birlikte 1985 yılından sonra *Streptococcus*'lardan ayrıldı (Schleifer ve ark 1985). Patojen sonradan *Enterococcus seriolicida* ve daha sonrada *Lactococcus garvieae* olarak sınıflandırılmıştır (Ringo ve Gatesoupe 1998, Vendell ve ark

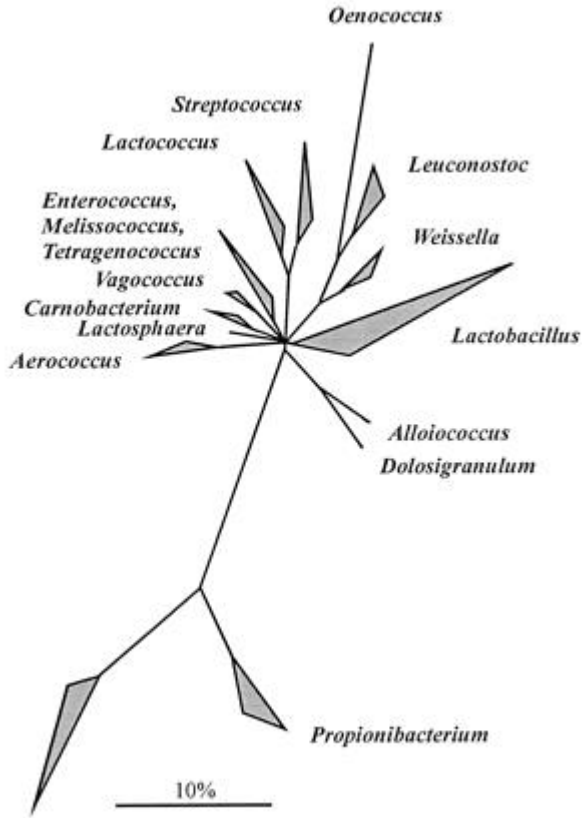
2006). Önceleri *Enterococcus* benzeri olarak tanımlanan bu patojen, DNA hibridizasyon, 16S rRNA sekans analizleri, protein profili ve biyokimyasal karakterizasyonu gibi çalışmaların sonunda *Enterococcus seriolicida* ve *Lactococcus garvieae*'nin sinonim olduğu bildirildi (Domenech ve ark 1993, Teixeira ve ark 1996, Eldar ve ark 1996).

Neden olduğu hastalık Laktokokkosis olarak adlandırılmış (Austin ve Austin 1999) ve Laktokokkosis'in bir çeşit Streptokokkosis olduğu bildirilmiştir (Vendrell ve ark 2006). Bu etken intensif kültür balıkçılığında, tatlı ve tuzlu su balıklarında zoonotik karakterde özellikle yaz aylarında su sıcaklığının artmasıyla enfeksiyonlara neden olan bir patojen olarak bildirilmiştir (Sanchez ve ark 2011).

## 1.2. Genel Özellikleri ve Kültür

Laktik asit bakterileri (LAB), hekzoz şekerleri fermente eden ve son ürün olarak laktik asit üreten, anaerobik solunum yapan, asit toleransı bulunan, spor oluşturmeyen, Gram pozitif ve katalaz negatif mikroorganizmalardır (Axelsson 1998, Holzapfel ve ark 2001). LAB'lar DNA'larında G+C oranları %55'in altında olan bakteri grubu olarak tanımlanmışlardır. *Firmicutes* şubesinin, *Bacilli* sınıfının, *Lactobacillales* takımına dahil edilmekte olup, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* ve *Carnobacterium* cinslerini içermektedirler (Şekil 1.3.). LAB'ların farklı cinsleri arasındaki filogenetik ilişki 16S rDNA bölgelerinin karşılaştırılması temeline dayanarak tespit edilmiştir (Schleifer ve Ludwig 1995, Stiles ve Holzapfel 1997, Holzapfel ve ark. 2001, Endo ve Okada 2005, Yörük ve Güner 2011).

Şekil 1.3. Laktik asit bakterilerinin filogramı (Stiles ve Holzapfel 1997)



*Lactococcus* cinsi bakteriler kok morfolojisinde olup, 0.5 – 1.5 µm ölçülerinde kok çiftleri ya da kısa zincirler oluşturan mikroorganizmalardır. 10°C ve 45°C arasında gelişme gösterdikleri rapor edilmiş, türleri arasında 40°C üzerinde ve yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilme ve farklı şekerlerden asit oluşturma özellikleri olduğu bildirilmiştir (Schleifer ve ark 1985, Schlegel 1997, Furet ve ark 2002). Şekerleri hemofermentif yöntemle laktik aside dönüştürerek enerji elde eder ve bu özellikleri ile laktokoklar, streptokoklar ve enterokoklardan ayrılırlar (Schleifer ve ark 1985, Schleifer ve Kilpper-Balz 1987). *Lactococcus* cinsine ait tür ve alt türler Çizelge 1.1.' de gösterilmektedir.

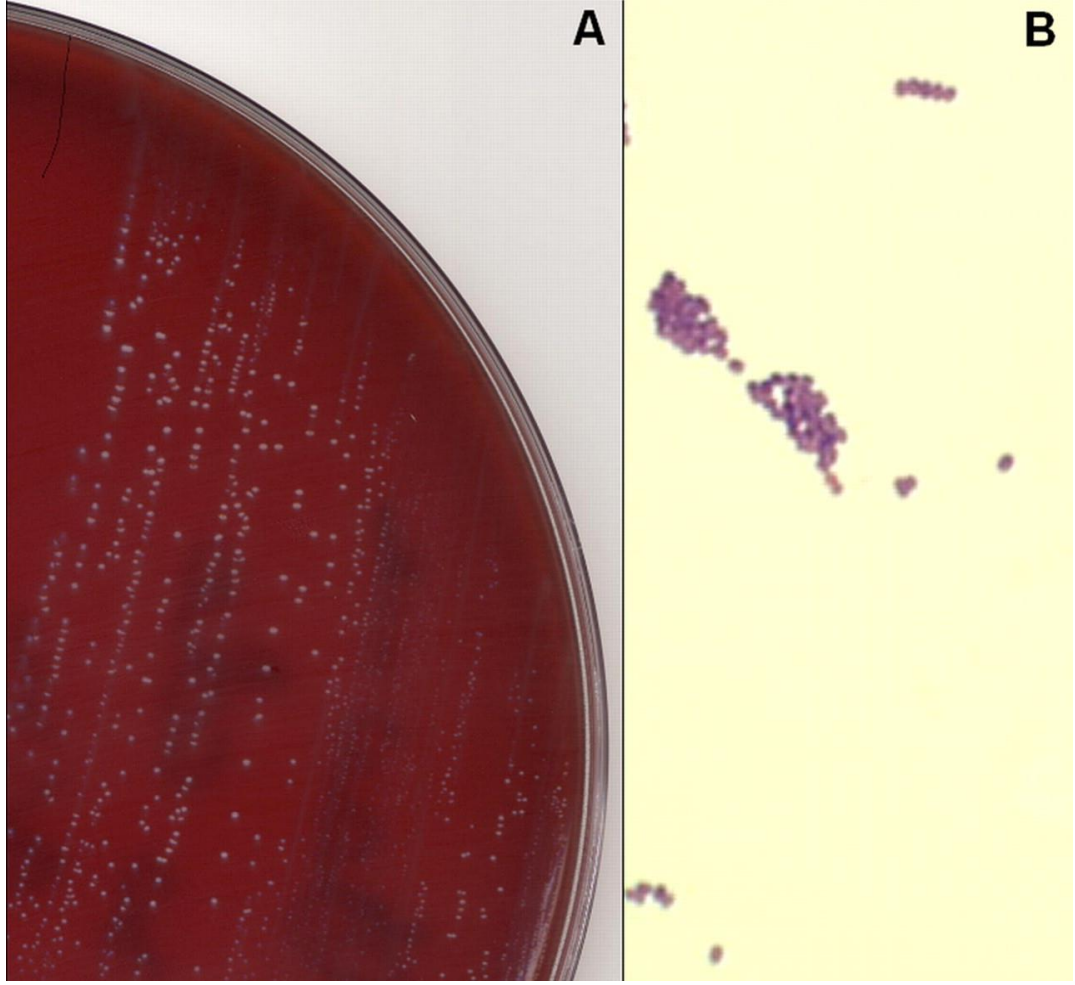
**Çizelge 1.1.** *Lactococcus* cinsinin türleri (Odamaki ve ark 2011)

<b>Türler</b>	<b>Alt türler</b>
<i>Lactococcus garvieae</i>	-
<i>Lactococcus piscium</i>	-
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	-
<i>Lactococcus plantarum</i>	-
<i>Lactococcus chungangensis</i>	-
<i>Lactococcus fujiensis</i>	-
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>tractae</i>

*L. garvieae*, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, çift ya da kısa zincirler halinde görülen, kanlı agar üzerinde alfa-hemolitik bir bakteridir (Şekil 1.4.). Oksidaz ve katalaz negatiflerdir. Optimum üremeyi 30°C de 24 saatte gerçekleştirir (Ringo ve Gatesoupe 1988, Vendrell ve ark 2007) (Çizelge 1.2.).

Etkenin Triptik Soy Agar (TSA), Triptik Soy Broth (TSB), Brain heart infizyon agar (BHIA), Bile Agar (BA) ve Bile Eskulin Agar (BEA) gibi zenginleştirilmiş besi yerlerinde üreyebildiği rapor edilmiştir. (Toranzo ve ark 1994). Yapılan çalışmalara göre *Lactococcus garvieae* optimum gelişmesini BHIA da 25-30°C de ve pH 7-8 de gerçekleştirmektedir (Cheng ve Chen 1999).

**Şekil 1.4.** *Lactococcus garvieae*'nin kanlı agar üzerinde ve Gram boyama sonrası görünümü (Aubin ve ark 2011)



A: Kanlı agarda aerobik koşullarda 48 saat inkübasyondan sonra görülen küçük gri *L. garvieae* kolonileri.

B: Gram boyama sonra görülen kısa zincirler halindeki görünüm



**Çizelge 1.2.** *L. garvieae*'nin biyokimyasal, kültürel ve fizyolojik karakterizasyonu  
(Vendrell ve ark 2006)

Karakter	Reaksiyon	Karakter	Reaksiyon
Hücre morfolojisi	Oval kok		
Gram	+	Arjinin	+
Motilite	-	Ornitin	-
Üreme		Lizin	-
4°C	+	Asit üretimi;	
20°C	+	Giliserol	-
37°C	+	Rafinoz	-
45°C	+	Arabinoz	-
pH 9.6	+	Sorbitol	+
6.5% NaCl	+	Mannitol	+
Hemoliz	$\alpha$	Sellobioz	+
Katalaz	-	Galaktoz	+
Oksidaz	-	D-glukoz	+
TSI	A/A-	Maltoz	+
Oksidativ/fermentativ	Fermentatif	Trehaloz	+
Nitrat İndirgenmesi	-	D-mannoz	+
Sitrat	-	İnositol	-
Ure	-	Lactoz	+
İndol Üretimi	-	Riboz	V
Eskulin	+	Sukroz	V
VP (Voges Prouskar)	+	Adonitol	-
H <sub>2</sub> S üretimi	-	Gilikojen	-
Arjinin dihidrolizi	+	Melibiyoz	-
PYR (Pirolidonil arilamidaz)	+	Melezitoz	-
Alkalın posfataz	-	Starch	-
$\beta$ -Glukuronidaz	V	Tagatoz	V
Löysin arilamidaz	+	L-ramnoz	-
Sodyum hippurat hidroliz	-	D-ksiloz	-
		Salisin	+

A/A-: TSI medyum asidifikasyonu ve H<sub>2</sub>S üretmez,

V: Değişken

### 1.3. Epidemiyoloji

*Lactococcus garvieae*, Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*), Tilapya (*Oreochromis sp.*), Japon Yılan balığı (*Anguilla japonica*), Pisi (*Paralichthys olivaceous*), Kefal (*Mugil cephalus*), Siyah Kayabalığı (*Sebastes schlegeli*), Kral balığı (*Seriola lalandi*) ve dev tatlı su karidesi (*Macrobrachium rosenbergii*) gibi türlerde hastalığa neden olan etken olarak tespit edilmiştir. (Kusuda ve ark 1991, Prieta ve ark 1993, Chen ve ark 2001, Lee ve ark 2001, Chen ve ark 2002, Ravelo ve ark 2003, Colorni ve ark 2003, Kang ve ark 2004, Kawanishi ve ark 2005). Gökkuşığı alabalıklarında mortalitenin diğer türlere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Ghittino ve Muzquiz 1998). Yapılan çalışmalarda etkenin genç balıklarda (50 gr) erişkin balıklara (100 gr) oranla daha yüksek mortaliteye neden olduğu ve akut formun daha uzun süre devam ettiği bildirilmiştir (Muzquiz ve ark 1999). Günümüzde *Lactococcus*'in Gökkuşığı alabalığı işletmelerindeki doğal enfeksiyonlarda 5 gr'lık balıklardan 1 kg ve üzeri tüm balıklara etki ettiği rapor edilmiştir (Diler ve ark 2002, Pereira ve ark 2004).

Su sıcaklığının artışı hastalığın ortaya çıkmasında önemli bir rol oynamaktadır. Su sıcaklıklarının 14-15°C'yi aştığı yaz aylarında akut salgınların meydana geldiği bildirilmiştir (Prieta ve ark 1993, Ghittino ve Muzquiz 1998). Olumsuz çevre koşulları, kötü bakım şartları, yem kalitesi ve yetersiz oksijen gibi faktörler etkenin yayılmasına ve virulansın artmasına neden olmaktadır (Fukuda ve ark 1997).

Hastalığın nakli horizontal yol ile olmaktadır. Balıklar arasında doğrudan nakil önemli olmaktadır. Vertikal nakil ise bildirilmemiştir (Vendrell ve ark 2006). Özellikle hastalığın yayılması aynı kafeslerdeki yaralı balıkların birbiriyle olan temasıyla ya da fekal-oral yol ile olmaktadır (Afonso ve ark 2003). Enfeksiyonun oluşmasındaki en büyük faktörün enfekte balıkların çiftliğe transferi olduğu, hastalık semptomu göstermeyen taşıyıcı balıkların dışkı yolu ile havuzu kontamine ettikleri ve bu yolla sağlıklı balıklarda enfeksiyonun meydana geldiği, ayrıca etkenin hastalığı geçirmiş balıklar tarafından belirli aralıklarla yayıldığı belirtilmiştir (Ghittino ve Muzquiz 1998). İşletmelerdeki hastalık semptomu göstermeyen balıklar PCR metodu ile tespit edilmiş ve kötü akuatik çevre koşulları ile birlikte bakteri için optimum ortam oluştuğunda hastalığın meydana geldiği görülmüştür (Cheng ve ark 2002). Ayrıca etken hastalıklı balıkların ve diğer gıdaların yem olarak kullanılması durumunda işletmelere bulaşabilir (Yasunaga 1982). Etkenin

işletmelerde balık dışında suda, sedimentte ve akuatik ekipmanlarda da tespit edildiği rapor edilmiştir (Kitao ve ark 1979, Kusuda ve ark 1991).

Hastalığın seyri akuatik evre faktörlerine, balığın bakım koşullarına, suyun sıcaklığına ve bakteriyel yüküne bağlı olarak değişim göstermektedir (Prieta ve ark 1993). Etkenin inkübasyon periyodunun oldukça kısa, virulansının çok yüksek olduğu, yapılan deneysel enfeksiyonlarda mortalite oranının iki gün içerisinde % 100'e kadar çıkabildiği grlmştir (Chen ve ark 2001).

#### **1.4. Semptomlar**

Laktokokkozis, hiperakut ve hemorajik septisemi olarak belirtilmiştir (Eldar ve ark 1996) (izelge 1.5.). Enfekte balıklarda iştahsızlık, uyuşukluk, koyulaşmış bir deri ve dengesiz yüzme gibi genel semptomlar görülür. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte başta ve perioküler alanda, anal bölgede ve yüzgeç kaidelerinde hemorojiler, karında şişlik, çift ya da tek taraflı ekzoftalmus ve anüste prolapsus gözlenir (Prieta ve ark 1993, Eldar ve ark 1999, Muzquiz ve ark 1999, Vendrell ve ark 2004). Enfeksiyon damar endotelinde lezyonlara ve iç organların yüzeyinde kanamalara sebep olur. Nekropside peritonel boşlukta hemorojiler ve purulent eksudatlar görülür (Vendrell ve ark 2007). Etkilenen balıktaki makroskopik lezyonlar herhangi bir sistemik akut hastalıktaki gibidir ve yüzme kesesi, karaciğer, beyin, böbrek, bağırsak, kalp ve periton gibi dokularda değişen düzeylerde hemorajiler gözlemlenmiştir (Prieta ve ark 1993, Aizpurua ve Esnault 1999, Austin ve Austin 1999, Afonso ve ark 2003, Pereira ve ark 2004).

Histopatolojik olarak gözde iltihaplı hücre birikimi gözlenir. Gzn n ve arka bölümlerinde irinli alanlar, göz içi kas ve yağ dokusunda kanlı irin gözlenebilir. Enfekte balıklarda genelde meningitis mevcuttur. Kalp, karaciğer ve karın zarında bol fibroblast makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu görülebilir (Eldar ve ark 1999, Chang ve ark 2002).

**Şekil 1.5.** Pilorik kese serozal yüzeyinde peteşiyal kanamalar (oklar) (Avcı ve ark 2010)



### 1.5. Tedavi

*Streptococcus* cinsi etkenlerden dolayı balıklarda oluşan enfeksiyonlarda antibiyotikler eskiden beri tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ancak düzensiz ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı balıklarda antibiyotiğe karşı olan direnci arttırmıştır (Robinson ve Meyer 1966, Katao 1982). Bercovier ve ark (1997) *L. garvieae*'ye karşı antibiyotiklerin in vitro şartlarda etkili olmalarına rağmen, dirençli suşların oluşması ve balıklarda meydana gelen iştahsızlığın antibiyotik alımına olumsuz yönde etki etmesinden dolayı in vivo şartlarda etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Gökkuşığı alabalıklarında *Lactococcosis* salgınlarını kontrol altında tutmak amacıyla genellikle Eritromisin, Amoksisilin, Oksitetrasiklin ve Doksisisiklin kullanıldığı rapor edilmiştir (Munday ve ark 1994). Farklı coğrafik kökenli *L. garvieae* suşları ile yapılan araştırmalarda suşların Enrofloksasin ve Nitrofurantoin'e karşı duyarlı, Oksolinik asit ve Sulfametoksazol-Trimetoprim'e karşı ise dirençli olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda Kloramfenikol, Oksitetrasiklin, Eritromisin ve Ampisilin'e karşı ise suşların kökenine göre farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (Ravelo ve ark 2001).

Türkiye'de ki salgınlarda *L. garvieae* suşlarının Eritromisin, Ofloksasin, Ampisilin ve Kloramfenikole karşı duyarlı olduğu gözlemlenirken, Penisilin ve Klindamisine karşı dirençli oldukları bildirilmiştir (Diler ve ark 2002).

Son yıllarda *Lactococcosis* ve *Streptococcosis* enfeksiyonlarında probiyotiklerin, lökosit sayısının artırılması ve fagositik aktivitenin artması sayesinde enfeksiyonu

engellediği tespit edilmiştir (Brunt ve Austin 2005). *L. garvieae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde bakteriyofajlarla da çalışmalar yapılmış fajların özellikle oral yolla alındıklarında mortalitede azalmaya yardımcı oldukları bildirilmiştir (Nakai ve ark 1999). Antiserumlar pasif bağışıklık yolu ile korumada kullanılmaktadır. Koyunlardan elde edilen serumlar suşlara karşı aşılama ile benzer sonuçlar göstermesine rağmen koruma süresinin daha kısa olduğu bildirilmiştir (Akhlaghi ve Munday 1996).

## 1.6. Koruma

Sihhi önlemler patojenlerin balık çiftliklerine girişini önlemede en önemli faktördür. Ölü balıkların ortamdaki hemen uzaklaştırılması, hasta balıkların stok yoğunluğu düşük kafeslerde veya havuzlarda bakımı, balıklara elle müdahalenin en aza indirilmesi, tankların periyodik olarak temizlenmesi, kullanılan alet ve ekipmanların formaldehit, kloramin-T, hidrojen peroksit gibi dezenfektanlar ile dezenfeksiyonu etkenin yayılmasını engelleyecek önemli tedbirlerdir. Ayrıca etkenin çiftliklere girişini engellemek için girişi yapılan yavru balık ya da yumurtaların hastalıktan arınmış olduğunun tespiti etkenin yayılmasını önlemede önemli bir tedbirdir (De Kinkelin ve ark 1991, Romalde 2004). Su ve sedimentlerin sihhi durumunun kontrolü ve tüm üretim birimlerinin düzenli olarak dezenfeksiyonu balık çiftliklerinin mikrobiyolojik kalitesinin kontrolünde faydalıdır (Brown 1993).

Etkenin oluşturacağı hastalığı önlemede fiziksel ve kimyasal parametrelerin kontrolü çok önemlidir. Sudaki oksijen miktarının azalması, amonyum konsantrasyonunun artması ve su sıcaklığının 15°C'nin üzerine çıkması hastalığın ortaya çıkmasında başlıca önemli sebeplerdir (Fukuda ve ark 1997, Hurtviz ve ark 1997). Balıkçıl kuşların çiftliklere girişini engellemek etkenin yayılmasını engellemede diğer bir önemli husustur (Romalde 2004).

Bazı kemoterapötik maddeler *L. garvieae*'ye karşı aktiviteye sahip olmasına rağmen, saha koşullarında terapötik önlemlerin genellikle etkisiz kaldığı bildirilmiştir. Bu nedenle aşılamanın *Lactococcus*'e karşı duyarlı populasyonun kontrolünde en iyi seçenek olduğu belirtilmiştir (Vendrell ve ark 2006).

Antiserumlar pasif bağışıklık yolu ile korumada kullanılmaktadır. Koyunlardan elde edilen serumlar suşlara karşı aşılama ile benzer sonuçlar göstermesine rağmen koruma süresinin daha kısa olduğu bildirilmiştir (Akhlaghi ve Munday 1996).

*Lactococcus* salgınlarının meydana geldiği işletmelerden elde edilen *L. garvieae* suşları ile inaktive aşılama geliştirilmiştir (Eldar ve ark 1995, Eldar ve ark 1997) ve İspanya'daki

işletmelerde yapılan çalışmalarda aşılınmış balıklardaki mortalite oranının, eritromisin ile tedavi edilen ve aşılınmamış balıklardaki mortalite oranına göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Aşılama, su sıcaklığı 15°C'nin üzerine çıkmadan 1 ay önce intraperitoneal yol ile yapılmalıdır. Balığı stresten uzak tutmak ve immun sistemi uyaran bir beslenme sağlamak balığı sağlıklı koşullarda korumak için önemlidir (Aizpurua ve Esnault 2000).

Son yıllarda farklı minerallerle adjuvant aşılar geliştirilmiştir. Anestezi altındaki balıklara intraperitoneal yöntemlerle uygulanan bu aşılar laboratuvar ve saha ortamında test edilmiştir. Aşılama genellikle basit bakterinlerle yapıldığında 3 hafta sonra, yağlı adjuvantlı aşı ile yapıldığında 4-5 hafta sonra tam korumaya ulaşılır. Koruma bakterinlerle gerçekleştirildiğinde 3-4 ay, adjuvant aşılarla yapıldığında 4-5 ay kadar sürer (Ghittino 1999, Vendrell ve ark 2004). Aşılama için en uygun zamanın balık ağırlığının 50 gr ve su sıcaklığının 12-14°C civarında seyrettiği dönem olduğu bildirilmiştir. (Ghittino ve Muzquiz 1998).

Araştırmamızda, kültür Gökkuşuğu alabalıklarında görülen Laktokokkozis'in fenotipik ve genotipik yöntemlerle tespiti, hastalık etkeni bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılığının ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada balıklarda ölüme neden olarak ekonomik kayıplara yol açan *Lactococcus garvieae* türlerinin moleküler bazda PCR yöntemi ile tanısının konabilmesi hedeflenmektedir. Böylece epidemiyolojik olarak balık ölümlerine ve ekonomik kayıplara neden olan *Lactococcus garvieae* etkenlerinin etkili ve güvenli bir yöntemle hızlı bir şekilde ortaya konması ve bu etkenlere bağlı kayıpların erkenden önlenmesi, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ile koruma ve kontrol çalışmalarının etkinliği sürecini de hızlandıracaktır.

Bu konu üzerinde konvansiyonel yöntemlerin dışında yapılan çalışmaların rutin olarak yapılamaması nedeniyle, araştırmamızın balık yetiştiriciliğine ve ülke ekonomisine katkısı açısından faydalı bir çalışma olacağı düşünülmektedir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Araştırma için Aydın ili ve çevresinde bulunan alabalık yetiştiriciliği yapılan 2 farklı çiftlikten alınan 100 adet 80 - 200 gr ağırlığındaki Gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) örnekleri soğuk zincirde Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirilmiştir.

Araştırmamız için ADÜ HADYEK'undan 12 Ağustos 2014 tarih ve 64583101/2014/093 sayılı yazıları ile etik kurul izni alınmıştır.

#### 2.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Solusyonlar, Ayıraçlar

##### 2.1.2.1. Besiyerleri

###### 2.1.2.1.1. İzolasyon Besiyerleri

###### 2.1.2.1.1.1. Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458)

Kazeinden Pepton	15 gr
Soymealden Peton	5 gr
Sodyum Klorür	5 gr
Agar agar	15 gr
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,1 – 7,5'e ayarlanarak, 121°C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğutulup içine aseptik koşullarda %7 oranında steril defibrine koyun kanı ilave edildi ve 12,5 ml olacak şekilde steril petri kaplarına döküldü (Holt ve ark 1994, Koneman ve ark 1997).

###### 2.1.2.1.1.2. Gliserollü Buyyon

%16'lık gliserollü buyyon

TSB (glukoz içermeyen)	1 gr
Gliserol	10 ml

Distile su	10 ml
------------	-------

Manyetik karıştırıcıda karıştırılır, eritilir. pH ölçülür ve 7.2'ye ayarlanır. 115°C'de 10 dakika otoklavlanır.

#### **2.1.2.1.1.3. Trypticase Soy Broth (TSB) (Oxoid)**

Pancreatic digest of caseing USB	17 gr
Pancreatic digest soybean meal	3 gr
NaCl	5 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5 gr
D-Glucose	2.5 gr
Distile su	1000 ml

Karışım hazırlanıp tüplere dağıtıldı ve otoklavlandı. Antibiyotiklere duyarlılığı belirlenecek *L. garvieae* kolonilerinin homojen hale getirilmesinde kullanıldı.

#### **2.1.2.1.1.4. Mueller Hinton Medium (Difco)**

Beef infusion	300 gr
Bacto-Casamino Acids Technical	17.5 gr
Starch	1.5 gr
Bacto-Agar	17 gr
Distile su	1000 ml

1000 ml distile suda 38 gr besiyeri çözdürülerek hazırlandı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

#### **2.1.2.2. Solusyonlar**

##### **2.1.2.2.1. TBE (Tris, Borik asit, EDTA, pH:8.0) Buffer**

###### *10X TBE Stok Solusyonu*

Tris Base	121,1 gr
Borik asit	61,83 gr
EDTA	5,84 gr



Solusyon hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve 121°C'de 15 dakika otoklav edilip, pH'sı 8'e ayarlanarak + 4°C'de buzdolabına kaldırıldı.

#### *0,5X TBE Kullanma Solusyonu*

10X TBE	50 ml
Distile su	950 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlandı.

#### **2.1.2.2.2. Tris (1M)**

Tris Base	121 gr
-----------	--------

800 ml distile suda 121 gr Tris Base çözdürülüp, yaklaşık olarak 60 ml hidroklorik asit ilave edilerek pH'sı 7.6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 15 dakika otoklav edildi.

#### **2.1.2.2.3. Gel Loading Buffer (6X)**

Bromfenol Mavisi	25 mg
Sükroz	4 gr
H <sub>2</sub> O	10 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlandı.

#### **2.1.2.2.4. NaCl (1M)**

NaCl	58,44 gr
Distile Su	800 ml

NaCl distile suda çözüldükten sonra son hacim 1000 ml' ye tamamlandı.

#### **2.1.2.2.5. TE Buffer (10mM Tris+ 1mM EDTA)**

Tris (1M)	10 ml
EDTA (0,5 M)	2 ml

Karışım hazırlanıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

### 2.1.2.3. Ayıraçlar

#### 2.1.2.3.1. Katalaz Testi

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

% 3

Katalaz, aerobik metabolizmaların hücrelerinde bulunan bir enzimdir. Koenzim olarak demir ve protoporfirin (hemin) içerir. Bu enzim, metabolik proseslerin ortaya çıkardığı toksik hidrojen peroksidi parçalar. İncelenecek kolonun bir kısmı steril öze ile kuru bir lam üzerine alınır. Üzerine katalaz ayracından 0,1 ml kadar bir damla damlatılır. Pozitif sonuçta bakteri kütlesi üzerinde gaz (oksijen) oluşumu gözlenirken, negatif reaksiyonda gaz çıkışı gözlenmez (Bilgehan 1995).

#### 2.1.2.3.2. Oksidaz Testi

NNN’N’ tetramethyl -p- phenylene-diamine dihydrochloride

Gram boyama sonrası pozitif görünen bakterilerin oksidaz aktiviteleri, oksidaz çubukları (Oxoid) ile bakıldı. Şüpheli bakterinin 18-24 saatlik saf kültürüne oksidaz çubuğunu daldırmak ve 25-30 saniye bekleyip, çubuğun eflatun mor renk alması pozitif, renk değişikliği olmaması da negatif reaksiyon olarak değerlendirilir (Bilgehan 1995).

### 2.1.3. PCR

#### 2.1.3.1. Kullanılan cihazlar

PCR işlemi 96 örnek kapasiteli Bio-Rad T 100 marka termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

#### 2.1.3.2. MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set

25 mM MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer 1 (100 mM (Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 10X Taq Buffer 2 ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> -MgCl<sub>2</sub>), 100mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas®) kullanıldı.

#### 2.1.3.3. Primerler

PCR yöntemiyle *L. garvieae*'nin tespit edilmesinde kullanılan primerler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** PCR amplifikasyonlarında kullanılan primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları (Mata ve ark 2004)

Primer Çifti	Oligonükleotiddizisi ( 5'-3')	Target Gen	Büyükük (bp)	Patojen
pLG-1	CATAACAATGAGAATCGC	16S rRNA	1.150	<i>L. garvieae</i>
pLG-2	GCACCCTCGCGGGTTG			

#### 2.1.4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Thermo marka elektroforez cihazında, görüntüleme işlemi ise Vilber Lourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

##### 2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)	2 g
TBE (0,5X)	100 ml

Şişe içerisindeki agarozun üzerine buffer ilave edildi ve karıştırıldı. Sonra mikrodalga fırında 3-5 dakika kadar kaynatılan karışım, 40-50°C'ye kadar soğutuldu. Karışım sıvı haldeyken jel kalıbının içerisine kabarcık bırakmayacak şekilde dökülerek içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirildi. 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılan jel donduktan sonra kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına yerleştirildi.

##### 2.1.4.2. Etidium Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka % 1'lik Ethidium Bromür 500 ml 0,5X TBE ile hazırlanan %2'lik agaroz jelin içerisine 5 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

##### 2.1.4.3. Marker

Marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas) kullanıldı.

#### **2.1.4.4. Pozitif Kontrol**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu çalışmalarında kullanılan *Lactococcus garvieae* türünün standart suşlarından purifiye edilen pozitif kontrol DNA'ları, Jose F. Fernandez-Garayzabal (Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain)'den temin edilmiştir.

#### **2.1.5. DNA Ekstraksiyon Kiti**

DNA ekstraksiyonu işleminde birçok mikroorganizmadan yüksek kaliteli genomik DNA'nın izolasyonu için dizayn edilmiş genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) kullanılmıştır.

### **2.2. Yöntem**

#### **2.2.1. Örneklerin Alınması**

Araştırma için alabalık yetiştiriciliği yapılan 2 farklı çiftlikten alınan 100 adet 80 - 200 gr ağırlığındaki Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) örnekleri soğuk zincirde Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirildi.

#### **2.2.2. *Lactococcus spp.* İzolasyonu**

Laboratuvara getirilen Gökkuşığı Alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) nekropsi yapılarak, karaciğer böbrek ve dalaktan %5 defibrine koyun kanlı Tyriptic Soy Agara (TSA) aseptik koşullarda ekimler yapıldı ve agar plakları 25°C'de 72 saat süreyle aerobik koşullarda inkübasyona bırakıldı (Mata ve ark 2004). Süre sonunda üreme şekillenen besiyerlerinden tipik  $\alpha$  hemoliz yapan koloniler seçilerek Gram boyama yapıldı. Gram boyama sonucunda belirlenen Gram pozitif kokların görüldüğü kolonilere oksidaz ve katalaz testi uygulanarak, oksidaz ve katalaz negatif reaksiyon veren suşlar *Lactococcus spp.* açısından şüpheli kabul edilerek, genotipik olarak tanımlanarak saklama besiyerine geçildi ve PCR çalışmaları için -20°C deep freeze'de saklandı.

#### **2.2.3. DNA İzolasyonu**

100 adet Gökkuşığı alabalığı örneklerinin iç organlarından yapılan ekimlerde elde edilen bakteri kolonileri toplandı ve *Lactococcus garvieae* olarak tanımlanarak saklandı.

DNA ekstraksiyonu aşamasına geçildi (Mata ve ark 2004). İzole edilen suşların DNA izolasyonu genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) ile prosedüre uygun olarak yapılmıştır. İzolasyonu yapılan DNA'lar PCR çalışmalarının yapılacağı zamana kadar cryo tüplerde -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

#### **Fermentas® DNA Isolation Kit Prosedürü:**

- Bir öze dolusu laktokok kültürü 400 µl lizis solusyonu ile süspanse edildi. 65°C'de 5 dakika inkübe edildi.
- 600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10.000 devirde 2 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
- 800 µl presipitasyon solusyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.
- 10.000 devirde 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solusyonunda çözdürüldü.
- 300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C'de bekletildi. 10.000 devirde 3 dakika santrifüj edildikten sonra %70'lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 5 µl template DNA kullanıldı.

#### **2.2.3.1. PCR İşlemi**

Mastermiks hazırlanışı: Araştırmamızda *Lactococcus garvieae* türünün identifikasyonu için yapılan PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, primerden 1 µM, her bir deoxynucleoside triphosphate'dan 0.25 mM ve 2 U of Taq DNA polymerase, 2 µl bakteriyel süspansiyondan ekstrakte edilmiş template DNA olacak şekilde gerçekleştirildi (Mata ve ark 2004). Kullanılan malzemeler ve miktarları Çizelge 2.2'de belirtilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Mastermiks hazırlanma miktarları (Mata ve ark 2004)

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Miktar ( $\mu$ l)
Taq Buffer 1(+KCl,- MgCl <sub>2</sub> ) (10X)	3 $\mu$ l
Taq Buffer 2 (+NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - MgCl <sub>2</sub> ) (10X)	3 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4 $\mu$ l
dNTP (2mM)	1 $\mu$ l
Primer 1 (pLG-1)	1 $\mu$ l
Primer 2 (pLG-2)	1 $\mu$ l
Pfu DNA Polimeraz (5U)	0.4 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	34.6 $\mu$ l
Template DNA (200 nM)	2 $\mu$ l
<b>TOPLAM</b>	50 $\mu$ l

Mastermiks hazırlandıktan sonra örnek adedi kadar numaralandırılan 0,2  $\mu$ l'lik tüplerin içlerine 48'er  $\mu$ l mastermiks ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'lardan ilgili tüplerin içerisine 2'şer  $\mu$ l eklenip ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra ısıl döngüleme cihazına yüklendi ve *pLG-1* ve *pLG-2* primerlerine özgü hazırlanan mastermiks PCR analizlerinde kullanılan ısıl döngü ve süre diyagramına göre programlandı. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı (Mata ve ark 2004) Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.3.** PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı (Mata ve ark 2004)

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon	30	92°C	1 dk
Bağlanma		57°C	1 dk
Uzama		72°C	1,5 dk
Son Uzama	1	72°C	7 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

#### 2.2.3.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

0,2 mL tüplerde oluşturulan 50 µl' lik PCR ürünleri pipet ile 10'ar µl alınıp, 3 µl 6x gel loading buffer ile karıştırıldı. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, % 2'lik agaroz jeldeki kuyucuklara sırayla yüklendi.

#### 2.2.3.3. Jelde Yürütme

Hazırlanan jele markerların ve örneklerin sırayla yüklenmesinden sonra elektroforez tankının kapağı kapatıldı ve elektrotlar cihaza bağlandıktan sonra 80V 500A akımda 40 dakika yürütüldü.

#### 2.2.3.4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin tamamlandıktan sonra dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarılan jel, bilgisayara bağlı durumdaki görüntüleme cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirildi.

Değerlendirme daha önce bildirilen şekilde, PCR analizinde *pLG-1* ve *pLG-2* primeri için 1.150 bp uzunluğundaki bant oluşumları aranacak şekilde gerçekleştirildi.

#### 2.2.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmada izole edilen suşlara yapılacak antibiyotik duyarlılık testlerinde Penisilin G, Florfenikol, Amoksisilin-Klavulonik asit, Ampisilin, Sefoperazon, Eritromisin, Metisilin, Gentamisin, Oksasilin ve Kloksasilin etken maddelerini içeren antibiyotik diskleri kullanıldı.

Antibiyotik duyarlılık testleri Kirby Bauer Disk Diffüzyon yöntemine göre yapıldı. İzole edilen suşlar içinde 1 ml TSB bulunan tüplere McFarland No:1 yoğunluğunda ekilerek 37°C'de 24 saat inkube edildi. Elde edilen buyyon kültürlerinden pipet yardımıyla 0.1 ml alınarak Mueller Hinton agar petrilere cam bagelele yayıldı ve kurumaya bırakıldı. Standart antibiyotik diskleri (Oxoid) 8 kartuşlu antibiyotik disk dispenser cihazı yardımıyla petri üzerine yerleştirildi. Petriler 37°C'de 18 saat inkube edildikten sonra her diskin çevresindeki inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçülerek, standartları ile karşılaştırıldı (Bilgehan 1995). Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin standart zon çapları Çizelge 2.4.'de verilmiştir (CLSI 2002, 2003).

**Çizelge 2.4.** Standart zon çapları (CLSI 2002, 2003)

Antimikrobik Madde	Disk İçeriği (µg)	İnhibisyon Zon Çapları / mm		
		Dirençli	Orta Duyarlı	Duyarlı
Penisilin G	10	≤ 14	-	≥ 15
Amoksisilin-Klavulonik asit	20/10	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Ampisilin	10	≤ 16	-	≥ 17
Sefoperazon	30	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Eritromisin	15	≤ 13	14 - 22	≥ 23
Metisilin	5	≤ 9	10 - 13	≥ 14
Gentamisin	10	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Oksasilin	1	≤ 10	11 -12	≥ 13
Kloksasilin	5	≤ 10	11 -13	≥ 14
Florfenikol	30	≤ 14	15 - 18	≥ 19



## 3. BULGULAR

### 3.1. İzolasyon Bulguları

Araştırma için Aydın ili ve çevresinde bulunan alabalık yetiştiriciliği yapılan 2 farklı çiftlikten alınan 100 adet 80 - 200 gr ağırlığındaki Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) örnekleri soğuk zincirde Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirilmiştir. Gelen örnekler nekropsi yapılarak %7 defibrine koyun kanlı TSA agar karaciğer böbrek ve dalaktan ekimler yapılmıştır. İnkubasyon süresi sonunda ekim yapılan agarda şekillenen  $\alpha$  hemoliz yapan koloniler, Gram boyama yöntemi ile boyanıp, morfolojik olarak mikroskop altında incelenmiştir. Gram boyama sonucunda mikroskopta Gram pozitif olarak belirlenen koklara ait olan kolonilere katalaz ve oksidaz testi uygulanmıştır (Holt ve ark 1994, Koneman ve ark 1997). Katalaz ve oksidaz negatif olan koloniler, *Lactococcus spp.* şüpheli koloniler olarak tanımlanmıştır.

Araştırmamızda 2 farklı çiftlikten toplanan 100 adet 80 - 200 gr ağırlığındaki Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) örneğin 34'ünden *Lactococcus spp.* izole edilmiştir.

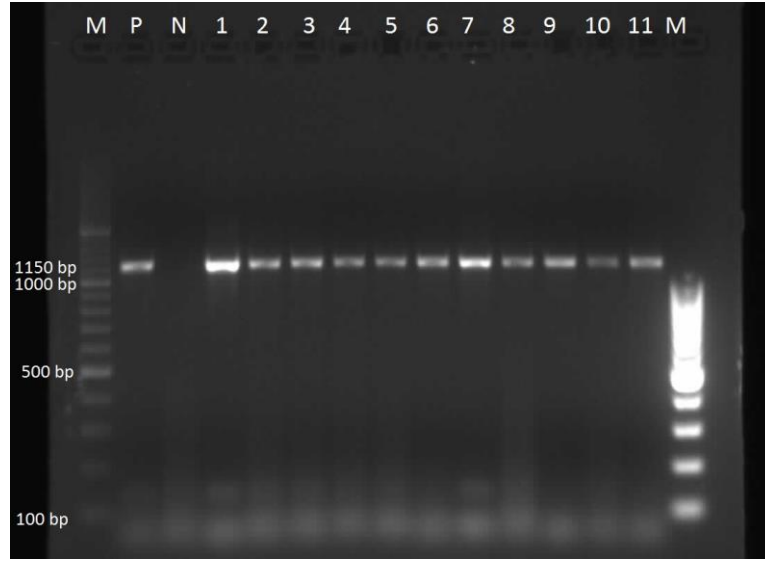
### 3.2. PCR Bulguları

Bu tez çalışması alabalık yetiştiriciliği yapılan 2 farklı çiftlikten toplanan 100 adet 80 - 200 gr ağırlığındaki Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) örneklerinde yapılan PCR çalışmalarından toplam 34 adet *Lactococcus garvieae* tanımlanmıştır.

PCR çalışması sonucunda tanımlanmış hedef patojenlerin toplam örneklerin % 34'ünden *Lactococcus spp.* tanımlanmıştır.

PCR ile elde edilen elektroforez görüntüleri Şekil 3.1.'de gösterilmektedir.

**Şekil 3.1.** PCR pozitif örneklerin elektroforez görüntüsü **M:**100 bp DNA ladder, **P:** *L. garvieae* pozitif kontrol, **N:** Negatif kontrol, **1-11:** *L. garvieae* PCR pozitif örnekler



PCR ile yapılan identifikasyonlarda hedef patojen türlerinin çiftlik bazındaki dağılımları incelendiğinde, 1. çiftlikten alınan 45 alabalık örneğinden *L. garvieae* identifikasyonu yapılamamış olup, 2. çiftlikten alınan 55 alabalık örneğinin 34'ünden *L. garvieae* identifiye edilmiştir.

### 3.3. Antibiyotik Duyarlılık Bulguları

İzole ve identifiye edilen *L. garvieae* suşlarına yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda Amoksisilin - Klavulanik asit'e % 90 oranında duyarlı, Florfenikol'e % 65 oranında orta derecede duyarlı, Oksasilin'e % 94, Sefaperazon'a % 62, Ampisilin'e % 76, Penisilin G'ye % 88, Gentamisin'e % 50, Kloksasilin'e % 44, Eritromisin'e % 80 ve Metisilin'e karşı ise % 88 oranlarında dirençli olarak tespit edilmiştir.

Elde edilen antibiyogram sonuçları Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** İzole ve identifiye edilen *L. garvieae* suşlarının disk difüzyon test sonuçları

<i>L. garvieae</i> Suşları	AMC	OX	CFP	AMP	P	CN	OB	E	MET	FFC
1	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I
2	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
3	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I
4	S	R	R	R	R	R	I	R	R	S
5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
6	S	R	S	S	S	S	S	I	R	I
7	S	R	R	R	R	S	S	I	I	S
8	S	I	R	R	R	I	S	R	R	I
9	S	I	R	S	R	I	S	R	R	I
10	S	R	R	R	R	R	I	I	R	I
11	S	R	I	R	R	I	R	R	R	I
12	S	R	R	R	S	I	S	R	R	I
13	S	R	R	R	R	R	I	I	R	I
14	R	R	I	R	R	R	R	R	R	S
15	S	R	R	R	R	R	R	R	I	I
16	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R
17	S	R	I	R	R	R	R	R	R	I
18	S	R	R	R	R	S	R	I	R	I
19	S	R	I	R	R	S	I	I	R	I
20	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I
21	S	R	S	S	S	S	S	R	R	I
22	S	R	I	R	R	R	R	R	R	S
23	S	R	R	R	R	I	R	R	I	S
24	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
25	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I
26	S	R	S	S	R	R	I	R	R	I
27	S	R	I	R	R	R	I	I	R	I
28	S	R	I	R	R	I	I	R	R	I

<i>L. garvieae</i> Suşları	AMC	OX	CFP	AMP	P	CN	OB	E	MET	FFC
29	S	R	R	R	R	I	I	R	R	I
30	S	R	I	S	R	R	R	R	R	R
31	S	R	R	R	R	I	I	R	R	S
32	S	R	I	S	R	I	I	R	I	I
33	S	R	R	S	R	R	I	R	R	S
34	S	R	S	S	S	S	S	R	R	I

AMC: Amoksisilin - Klavulanik asit, OX: Oksasilin, CFP: Sefaperazon, AMP: Ampisilin, P: Penisilin G, CN: Gentamisin, OB: Kloksasilin, E: Eritromisin, MET: Metisilin, FFC: Florfenikol

#### 4. TARTIŞMA

Gram pozitif koklardan Streptokok ve Laktokoklar tüm Dünya üzerinde balık patojenleri olarak tanımlanmaktadır. Gram pozitif koklar *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus difficilis*, *Lactococcus garvieae* gibi birkaç farklı türü içerir. Bu türler Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) streptokokkosis ve laktokokkosisin majör etkenleri olarak bilinmektedir (Sudheesh ve ark 2012).

*Lactococcus garvieae*, Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*), Tilapya (*Oreochromis sp.*), Japon Yılan balığı (*Anguilla japonica*), Pisi (*Paralichthys olivaceous*), Kefal (*Mugil cephalus*), Siyah Kayabalığı (*Sebastes schlegeli*), Kral balığı (*Seriola lalandi*) ve dev tatlı su karidesi (*Macrobrachium rosenbergii*) gibi türlerden hastalığa neden olan etken olarak izole edilmiştir (Kusuda ve ark 1991, Prieta ve ark 1993, Chen ve ark 2001, Lee ve ark 2001, Chen ve ark 2002, Ravelo ve ark 2003, Colorni ve ark 2003, Kang ve ark 2004, Kawanishi ve ark 2005).

Gökkuşığı alabalıklarında hastalığa bağlı ölüm oranlarının diğer balıklarla göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Ghittino ve Muzquiz 1998). *L. garvieae* ile yapılan patojenite çalışmalarında genç balıklarda (50 gr) erişkin balıklara (100 gr) göre akut formun daha uzun süre devam edip mortalitenin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Muzquiz ve ark 1999). Günümüzde Gökkuşığı alabalığı çiftliklerinde ki doğal enfeksiyonlarda 5 gr'lık balıktan 1 kg. ve üzeri balıkların tümünün *Lactococcosis*'ten etkilendiği görülmüştür (Diler ve ark 2002, Pereira ve ark 2004).

*L. garvieae* Türkiye'de sadece tatlı su ve deniz ortamındaki alabalık çiftliklerinden izole edilmiştir (Diler ve ark 2002, Kav ve Erganiş 2007, Tanrıkul ve Gültepe 2011). Ancak varlığı Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*), Levrek (*Dicentrarchus labrax*), Kalkan (*Psetta maxima*) gibi diğer balık türleri için rapor edilmemiştir. *Aeromonas salmonicida* (Ewart ve ark 2008), *Vibrio anguillarum* (Munro ve ark 1995), *viral hemorrhagic septicemia virus* (Işidan ve Bolat 2011), ve *Scuticociliate spp.* (Iglesias ve ark 2001) gibi bir çok bakteri, virüs ve parazit yetiştiriciliği yapılan Kalkan (*Psetta maxima*) için rapor edilmiş olsada *L. garvieae* henüz rapor edilmemiştir (Türe ve ark 2014). Türe ve ark (2014) yaptıkları çalışmada *L.garvieae*'nin Karadeniz alabalıkları için önemli bir patojen olduğunu ancak Levrek ve Kalkanın *L.garvieae*'ye karşı dirençli olduğunu rapor etmişlerdir.

Su sıcaklığının artışı hastalığın ortaya çıkmasında önemli bir rol oynamaktadır. Su sıcaklıklarının 14-15°C'yi aştığı yaz aylarında akut salgınların meydana geldiği bildirilmiştir (Prieta ve ark 1993, Ghittino ve Muzquiz 1998). Olumsuz çevre koşulları, kötü bakım şartları, yem kalitesi ve yetersiz oksijen gibi faktörler etkenin yayılmasına ve virulansın artmasına neden olmaktadır (Fukuda ve ark 1997). Marmara Bölgesi'nde bir işletmede su sıcaklığının arttığı Haziran ayında yapılan çalışmada işletmedeki alabalıklarda hastalığın görüldüğü ve yüksek mortaliteye sebep olduğu rapor edilmiştir. Enfekte balıklarda tek veya çift taraflı ekzoftalmus, korneada opaklaşma yanı sıra gözlerde hemoraji, erime ve göz kaybı, viseral organlarda ve yağ dokuda hiperemi, karın boşluğunda kanlı sıvı birikimi tespit edildiği bildirilmiştir (Timur ve ark 2011).

Diler ve ark (2002), %80'e varan mortalite görülen üç farklı alabalık çiftliğindeki balıkların değişik organlarından besi yerlerine ekim sonucu *L. garvieae*'yi izole etmişler ve alabalıklarda bilateral ekzoftalmus, deri renginin koyulaşması, anüste hemorajiler, kuyruk ve pektoral yüzgeçlerde kanamalar, karında kanlı asites, karaciğer, dalak, böbrek ve bağırsaklarda hemoraji görmüşlerdir.

Kav ve Erganiş (2007) Konya ili ve çevresindeki çiftliklerde yaptıkları araştırmalarda pop eye sendromu ile seyreden *Streptococcus* hastalığının etkeninin *L. garvieae* olduğunu, suşların fenotipik özelliklerinin homojen olduğunu, saha suşlarının fenotipik özellikleri ile referans suşların fenotipik özellikleri arasında farklılıklar olduğunu, *L. garvieae*'nin API 20 Strep ile identifikasyonda %66.4 oranında *L. lactis subsp lactis*, %29.1 oranında *E. faecalis*, %3.7 oranında *E. faecium*, %0.9 oranında da *E. durans* olarak tanımlendiğini ve identifikasyonda bunların göz önünde bulundurulması gerektiğini bildirmişlerdir. Yapmış oldukları araştırmada 2002-2004 yılları arasında Konya ili ve çevresindeki alabalık çiftliklerinden 180 adet hasta balıktan 30 adet *Lactococcus garvieae* suşu izole etmişlerdir. Bu izolatların 32'sinde pLG-1 ve pLG-2 primerleri ile PCR'da 1100 bp'de tür spesifik bantları görmüşlerdir.

Timur ve ark (2011), 2010 yılında Marmara bölgesindeki bir gökkuşuğu alabalığı işletmesinden 150-180 gram ağırlığındaki 5 adet balıktan API 20 Strep kiti ile *L. garvieae* izole ettiklerini bildirmişlerdir (Timur ve ark. 2011).

İtalya'da 10 adet alabalık örneğinden yapılan bir çalışmada (Zlotkin ve ark 1998), 7 adet örnekte, patojen *L. garviae* izole edilmiştir. Yine bu çalışmada, *L. lactis* ile *L. garviae*

arasında fenotipik benzerlikler olduğu ortaya konmuştur. İtalya'da yapılan bir diğer çalışmada ise (Eldar ve ark 1999), alabalıklarda farklı zamanlarda görülen 100'den fazla salgında 71 adet *L. garviae* izole edilmiştir. Ülkemizde ilk kez 2001 yılında Ege bölgesindeki gökkuşuğu alabalığı çiftliklerinde *L. garviae* izole edilmiştir.

Özer ve ark (2008), Ocak - Aralık 2005 yılında Mersin ili ve çevresinden 260 gökkuşuğu alabalık örneği toplamışlardır. Bu gökkuşuğu alabalıklardan 63 (%24,23)'ünde Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif kok izole etmişlerdir. Çalışmada 1 suş canlandırılmamış ve 62 adet alabalığın 24 (%38,7) ünden *L. garviae* izole ettiklerini bildirmektedirler.

Baeck ve arkadaşları (2006), Mayıs 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada 22 alabalık örneği toplamışlar ve multipleks PCR ile *S. İniae*, *S. parauberis*, *L. garviae* varlığını incelemişlerdir. 3 izolat *L. garviae* identifiye etmişlerdir.

Ege bölgesinde *L. garviae*'nin ilk kez 2001 yılında izole edildiği bilinmektedir. Ege bölgesinde en son yapılan çalışmalar incelendiğinde *L. garviae*'nin görülme oranının % 52'ye kadar çıktığı bildirilmektedir (Gürpınar 2013). Çalışmamızda elde edilen izolasyon oranımızın daha düşük (%36) çıkmasının nedeninin çiftliklerde ki bakım koşullarından dolayı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda elde edilen 34 izolata Penisilin G, Florfenikol, Amoksisilin-Klavulonik asit, Ampisilin, Sefoperazon, Eritromisin, Metisilin, Gentamisin, Oksasilin ve Kloksasilin etken maddelerini içeren antibiyotik diskleri kullanılarak disk diffüzyon yöntemi ile antibiyogram testi uygulanmıştır. Test sonucunda suşlar Amoksisilin - Klavulanik asit'e % 90 oranında duyarlı, Florfenikol'e % 65 oranında orta derecede duyarlı, Oksasilin'e % 94, Sefaperazon'a % 62, Ampisilin'e % 76, Penisilin G'ye % 88, Gentamisin'e % 50, Kloksasilin'e % 44, Eritromisin'e % 80 ve Metisilin'e karşı ise % 88 oranlarında dirençli olarak tespit edilmiştir.

Kuzey İtalya'da klinik izolatlarından yapılan çalışmalarda *L. garviae* suşlarının Ampisilin, Amoksisilin, Oksitetrasiklin ve Eritromisine karşı duyarlı olduğu belirtilirken, Oksolinik asit, Streptomisin, Trimethoprim ve Sulfadiazine karşı dirençli olduğunu saptamıştır (Mazzolini ve ark 2003). Kubilay ve ark (2005) yaptıkları çalışmada *L. garviae* suşlarının Amoksisilin - Klavulanik asit, Enrofloksasin, Tetrasiklin, Doksisisiklin, Kloramfenikol, Eritromisin ve Nitrofrantoin gibi antibiyotiklere karşı duyarlı olduklarını,

Kanamisin, Penisilin, Sefuroksim, Siprofloksasin, Klindamisin, Trimetoprim - Sulfametoksazol gibi antibiyotiklere karşı dirençli olduklarını bildirmişlerdir.

Farklı coğrafik kökenli *L. garvieae* suşları ile yapılan çalışmalarda suşların tümünün Enrofloksasin ve Nitrofurantoin'e duyarlı olduğu, Oksolinik asit ve Trimetoprim – Sulfametoksazol'e karşı ise dirençli olduğu gözlemlenirken, Eritromisin, Kloramfenikol, Oksitetrasiklin ve Ampisiline karşı ise sonuçların suşların kökenine göre değişken olduğu görülmüştür (Ravelo ve ark 2001).

Altun ve ark (2012)'de yaptıkları çalışmada *L. garvieae* suşlarının Oksitetrasiklin, Eritromisin, Amoksisilin ve Florfenikol'e karşı direnç geliştirdiklerini rapor etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise *L. garvieae* suşlarının aynı şekilde Oksitetrasiklin'e karşı dirençli olduğunu ancak Amoksisilin'e karşı duyarlı, Florfenikol ve Eritromisin'e karşı orta seviyede duyarlı olduğunu bildirilmiştir (Didinen ve ark 2014).

Yapılan diğer bir çalışmada *L.garvieae* 'nin Ampisilin'e Eritromisin, Oksitetrasiklin ve Amoksisilinden daha duyarlı olduğunu bildirilmiştir (Kum ve ark 2004). İran'da yapılan bir çalışmada Sharifiyazdi ve ark (2010) *L. garvieae* suşlarının Eritromisin, Kloramfenikol, Sülfadiazin, Klaritromisin, Enroflaksin'e karşı duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Yine aynı çalışmada Oksitetrasiklin gibi antibiyotiklerin yanlış kullanımından ve günümüzde bu antibiyotiğin direnç geliştiren genler karşısında neredeyse tamamen etkisiz olduğundan bahsedilmiştir. Araştırmamızda da diğer çalışmalara benzer olarak Amoksisilin - Klavulanik asit'e karşı yüksek oranda duyarlılık saptanmasına rağmen, diğer antibiyotiklere karşı direnç gelişimi belirlenmiştir.

Kusuda ve Salati (1999) işletmelerde tedavi sırasında iyi bir besleme, hijyenik şartlar ve stok yoğunluğunun düzenlenmesi gerektiğini vurgulamışlar ve suşlarda ilaç dirençliliğinin görülmesinden dolayı sahada gelişmiş güzel kemoteropatik kullanımdan kaçınılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Özellikle entansif balık yetiştiriciliği ülkemizde günden güne artmaktadır. Bu süreç içerisinde tüm hayvancılık sektöründe olduğu gibi bilinçli yetiştiricilik ve uygun tedavi koşullarının geliştirilmesi ve aynı zamanda da koruyucu hekimliliğinde ön planda tutulması gerekmektedir. Bu doğrultu da yapılan çalışmalar ile bakteriyel hastalıkların tespiti ve doğru antibiyotik seçimine katkıda bulunulması önem arz etmektedir.



## 5. SONUÇ

Türkiye’de alabalık yetiştiriciliği 1970’li yıllardan itibaren çeşitli kültür sistemleriyle yapılmaya başlanmış olup günümüz kadar önemli gelişmeler göstermiştir. Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan en yaygın tür Kuzey Amerika kökenli olan Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)’dir.

*Lactococcus garvieae*, özellikle yaz aylarında su sıcaklıklarının artmasıyla, deniz ve tatlı su balıklarında septisemi ile meningoensefalitis etkeni olan ve ciddi ekonomik kayıplara yol açan Gram pozitif bir patojendir.

Araştırmamızda alabalık yetiştiriciliği yapılan 2 farklı çiftlikten toplanan 100 adet 80 - 200 gr ağırlığındaki Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) örneklerinde yapılan PCR çalışmalarından toplam 34 adet *Lactococcus garvieae* identifiye edilmiştir. Elde edilen 34 izolata Penisilin G, Florfenikol, Amoksisilin-Klavulonik asit, Ampisilin, Sefoperazon, Eritromisin, Metisilin, Gentamisin, Oksasilin ve Kloksasilin etken maddelerini içeren antibiyotik diskleri kullanılarak disk diffüzyon yöntemi ile antibiyogram testi uygulanmıştır. Test sonucunda suşlar Amoksisilin - Klavulanik asit’e % 90 oranında duyarlı, Florfenikol’e % 65 oranında orta derecede duyarlı, Oksasilin’e % 94, Sefaperazon’a % 62, Ampisilin’e % 76, Penisilin G’ye % 88, Gentamisin’e % 50, Kloksasilin’e % 44, Eritromisin’e % 80 ve Metisilin’e karşı ise % 88 oranlarında dirençli olarak tespit edilmiştir.

Yapılan bu çalışmada bölgemizde bulunan alabalık çiftliklerinde görülen *Lactococcus* hastalığında rol alan en önemli etkenlerden biri olan *L. garvieae* bakterisi gerek konvansiyonel gerekse de moleküler yöntemler aracılığı ile tespit edilmiş ve de ticari olarak kullanımda olan bir çok antibiyotiğe karşı olan duyarlılıkları saptanmış olup, hem yetiştiriciliğe hem de literatür bilgiye bir katkıda bulunulmuştur.

## ÖZET

### **Gökkuşığı Alabalıklarından *Lactococcus garvieae* İdentifikasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması**

Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıklar, üretim ve ticareti sınırlayan en önemli etken olarak bilinmektedir. Bilindiği üzere su ürünleri yetiştiriciliğinde yaklaşık son 20 yılda hızlı bir büyüme gerçekleşmiştir. Bu hızlı büyüme sürecinde çevresel etkileşimlerle birlikte bakteriyel, viral, fungal ve paraziter hastalıklarda da artış meydana gelmiştir. Bu hastalık etkenleri biyolojik çeşitliliği ve dolayısıyla sürdürülebilir büyümeyi önemli ölçüde etkileyen ekosistemin ayrılmaz unsurlarıdır. Yüksek stoklama yoğunluğu ile birlikte strese yol açan çevresel faktörler salgın hastalıkların ortaya çıkmasına, kültür ve doğal ortam arasında su değişimi yoluyla bu hastalıkların doğal türlere bulaşmasına yol açabilmektedir.

*Lactococcus garvieae*, Gökkuşığı alabalıklarında laktokokkozisin etiyolojik etkeni olup en önemli Gram pozitif patojenik kok türleri arasında yer almaktadır. Araştırmamızda, kültür gökkuşığı alabalıklarında görülen Laktokokkozis'in genotipik yöntemlerle tespiti, hastalık etkeni bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılığının ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Aydın ili ve çevresinde bulunan kültür balıkçılığı yapan işletmelerden rastgele toplanan 100 adet Gökkuşığı alabalığı örneği soğuk zincirde Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvara getirilen balık örnekleri tekniğine uygun olarak açılıp karaciğer, kalp ve böbrek organlarından Tryptic Soy agara ekimleri yapılarak *L. garvieae* suşları genotipik yöntemlerle izole edilmiştir. PCR aşaması sonrasında *L. garvieae* olarak identifiye edilen etkenlerinin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için disk difüzyon yöntemi ile Penisilin G, Florfenikol, Amoksisilin-Klavulonik asit, Ampisilin, Sefoperazon, Eritromisin, Metisilin, Gentamisin, Oksasilin ve Kloksasilin kullanılmıştır.

Çalışmada identifiye edilen *L. garvieae* suşlarının Amoksisilin - Klavulanik asit'e % 90 oranında duyarlı, Florfenikol'e % 65 oranında orta derecede duyarlı, kullanılan diğer antibiyotiklere karşı dirençli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Lactococcus garvieae*, Gökkuşığı alabalığı, identifikasyon, antibiyogram, PCR

## SUMMARY

### **Identification of *Lactococcus garvieae* from Rainbow Trout and Investigation of Susceptibility to Antibiotics**

Diseases in aquaculture are known as the most important factor for limiting production and trade. As known, it has been a rapid growth in aquaculture for over the last 20 years. During this rapid growth period, there has been an increase in bacterial, viral, fungal and parasitic illnesses together with environmental interaction. These disease factors are inseparable elements of the ecosystem largely affecting biodiversity and thus sustainable growth. Environmental factors causing stress along with high stocking density can bring about the emergence of epidemics and culture and transmission of these diseases to natural species through water exchange between cultural and natural environment.

*Lactococcus garvieae* is an etiological factor of Lactococcosis in Rainbow trouts and is among the most important pathogenic Gram positive cocci species. In our research, it is aimed to determine the Lactococcosis encountered in culture Rainbow trouts via genotypic methods and put forth the antibiotic susceptibility of disease determinant bacterial strains.

In this study, 100 samples of Rainbow trouts gathered from businesses in and around Aydin city managing culture fishing has been brought to Adnan Menderes University Veterinary Faculty Department of Microbiology Routine Diagnosis Laboratory through cold chain. Fish samples which are brought to the laboratory has been technically opened and by planting Tryptic Soy agar from their livers, hearts and kidneys, their *Lactococcus garvieae* strains have been isolated via genotypic methods. After the PCR process, Penicillin G, Florfenicol, Amoxicillin - Clavulonic acid, Ampicillin, Cefoperazone, Erythromycin, Methicillin, Gentamicin, Oxacillin and Cloxacillin has been used with disc diffusion method in order to determine the antibiotic susceptibility of the factors identified as *Lactococcus garvieae*.

It's concluded that *L. garvieae* strains identified in the study are 90 % susceptible to Amoxicillin – Clavulanic acid, 65 % intermediate susceptible to Florfenicol and resistant to other antibiotics used.

**Key words:** *Lactococcus garvieae*, Rainbow trout, identification, antibiogram, PCR

## KAYNAKLAR

- Afonso A, Silva J, Gomes S *Lactococcus garvieae* Trout Infections in Portugal: A New Challenge on Fish Vaccinology. IBMC News, February, 4–6, 2003.
- Aizpurua J, Esnault F Revista de Acuicultura Trouvit Informa. Invierno, 21–3, 1999/2000.
- Akhlaghi M, Munday BL, Whittington RJ Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). J Fish Dis 19:251–8, 1996.
- Akinbowale OL, Peng H, Barton MD Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. J. Appl. Microbiol., 100: 1103-1113, 2006.
- Altun S, Onuk EE, Çiftçi A, Büyükekiz AG Duman M Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, 19, 375-381, 2012.
- Anonim 1 Yearbook, Fishery and Aquaculture Statistics FAO . Rome, 2007.
- Anonim 2 <http://www.reismakina.com/guncel/keban-alabalik-isletmeleri-tunca-kaya-bey-ile-yapilan-roportaj-8436.html> Erişim tarihi: 11.08.2015
- Anonim 3 <http://www.xn--krinfo-wxa.hu/drupal/node/12532> Erişim tarihi: 27.07.2015
- Aubin GG, Be'mer P, Guillouzouic A, Cre'met L, Touchais S, Fraquet N, Boutoille D, Reynaud A, Lepelletier D, Corvec S First Report of a Hip Prosthetic and Joint Infection Caused by *Lactococcus garvieae* in a Woman Fishmonger Journal of Clinical Microbiology, p. 2074–2076, Vol. 49, No. 5, 2011.
- Austin B, Austin DA Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish, Third (Revised) Edition, Praxis Publishing Chichester, U.K., 457 s, 1999.
- Austin DA, Robertson PAW, Austin B Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) System. Appl. Microbiol. 26:127–131, 2003.

- Avcı H, Aydoğan A, Tanrikul TT, Birincioğlu SS Pathological and Microbiological Investigations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Naturally Infected with *Lactococcus garvieae* Kafkas Univ Vet Fak Derg 16 S313-S318, 2010.
- Axelsson L Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In Salminen S, Von Wright A, eds. Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects, (2); 1–72. Marcel Dekker Inc; New York, 1998.
- Baeck GW, Kim JH, Gomez DK, Park SC Isolation and Characterization of *Streptococcus* sp. From Diseased Flounder (*Paralichthys olivaceous*) in Jeju Island. J. Vet. Sci., 7, 53–58, 2006.
- Barakat RK, Griffiths MW, Haris LJ Isolation and Characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from Cooked, Modified Atmosphere, Packaged, Refrigerated, Poultry Meat. Int. J. Food Microbiol., 62, 83–94, 2000.
- Bark S, Mc Gregor D The First Occurrence of Lactococcosis in Farmed Trout in England. Trout News, 31, 9–11, 2001.
- Barnes AC, Guyot C, Hansen BG, Horne MT, Ellis AE Antibody increases phagocytosis and killing of *Lactococcus garvieae* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) macrophages. Fish & Shellfish Immunol. 12:181–186, 2002.
- Bercovier H, Ghittino C, Eldar A Immunization with Bacterial Antigens: Infection with *Streptococci* and Related Organisms. Dev. Biol. Stand., 90, 153–160, 1997.
- Bilgehan H Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, İzmir, pp. 509-516, 1995.
- Brown L Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. Oxford: Pergamon press Ltd.; 1993.
- Brunt J, Austin B Use of a Probiotic to Control Lactococcosis and *Streptococcosis* in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis., 28, 693–701, 2005.
- Burka JF, Hammell KL, Horsberg TE, Johnson GR, Rainnie DJ, Speare DJ Drugs in salmonid culture - a review. J. Vet. Pharmacol. Ther., 20: 333-349, 1997.

Burr SE, Pugovkin D, Wahli T, Segner H, Frey J Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiol.* 151:2111–2118, 2005.

Carvalho MG, Vianni MC, Eliot JA, Reeves M, Facklam RR, Teixeira LM Molecular Analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* Isolated from Water Buffalos with Subclinical Mastitis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 418, 401–404, 1997.

Chang PH, Lin CW, Lee YC *Lactococcus garvieae* Infection of Cultured Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and Associated Biophysical Characteristics and Histopathology. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22, 319–327, 2002.

Chen SC, Lin YD, Liaw LL, Wang PC *Lactococcus garvieae* Infection in The Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* Confirmed by Polymerase Chain Reaction and 16S rDNA Sequencing. *Dis. Aquat. Org.*, 45, 45–52, 2001.

Chen SC, Liaw LL, Su HY, Ko SC, Wu CY, Chaung HC *Lactococcus garvieae*, a Cause of Disease in Grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. *J. Fish Dis.*, 25, 727–732, 2002.

Cheng W, Chen JC Effect of Cultivation Broth pH, Temperature and NaCl Concentration on Virulence of an *Enterococcus*-like Bacterium to The Giant Freshwater Prawn. *Dis. Aquat. Org.*, 36, 233–237, 1999.

Cheng W, Liu CH, Chen JC Effect of Nitrite on Interaction Between The Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its Pathogen *Lactococcus garvieae*. *Dis. Aquat. Org.*, 50, 189–197, 2002.

CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard, CLSI Document M31-A2, second ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2002.

CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard CLSI Document M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, 2003.

Colorni A, Ravelo C, Romalde JL, Toranzo AE Diamant a *Lactococcus garvieae* in Wild Red Sea Wrasse *Coris aygula* (Labridae). *Dis. Aquat. Org.*, 56, 275–278, 2003.

Çelikkale MS İç su balıkları ve yetiştiriciliği, Cilt 1, 3. Baskı, 2002.

De Kinkelin P, Michel CH, Ghittino P Tratado de Las Enfermedades de Los Peces, Editorial Acribia, Zaragoza, 1991.

Deshmukh S, Raida MK, Dalsgaard I, Chettri JK, Kania PW, Buchmann K Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet. Immunol. and Immunopathol. 145:379–385, 2012.

Devriese LA, Hommeez J, Laevens H, Banadme P, Haesebrouck F Identification of Aesculinhydrolyzing *Streptococci* and *Enterococci* from Subclinical Intramammary Infections in Dairy Cows. Vet. Microbiol., 70, 87–94, 1999.

Didinen BI, Yardımcı B, Onuk EE, Metin S, Yıldırım P Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): new histopathological observations, phenotypic and molecular identification, Revue Med. Vet., 165, 1-2, 12-19, 2014.

Diler O, Altun S, Adiloglu AK, Kubilay A, Işıklı B First Occurrence of *Streptococcosis* Affecting Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 22, 21–25, 2002.

Domenech A, Prieta J, Fernandez-Garayzaabal J, Collins MD, Jones D, Dominguez L Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. Microbiologia (SEM) 9, 63– 68, 1993.

Eldar A, Shapiro O, Bejerano Y, Bercovier H Vaccination with Whole-cell Vaccine and Bacterial Protein Extract Protects Tilapia against *Streptococcus Difficile* Meningoencephalitis. Vaccine, 13, 867–870, 1995.

Eldar A, Ghittino C, Asanta L, Bvozzetz E, Gorla M *Enterococcus seriolicida* is a Junior Synonym of *L. garvieae*, a Causative Agent of Septicemia and Meningoencephalitis in Fish. Curr. Microbiol., 32, 85–88, 1996.

Eldar A, Horovitz A, Bercovier H Development and Efficacy of a Vaccine against *Streptococcus iniae* Infection in Farmed Rainbow Trout. Vet. Immunol. Immunopathol., 56, 175–83, 1997.

Eldar A, Gorla M, Ghittino C, Zlotkin A Biodiversity of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Fish in Europe, Asia, and Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 1005–1008, 1999.

Elliot JA, Collins MD Pigott NE, Facklam RR Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from Humans by Comparison of Whole-cell Protein Patterns. *J. Clin. Microbiol.*, 20, 2731–2734, 1991.

Emre Y, Sayın C, Kıştın F, Emre N Türkiye’de ağ kafeste alabalık yetiştiriciliği, karşılaşılan sorunlar ve çözüm önerileri, Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi Cilt 4, Sayı 1-2, 2008.

Endo A, Okada S Monitoring the lactic acid bacterial diversity during schochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (99); 216-221, 2005.

Ewart KW, Williams J, Richards RC, Gallant JW, Melville K, Douglas SE The early response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages exposed in vitro to *Aeromonas salmonicida* cultured in broth and fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 380-390. doi:10.1016/j.dci.2007.07.005. 2008.

Eyngor M, Zlotkin A, Ghittino C, Prearo M, Douet DG, Chilmonczyk S Clonality and Diversity of the Fish Pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean Countries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5132–5137, 2004.

FAO 2015 <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-0a.pdf> 28.07.2015

Fukuda Y, Maita M, Satoh K, Yamamoto H, Okamoto N, Ikeda Y Effects of Dissolved Oxygen Concentration on Experimental Horizontal Transmission of Induced by Artificial Infection with *Enterococcus seriolicida* in Yellowtail. *Fish Pathol.*, 32, 43–49, 1997.

Furet JP, Queene P, Talliez P Quantification de bacteries lactiques par PCR quantitative. *Science of Aliments*, (22); 33–44, 2002.

Ghittino C, Muzquiz JL La *Estreptococcosis* de la Trucha Arco Iris en Espana. *Reunion de Piscicultores. Zaragoza. Rev. Aquatic.*, 2, 1998.

Ghittino C La *Estreptococcosis* en Los Peces. *Rev. Aquatic.* 1999.



Gürpınar S Alabalıklarda görünen streptokokkosis vakaları ile ilişkili bakteriyel patojenlerin multiplaks polimeraz zincir reaksiyonu (mPCR) ile tanımlanması. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi MİK-D-2013-0001 2013.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Gram positive cocci: Group 17. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. USA, Williams & Wilkins; p.527-558, 1994.

Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Society for Clinical Nutrition, (73); 365-373, 2001.

Hurvitz A, Bercovier H, Rijn JV Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) vaccinated against *Streptococcus iniae*. Fish & Shellfish Immunol. 7:45-53, 1997.

Iglesias R, Paramal A, Alvarez MF, Leiro J, Fernandez J, Sanmartin ML *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain), Diseases of Aquatic Organisms, 46: 47-55, 2001.

Işıdan H, Bolat Y A survey of viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Turkey, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 11: 507- 513. doi: 10.4194/1303-2712-v11\_4\_01, 2011.

Kang S, Shin G, Shin Y, Palaksha KJ, Kim Y, Yang H Experimental Evaluation of Pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in Black Rockfish (*Sebastes schlegeli*). J. Vet. Sci., 5,4, 387-390, 2004.

Katao H Erythromycin: The Application to *Streptococcal* Infections in Yellowtails. Fish Pathol., 17, 77-82, 1982.

Kav K, Erganiş O Konya bölgesinde bulunan Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. Vet. Bil. Derg. 1:7-17, 2007.

Kawanishi A, Kojima A, Ishihara K, Esaki H, Kijima M, Takahashi T Drug Resistance and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns of *Lactococcus garvieae* Isolates from Cultured

Seriola (Yellowtail, Amberjack and Kingfish) in Japan. Lett. Appl. Microbiol., 40, 322–328, 2005.

Kitao T, Aoki T, Iwata K Epidemiological Study on *Streptococcosis* of Cultured Yellowtail. Distribution of *Streptococcus spp.* In Sea Water and Muds Around Yellowtails Farms. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 45, 567–572, 1979.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Gram positive cocci: Part–2: Streptococci, Enterococci, and the Streptococcus-like bacteria. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth Edition. New York: The Lippincott; p. 577–649, 1997.

Ksuda R, Kawai K, Salati F, Banner CR, Fryer L *Enterococcus seriolicida* sp. Nov., a fish pathogen. Int.J. Syst. Bacteriol., Vol. 41, 406-409pp, 1991.

Ksuda R, Salati F *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. In (eds. Woo PTK, Bruno, D.W.) Fish Diseases and Disorders, Vol: 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing, 303-317pp, 1999.

Kubilay A, Altun S, Uluköy G, Diler Ö *Lactococcus garvieae* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1,1, 39-48, 2005.

Kum C, Gökbulut C, Akar F, Kırcan Ş, Sekkin S Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* izolasyonu ve etkili antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi. Vet. Hek. Dern. Derg., 75: 47-53, 2004.

Lee DC, Lee JI, Park CI, Park SI The Study on The Causal Agent of *Streptococcosis* (*Lactococcus garvieae*), Isolated from Cultured Marine Fish. J. Fish Pathol., 14, 71–80, 2001.

Mata AI, Gibello A, Casamayor A, Blanco MM, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water *Streptococcosis* in fish. Appl. and Environment. Microbiol. 70(5):3183–3187, 2004.

Mazzolini E, Vismara D, Ceschia G, Malvisi J, Fabris A, Passera A, Danielis L, Giorgetti G In vitro Activity of Several Chemiantibiotics against Clinical Isolates of Fresh and Marine Fish Pathogens. Appl. Environ. Microbiol., 77, 2185-2114, 2003.

Munday BL Fish. In: Coopert SB, editor. Antimicrobial Prescribing Guidelines for Veterinarians: a Post Graduate Foundation Publication. University of Sydney, Australia, In association with the National Health and Medical Research Council, 305–325, 1994.

Munro ALS The pathogenesis of bacterial diseases of fish. (in) Microbial Disease of Fish. RJ Roberts (Editor), 131-149, Academic Press, London, UK. 1982.

Munro PD, Barbour A, Birkbeck TH Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. Applied Environmental Microbiology, 61: 4425-4428, 1995.

Muzquiz JL, Royo FM, Ortega C, de Blas I, Ruiz I, Alonso JL Pathogenicity of Streptococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Dependence of Age of Diseased Fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 19, 114–119, 1999.

Nakai T, Sugimoto R, Park KH, Matsuoka S, Mori K, Nishioka T Protective Effects of Bacteriophage on Experimental *Lactococcus garvieae* Infection in Yellowtail. Dis .Aquat. Org., 37, 33–41, 1999.

Norqvist A, Hagström A, Watz HW Protection of rainbow trout against Vibriosis and Furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*. Appl. and Environ. Microbiol. 55(6):1400-1405, 1989.

Odamaki T, Yonezawa S, Kitahara M, Sugahara Y, Xiao JZ, Yaeshima T, Iwatsuki K, Ohkuma M Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of *Lactococcus* species. Letters in Applied Microbiology, (52); 491-496, 2011.

Özdemir N Alabalık yetiştiriciliği. Hasad Yayın Rek. Tar. San. Tic. Ltd. Şti., 9-16, 1996.

Özer S, Bulduklu PS, Dönmez E Mersin ilinde yetiştiriciliği yapılan Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) streptokokkozis varlığı. J. Of Fisher. Sci. 2(3):272-283, 2008.

Pereira F, Ravelo C, Toranzo AE, Romalde JL *Lactococcus garvieae*, an Emerging Pathogen for The Portuguese Trout Culture. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 24, 274–279, 2004.

Post G Textbook of Fish Health. T.F.H.Publ. Inc. 1987.

- Prieta J, Domenech AM, Fernandez-Garaizabal JF, Collins MD, Rodrigues UM, Jones D Lactococcosis De la Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*). Med. Vet., 10, 367–373, 1993.
- Rantsiou K, Urso R, Iacumin L, Cantoni C, Cattaneo P, Comi G Culture-dependent and Independent Methods to Investigate The Microbial Ecology of Italian Fermented Sausages. Appl. Environ. Microbiol., 71, 1977–1986, 2005.
- Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P Detection of *Aeromonas salmonicida* by reverse transcription-multiplex polymerase chain reaction. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76(4):665-670, 2012.
- Ravelo C, Magarinos B, Romalde JL Toranzo AE Convencional versus Miniaturized Systems for The Phenotypic Characterization of *Lactococcus garvieae* Strains. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 21, 136–144, 2001.
- Ravelo C, Magarinos B, Lopez-Romalde S, Toranzo AE, Romalde JL Molecular Fingerprintings of Fish-Pathogenic *Lactococcus garvieae* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. J. Clin. Microbiol., 41, 751–756, 2003.
- Ravelo C, Magarinos B, Herrero MC, Costa L, Toranzo AE, Romalde JL Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquacult, 251:153–158, 2006.
- Ringo E, Gatesoupe FJ Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquacult. 160:177–203, 1998.
- Robinson JA, Meyer FP Streptococcal Fish Pathogen. J. Bacteriol., 92, 512, 1996.
- Romalde JL Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. In: Seminario internacional enfermedades emergentes en la acuicultura. Chile: Puerto Varas; 2004.
- Sanchez TP, Balcazar JL, Merrifield DL, Carnevali O, Gioacchini G, DeBlas I, Zarzuela IR Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. Fish & Shellfish Immunol. 31:196-201, 2011.
- Schlegel HG General Microbiology. Cambridge University Press, 673 p, New York, USA, 1997.

Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Klipper-Bälz R, Collins MD, Fisher W Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to genus *Lactococcus* gen. nov. Systematic and Applied Microbiology, (6); 183-195, 1985.

Schleifer KH, Kilpper-Balz R Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: A review. Systematic and Applied Microbiology, (10); 1-19, 1987.

Schleifer KH, Ludwig W Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria. In: Wood, B. J. B. Holzapfel WH (eds.) The genera of lactic acid bacteria. Chapman and Hall, 7-18, London 1995.

Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Pedersone K, Larsen JL Occurrence of antimicrobial resistance in fishpathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. Appl. Environ. Microbiol., 66: 4908- 4915, 2000.

Sharifiyazdi H, Akhlaghi M, Tabatabaei M, Mostafayi Zadeh SM Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultured in Iran, Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, Vol. 11, No. 4, Ser. No. 33, 2010.

Stiles ME, Holzapfel WH Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, (36); 1-29, 1997.

Sudheesh PS, Ghabshi AA, Mazrooci NA, Habsi SA Comparative Pathogenomics of Bacteria Causing Infectious Diseases in Fish. Int. J. of Evol. Biol. ID:457264: 16, 2012.

Tanrıkul TT, Gültepe N Mix Infections in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): *Lactococcus garvieae* and *Vibrio anguillarum* O1, Journal of Animal and Veterinary Advances, 10: 1019-1023, 2011.

Teixeira LM, Merquior VLC, Vianni MCE, Carvalho MGS, Fracalanza SEL, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Facklam RR Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 664–668, 1996.

Tekelioğlu N İç su balıkları yetiştiriciliği bölümü, Alabalık yetiştiriciliği, Adana, 1-68, 2005.

Timur G, Yardımcı ER, Ürkü Ç, Çanak Ö Marmara bölgesi kültür gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*,L.) Lactococcosis'in bakteriyolojik ve histopatolojik metotlarla teşhisi. İstanbul Üniv. Su Ürün. Derg. 26:63-81, 2011.

Toranzo AE, Devesa S, Heinen P, Riaza A, Nunez S, Barja JL Streptococcosis in Cultured Turbot Caused by an *Enterococcus*-like Bacterium. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14: 19–23, 1994.

TUİK 2015 <http://tuikapp.tuik.gov.tr/medas/?kn=97&locale=tr> 16.07.2015

Türe M, Haliloğlu Hİ, Altuntaş C, Boran H, Kutlu İ Comparison of Experimental Susceptibility of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Turbot (*Psetta maxima*), Black Sea Trout (*Salmo trutta labrax*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) to *Lactococcus garvieae*, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 14: 507-513, 2014.

Vendrell D, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Girones O, Muzquiz, JL Evaluation in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) of Ichtiovac-Lg, a Vaccine against *Lactococcus garvieae*. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Fish Immunology, 2004.

Vendrell D, Balcazar JL, Zarzuela IR, DeBlas I, Girones O, Muzquiz JL *Lactococcus garvieae* in fish: A review. Comp. Immunol. Microbiol.&Infect. Dis. 29 177–198, 2006.

Vendrell D, Balcazar JL, Zarzuela IR, Blas I, Girones O, Muzquiz JL Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Prevent. Vet. Med. 80:222–229, 2007.

Villani F, Aponte M, Blaiotta G, Mauriello G, Pepe O, Moschetti G Detection and Characterization of a Bacteriocin, Garviecin L. 1-5, Produced by *Lactococcus garvieae* Isolated from Raw Cow's Milk. J. Appl. Microbiol., 90, 430–439, 2001.

Wiens GD, Vallejo RL Temporal and pathogen-load dependent changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response traits following challenge with biotype 2 *Yersinia ruckeri*. Fish & Shellfish Immunol. 29:639-647, 2010.

Woo PTK, Bruno DW Fish disease and disorders, Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, Oxfordshire, UK. 2003.

Yasunaga N Occurrence of *Streptococcus sp.*, A Pathogen of Cultured Yellowtail, in Muscle of Sardine for Diets. Fish Pathol., 17, 195–198, 1982.

Yörük GN, Güner A Laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması ve *Weissella* türlerinin gıda mikrobiyolojisinde önemi. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 2 (6); 163-176, 2011.

Zlotkin A, Eldar A, Chittino C, Berccvier H Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 36(4):983-985, 1988.

## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İzmir'in Balçova ilçesinde doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini Aydın'da tamamladı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünü kazandı. Üniversite 4. sınıfta Erasmus programıyla Polonya'da Warmia and Mazuri in Olsztyn üniversitesinde 1 yarıyıl öğrenim gördü. 2013 yılında üniversiteden mezun olarak yine aynı yıl içerisinde Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladı. 2014 yılının Haziran – Temmuz aylarında Muğla'nın Dalaman ilçesinde Alabalık yetiştiriciliği yapan bir firmada üretim mühendisi olarak çalıştı. Daha sonra Levrek ve Çipura ihracatı yapan bir şirketin İzmir'in Karaburun ilçesindeki paketleme gemisinde üretim mühendisi olarak çalıştı.



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle bana destek olan danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sn. Prof. Dr. Şükrü Kırcan'a, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyesi Prof. Dr. Osman Kaya'ya, tez çalışmam süresince manevi desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Süheyla Türkyılmaz'a ve Doç. Dr. Serap Savaşan'a, laboratuvar çalışmalarımda çok değerli yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Göksel Erbaş'a, Yrd. Doç. Dr. Uğur Parın'a ve Arş. Gör. Hafize Tuğba Yüksel'e ve beni bugünlere getiren, yüksek lisans çalışmam süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.