

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

***LACTOCOCCUS GARVİEAE*'nin FENOTİPİK VE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Veteriner Hekim Mustafa TÜRE**

**HAZİRAN 2011**  
**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

***LACTOCOCCUS GARVİAE*'NİN FENOTİPİK VE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN  
BELİRLENMESİ**

**Veteriner Hekim Mustafa TÜRE**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“YÜKSEK LİSANS (BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09.05.2011**  
**Tezin Savunma Tarihi : 02.06.2011**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. İlhan ALTINOK**

**TRABZON 2011**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Balıkçılık Teknolojisi Anabilim Dalında**

**Mustafa TÜRE tarafından hazırlanan**

***LACTOCOCCUS GARVIEAE*'NİN FENOTİPİK VE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN  
BELİRLENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 16/05/2011 gün ve 1461 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından 02/06/2011 tarihinde yapılan sınavda**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Doç. Dr. İlhan ALTINOK**



**Üye : Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK**



**Üye : Yrd. Doç. Dr. Erol ÇAPKIN**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi Bölümü Yüksek Lisans Programı kapsamında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne “Pulsed-Field Jel Elektroforezis Tekniği Kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin Genetik Çeşitliliğinin ve Yayılımının Belirlenmesi” projesi kapsamında yürütülen çalışmaların bir kısmını içermektedir ve TAGEM vasıtası ile Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü ve Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi imkânları ile gerçekleştirilmiştir.

İlk defa 2001 yılında ülkemizde izole edilen ve yakın zamanda bölgemizdeki bazı işletmelerde de teşhis edilen (Doğu Karadeniz ve civarı) *Lactococcus* etmeni olan *L. garvieae* hızla yayılım gösteren patojenlerden biridir. Bunun için hastalığa neden olan bakterinin moleküler ve genetik profilinin çıkartılarak dağılım ve kaynağının tam olarak belirlenmesi gerekmektedir. Bu araştırmayla mevcut ve elde edilen *L. garvieae* izolatları klasik biyokimyasal testler, API 20 Strep ve ERIC-PZR metodu kullanılarak suşlar arası genetik benzerlikler ortaya konmuştur. Türkiye’de bulunan *L. garvieae* suşlarının tipleri belirlenmiş ve ilk izolat ile bağlantısı araştırılmıştır. Bu da hastalığın nasıl yayıldığını ortaya çıkarmamıza yardımcı olmuştur.

Yüksek lisans öğrenciliğim sırasında danışmanlığımı üstlenip yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr İlhan ALTIÖK’a, örneklemeye yardımcı olan İlyas KUTLU’ya çalışmanın başından sonuna kadar desteklerini ve yardımlarını gördüğüm çalışma arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Erol ÇAPKIN, Oğuzhan EROĞLU ve Halis BORAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca desteklerini hep üzerimde hissettiğim eşim ve aileme şükranlarımı sunarım.

Mustafa TÜRE  
Veteriner Hekim

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Lactococcus garvieae*’nin Fenotipik ve Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Doç. Dr. İlhan ALTINOK’un sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.  
09/05/2011

Mustafa TÜRE

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.1.1. Etken.....	2
1.1.2. Morfoloji ve Kültür .....	3
1.1.3. Antijenik Karakter .....	4
1.1.4. Patojenite ve Hastalığın Klinik Semptomları .....	5
1.1.5. Epidemiyoloji .....	6
1.1.6. Teşhis.....	7
1.1.7. Tedavi.....	7
1.1.8. Koruma ve Kontrol.....	8
1.2. Bakteriyel Balık Hastalıklarında Moleküler ve Epidemiyolojik Yöntemler....	9
1.2.1. ERIC-PZR Metodu .....	9
1.2.2. Pulsed-Field Gel Elektroforesiz Metodu (PFGE).....	10
1.2.3. Polimerize Zincir Reaksiyonu (PZR).....	11
1.2.4. Multiplex (Çoklu) PCR.....	11
1.3. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi.....	11
1.4. Önceki Çalışmalar.....	12
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. Örnekleme.....	14
2.2. Örneklerin İncelenmesi.....	16
2.3. Bakterilerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	16
2.4. Bakterilerin Biyokimyasal Karakterlerinin Belirlenmesi.....	16

2.5.	Biyokimyasal Testlerin Uygulanması .....	16
2.6.	Antibiyogram Testi.....	18
2.7.	PZR İçin DNA İzolasyon .....	18
2.8.	PZR Şartları ve Görüntüleme .....	19
2.9.	ERIC-PZR Metodu... ..	20
3.	BULGULAR .....	21
3.1.	İşletmelerin Genel Durumu .....	21
3.2.	Biyokimyasal Test Sonuçları.....	22
3.3.	Antibiyotik Duyarlılıkları .....	29
3.4.	PZR Sonuçları .....	31
3.5.	ERIC-PZR Sonuçları .....	32
4.	TARTIŞMA.....	36
4.1.	Biyokimyasal Test Sonuçları.....	36
4.2.	ERIC-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	38
4.3.	Antibiyotik Dirençleri ... ..	39
5.	SONUÇLAR.....	42
6.	ÖNERİLER .....	44
7.	KAYNAKLAR.....	46
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

## ÖZET

### *LACTOCOCCUS GARVIEAE*'NİN FENOTİPİK VE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Mustafa TÜRE

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Danışman Doç. Dr. İlhan ALTINOK  
2011, 54 Sayfa

*Lactococcus garvieae*'nin izolasyonu amacı ile 2009 ve 2010 yaz aylarında 5 farklı işletmeden örnekleme yapılmış ve 3 tanesinden bu bakteri izole edilmiştir. Bunun yanı sıra yurdun değişik yörelerinden ve İtalya, İspanya, Fransa, Japonya gibi ülkelerden geçmiş yıllarda değişik kaynaklardan izole edilmiş incelenmiştir. PZR işlemi sonucunda *Lactococcus garvieae* olduğu anlaşılan tüm suşlara biyotiplendirme amacı ile klasik biyokimyasal testler ve API 20 Strep testi uygulanmıştır. Klasik olarak gerçekleştirdiğimiz testlerde suşlar arasında tam homojenite görülürken API 20 Strep de heterojenite mevcuttur. Genel olarak baktığımızda biyotip 1 olan ATCC 49156 referans suşunun API 20 Strep'e göre Türkiye'den elde edilen izolatlar ile birkaç istisna dışında ortak özellik gösterdiği, buna karşın İtalya, İspanya ve Fransa menşeli balık ve diğer hayvanlardan izole edilen izolatlardan farklı biyokimyasal özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Yine bu çalışmada *L. garvieae* izolatlarının genotiplendirilmesi amacıyla ERIC-PZR metodu optimize edilerek kullanılmıştır. Benzerlik oranlarını düşük bulunan *L. garvieae* suşları 8 kümede toplanmıştır. Bu da suşlar arasında önemli taksonomik heterojenitenin olduğu belirlenmiştir. Klasik biyokimyasal test ve API 20 Strep sonuçlarını ERIC-PZR ile karşılaştırıldığında birkaç istisna hariç sonuçların benzer olduğu görülmüştür. Disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan antibiyogram testine göre; suşların, oksitetrasiklin, amoksisilin, tetrasiklin ve florfenikol gibi antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları, gentamisin ve sulfametoksazol+trimetoprim gibi antibiyotiklere karşı ise dirençli oldukları saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *L. garvieae*, ERIC-PZR, genotip, antibiyogram, disk difüzyon.



Master Thesis

## SUMMARY

### DETERMINATION OF THE PHENOTYPIC AND GENETIC DIVERSITY OF *LACTOCOCCUS GARVIEAE*

Mustafa TÜRE

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Fisheries Technology Engineering Graduate Program  
Supervisor: Assoc. Prof. İlhan ALTINOK  
2011, 54 Pages

Fish were sampled from 5 different fish farms between 2009 and 2010 to isolate *Lactococcus garvieae*, which were isolates from 3 different farms. In addition to isolated *L. garvieae* 38 strains from different regions of Turkey and different countries such as Italy, Spain, France, and Japan, were studied. All isolates were identified with classic biochemical tests and API 20 Strep. Although a complete homogeneity was observed in the strain identified by classical test, partial heterogeneity was observed in the API 20 Strep tests. In general, according to the API 20 Strep test, it was found that the ATCC 49156 reference strains, biotype showed common features with the isolates obtained from Turkey. However, they had many different biochemical characteristics from the isolates that were isolates from the animals in Italy, Spain and France. In this study, for the purpose of genotyping of the isolates, optimized ERIC-PZR method was used. *L. garvieae* strains were grouped in 8 clusters according to their low rate of similarities. This grouping showed taxonomic heterogeneity between the strains. When we compared the results of the classical biochemical and API20 Strep tests with ERIC-PZR, the results are similar except a few strains. Disc diffusion method was used to test antibiotic resistance of the *L. garvieae* isolates. Strains of *L. garvieae* were sensitive to oxytetracycline, amoxicillin, florfenicol, tetracycline and were resistant to gentamicin and sulfamethoxazole + trimethoprim.

**Keywords:** *L. garvieae*, ERIC-PCR, genotyping, phenotyping, antibiogram, disc diffusion.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. <i>L. garvieae</i> 'nin TSA' daki görüntüsü.....	23
Şekil 2. Bazı <i>L. garvieae</i> izolatlarının farklı tuzluluk ve sıcaklıklardaki görüntüsü...	24
Şekil 3. <i>L. garvieae</i> izolatlarına ait biyokimyasal testlerin bazıları.....	25
Şekil 4. <i>L. garvieae</i> izolatları ile gerçekleştirilen API 20 Strep testi.....	26
Şekil 5. Bir <i>L. garvieae</i> suşuna uygulanan antibiyogram testi.....	29
Şekil 6. PZR testi sonucu bazı <i>L. garvieae</i> suşlarının alınan görüntüleri.....	31
Şekil 7.1. <i>L. garvieae</i> suşlarının ERIC-PZR modeli.....	32
Şekil 7.2. <i>L. garvieae</i> suşlarının ERIC-PZR modeli.....	33
Şekil 8. <i>L. garvieae</i> izolatlarının dendogramı.....	35

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. <i>L. garvieae</i> 'nin biyokimyasal, kültürel ve fizyolojik karakterizasyonu .....	4
Tablo 2. Çalışması süresince belirlenen bölgelerden alınan balıklar ve sayıları .....	14
Tablo 3. <i>L. garvieae</i> izolatları, ait oldukları yıllar ve bunların menşeleri .....	15
Tablo 4. DNA'nın yükseltgenme işlemi için belirlenen PZR karışımının bileşenleri ve miktarı.....	19
Tablo 5. Denizde bulunan kafeslerden ve tatlı su işletmelerinden izole edilen bakteriler ve dokuları.....	23
Tablo 6. Klasik biyokimyasal ve API 20 Strep sonuçları .....	26
Tablo 7. <i>L.garvieae</i> suşlarının klasik biyokimyasal, Apı 20 Strep ve kültürel özellikleri.....	27
Tablo 8. <i>L.garvieae</i> izolatlarının disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları .....	30

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Dünyada ilk defa *Lactococcus garvieae* 1974 yılında sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*) balığından izole edilmiş olup (Ksuda vd., 1991), neden olduğu hastalık *Lactococcosis* olarak adlandırılmıştır (Austin ve Austin, 1999). Türkiye’de bu bakterinin sebep olduğu hastalık ilk defa 2001 yılında Ege Bölgesi’ndeki gökkuşağı alabalığı işletmesinde ortaya çıkmış olup (Diler ve ark., 2002), 2008 yılı itibariyle birçok bölgeye yayılmıştır.

Hastalığa neden olan bakterilerin alt-tipleme (subtyping) tür altı veya alt tür düzeyinde tanımlanmasıdır. Alt-tipleme fenotipik ve genotipik tekniklerle yapılmakta olup, türlerin popülasyon yapısını, hedef organizmalarla diğer organizmalar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, hedef organizmanın evaluasyona uğradığı basamakların belirlenmesinde ve moleküler epidemiyolojide kullanılmaktadır.

ERIC-PZR bir örnekteki nükleik asidin özel bir primer yardımı ile amplifikasyonu yapılarak kısa zamanda ve yüksek güvenilirlikte gerçekleştirilen genotiplendirmede kullanılan PZR bazlı metottur. Ardından PZR ürünü DNA agaroz jel elektroforezine tabi tutulur ve sonra etidiyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantların yeri ve sayısı kıyaslanarak çeşitlilik edilir (Yağcı, 2004).

ERIC-PCR Enterobakterilerin genotiplendirilmesinde başarıyla kullanılmıştır. Son günlerde bu metot *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ve *Aeromonas sp.* suşlarının epidemiyolojik araştırmalarında ve genetik araştırmalarının değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Yingwang vd., 2008).

*Lactococcus garvieae* enfeksiyonunun işletmelerde meydana getirdiği kayıpların önemine rağmen, farklı bölgelerden izole edilen farklı *L. garvieae* suşları arasında epizootiyolojik ilişki konusunda bilgi yetersizliği vardır.

### 1.1.1 Etken

*Lactococcus* hastalığına sebep olan etken ilk olarak Japonya'da izole edildikten sonra (Ksuda vd., 1991) 1988'de İspanya'da gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde görüldü (Palacios vd., 1993). Sonraki zamanlarda *Lactococcus* birçok ülkede yayıldı ve akuatik organizmalarda önemli ekonomik kayıplara yol açtı. Daha sonra İtalya'da, Güney Afrika'da ve Avustralya'da gökkuşağı alabalıklarındaki yüksek mortalitenin temel nedeni olarak bulundu (Carson vd., 1993). *Lactococcus garvieae* daha sonraları Tayvan'daki dev tatlı su karidesleri (*Macrobrachium rosenbergii*), tekir balığı (*Mullus surmuletus*) ve gökkuşağı alabalıklarında ki (*Onchorhynchus mykiss*) salgınlardan sorumlu tutuldu (Chen vd., 2001; Chen, 2002; Chang, 2002). Türkiye'den ilk defa 2001'de Ege Bölgesi'deki gökkuşağı alabalığı çiftliklerinden izole edildi (Diler vd., 2002). Son günlerde *L. garvieae* gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde salgınlar şeklinde İngiltere'de (Bark vd., 2001), Portekiz'de (Pereira vd., 2004), Fransa'da, Balkanlar'da, İsrail'de (Eynigor vd., 2004), ve Kore'de (Baeck vd., 2006) deniz türlerinde bulunmuştur.

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. garvieae* insan ve hayvanlarda klinik öneme sahip en önemli türlerdir (Aguirre vd., 1993; Antolı'n vd., 2004). *Lactococcus* cinsi *Streptococceae* familyası içerisindedir. Etken Japonya'da 1950'nin sonlarına kadar yine bir gram pozitif bakteri olan *Streptococcus* olarak isimlendirildi. Gelişen tekniklerle beraber *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* ve *Cornobacterium* gibi yeni bakteri genumu içerisinde sınıflandırılrsa da 1985'ten sonra *Streptococcus*'lardan ayrıldı (Schleifer vd., 1985 ). Önceleri *Enterococcus* benzeri olarak tanımlanan bu patojen; biyokimyasal karakterizasyonu, protein profili, 16S rRNA sekans analizleri ve DNA hibridizasyon çalışmaları sonucu *L. garvieae* ile *Enterococcus serolicidae*'nin aynı türler olduğunu doğrulandı (Domenec vd., 1993; Eldar vd., 1996; Teixeira vd., 1996).

*Lactococcus garvieae*'nin akuatik türler için konakçı bakımından limiti yoktur (Vendrell vd., 2006). Bu etken aynı zamanda subklinik meme içi enfeksiyonlu ineklerden (Devriese vd., 1999), mastitisli su buffalolarından (Carvalho vd., 1997), kümes hayvanlarının etlerinden (Barakat vd., 2000), çiğ inek sütünden (Villani vd., 2001), et ürünlerinden (Rantsiou vd., 2005 ) ve kedi ve köpek tonsillerinden (Eldar vd., 1996) de teşhis edilmiştir.

Bunlara ilaveten etkenin birkaç vakada insandan da izole edilmesi potansiyel zoonoz olabileceği görüşünü güçlendirmektedir. Amerika’da insanlardan üriner kanaldan, kandan, deriden ve solunum sisteminden izole edilmiştir (Elliot vd., 1991).

*Lactococcus garvieae*, gram pozitif fakültatif anaerobik, hareketsiz, sporsuz, oksidaz ve katalaz negatif, oval kok, çift yada kısa zincirler oluşturabilen kanlı agarda alfa hemolitik, uygun besi ortamında 4 ila 45°C arasında üreyebilen bir bakteridir. (Ksuda vd., 1991; Prieta vd., 1993; Eldar vd., 1996).

Hastalık özellikle su sıcaklığının 16°C üzerine çıktığı yaz aylarında etkili olmakta ve birçok balık türünü etkileyerek çok önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Austin ve Austin, 1999).

*Lactococcus garvieae*'nin tür içi sınıflandırmasında bazı karbonhidratların asidifikasyonu temelinde ve bazı enzimlerin varlığında 13 biyotipi olduğu belirlenmiştir. Bunların 6'sı balıklardan izole edilmiştir. Ayrıca rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) ve pulse-field gel elektroforesis (PFGE) metodları epidemiyolojik çalışmalar için kullanılmış ve *L. garvieae*'nin Japonya ve Avrupa’da farklı akuatik suşları karşılaştırılmıştır (Vela vd., 2000; Ravelo vd., 2000; Ravelo vd., 2003).

Son zamanlarda farklı coğrafik orijinlerden ve farklı balık türlerinden izole edilen 23 *L. garvieae* suşu geleneksel biyokimyasal testler, minitarize sistem ve 2 farklı besi yeri kullanılarak fenotipik özellikleri bakımından incelenmiş ve sonuçlar suşlar arasında yüksek düzeyde bir homojenitenin varlığını göstermiştir. Bu sonuç epidemiyolojik yetersizlikten dolayı farklı biyotiplerden söz edilemeyeceğini göstermiştir (Ravelo vd., 2001).

Geleneksel biyokimyasal testler ve bakteri büyütme testlerinin sonuçlarına göre *Lactococcus garvieae*'nin özellikleri tablo 1’de ki gibidir (Vendrell vd., 2006).

### 1.1.2. Morfoloji ve Kültür

*Lactococcus garvieae* hareketsiz, sporsuz, gram pozitif, tek, çift yada kısa zincirler oluşturabilen kanlı agarda alfa ( $\alpha$ ) hemoliz özelliğine sahip bir bakteridir. Optimum üreme ısısı 37°C de 24 saattir. Ayrıca Brain heart infizyon agar (BHIA), Triptik Soy Agar (TSA), TSB, Triptik Soy Brot (TSB), Bile agar (BA) ve Bile eskulin agar (BEA) gibi zenginleştirilmiş besi yerlerinde üreyebilir (Toranzo vd., 1994). Çalışmalar göstermiştir ki *L. garvieae* optimum gelişmesini BHIA da pH 7-8 ve 25-30°C de gerçekleştirmektedir (Cheng ve Chen, 1996).

Tablo 1. *L. garvieae*'nin biyokimyasal, kültürel ve fizyolojik karakterizasyonu

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	değişken
Eskulin	+	Sukroz	değişken
VP (Voges Prouskar)	+	Adonitol	-
H <sub>2</sub> S üretimi	-	Gilikojen	-
Arjinin dihidrolizi	+	Melibiyoz	-
PYR (Pirolidonil arilamidaz)	+	Melezitoz	-
Alkalın posfataz	-	Starch	-
$\beta$ -Glukuronidaz	değişken	Tagatoz	değişken
Löysin arilamidaz	+	L-ramnoz	-
Sodyum hippurat hidroliz	-	D-ksiloz	-
		Salisin	+

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

### 1.1.3. Antijenik Karakter

Lam aglütinasyon tekniği yardımı ile *L. garvieae*'nin serolojik karakterizasyonu oluşturulmuş ve hücre duvarından KG<sup>-</sup> ve KG<sup>+</sup> şeklinde iki antijenik tipi olduğu rapor edilmiştir (Kitao, 1983). Bakterinin Japon'ya ve Avrupa kapsüllü suşları ile kapsüllü ve kapsülsüz suşları arasında yüzeysel karbonhidrat yapıları arasında farklılıklar bulunmuştur.

(Barnes ve Ellis, 2004). Bu sonuçlar *L. garvieae*'yi Avrupa kapsüllü serotipi, Japonya kapsüllü serotipi ve her iki bölgenin kapsülsüz serotipi olarak 3 farklı serotipe ayırmaktadır. Bakterinin patojenitesini belirlemeye yönelik gökkuşağı alabalıklarında yapılan birkaç çalışmada kapsüllü suşların ( $KG^-$ ) kapsülsüz suşlara ( $KG^+$ ) oranla patojenitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Barnes vd., 2002).

#### 1.1.4. Patojenite ve Hastalığın Klinik Semptomları

*Lactococcosis* hiperakut ve hemorajik septisemi olarak belirtilmiştir (Eldar vd., 1996). Hastalığın gelişimi çevresel faktörlere, su sıcaklığına, suyun mikrobiyal yüküne ve balığın bakım şartlarına bağlı olarak değişmektedir (Prieta vd., 1993). Hastalıkta mortalite oranının %50'nin üzerine çıkması ve balığın büyüme oranının düşmesinden dolayı etken çiftliklerde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Vendrell vd., 2006). Etkenin inkubasyon periyodu çok kısa ve virulensi çok yüksektir. Deneysel enfeksiyonlarda mortalite oranı iki gün içerisinde %100 e kadar çıkabilmektedir (Chen vd., 2001).

*Lactococcosis*'in semptomları iştahsızlık, uyuşukluk, deride kararma ve düzensiz yüzme şeklinde başlar, dışarıdan baş ve göz çevresinde, anal bölgede ve yüzgeç kaidelerinde kanama, çift yada tek taraflı ekzoptalmus ile kendini gösterir. Ayrıca abdomende şişlik ve anüste prolapsus gözlenir (Eldar vd., 1999; Prieta vd., 1993; Muzquiz vd., 1999; Vendrell vd., 2004). Enfeksiyondan dolayı damar endotelinde oluşan lezyonlar iç organların yüzeyinde kanamalara sebep olur. Nekropside periton üzerinde genellikle asidik karakterde sıvı birikir, bu sıvı bazen irinli yada kanlı da olabilir. Etkilenen balıktaki makroskopik lezyonlar bir sistemik akut hastalıktaki gibi tipiktir ve yüzme kesesi, karaciğer, beyin, böbrek, barsak, kalp ve periton gibi dokularda değişen düzeyde kanamalar mevcuttur (Prieta vd., 1993; Aizpurua vd., 1999; Austin vd., 1999; Aizpurua vd., 2000; Afonso vd., 2003; Pereira vd., 2004).

Histopatolojik olarak oküler alanda iltihaplı hücre birikimi gözlenir. Ayrıca gözlerin ön ve arka bölümlerinde irinli alanlar ve göz içi kas ve yağ dokusunun kanamalı iltihabı gözlenebilir (Eldar vd., 1999; Chang vd., 2002). Etkilenen balıkta genelde meningitis mevcuttur ve beyinde beyin zarlarına ait lezyonlar ve lezyonlu alanlarda eksudat birikimi gözlenebilir (Eldar vd., 1999; Chang vd., 2002). Kalp, böbrekler ve peritonda da lezyonlar diğer organlarda ki gibidir ve bol fibroblast makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu görülebilir (Eldar vd., 1999; Chang vd., 2002).



### 1.1.5. Epidemiyoloji

Son zamanlarda *L. garvieae*'nin gökkuşağı alabalığı, sarı kuyruk, tilapya (*Oreochromis sp.*), Japon yılan balığı (*Anguilla japonica*), pisi (*Paralichthys olivaceous*), kefal, kedi balığı, wild wrasse (*Coris aygula*), siyah kayabalığı (*Sebastes schlegeli*), kralbalığı (*Seriola lalandi*) ve dev tatlı su karidesi gibi türlerden hastalığa neden olan etken olarak izole edilmiştir (Chen vd., 2001; Prieta vd., 1993; Kusuda vd., 1991; Lee vd., 2001; Chen vd., 2002; Ravelo vd., 2003; Colorni vd., 2003; Kang vd., 2004; Kawanishi vd., 2005). Gökkuşağı alabalıkları diğer balıklara oranla en duyarlı ve mortalitenin en yüksek olduğu balık türüdür (Ghittino vd., 1998).

*Lactococcus garvieae* ile yapılan patojenite çalışmalarında genç balıklarda (50 g) erişkin balıklara (100 g) oranla akut formun daha uzun süre devam edip mortalitenin daha yüksek olduğu rapor edilmesine rağmen (Muzquiz vd., 1999), son yıllarda gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde ki doğal enfeksiyonlarda etken 5'g lık balıktan 1 kg. ve daha büyük balıkları etkilediği görülmüştür (Diler vd., 2002; Pereira vd., 2004).

Su sıcaklığı hastalığın ortaya çıkmasında çok önemlidir, çoğu akut salgınlar su sıcaklıklarının 14-15 °C' yi aştığı durumlarda görülmektedir (Prieta vd., 1993; Ghittino vd., 1998). Kötü akuatik çevre, bakım şartları ve yetersiz oksijen etkenin yayılmasını ve virulansını artırmaktadır (Fukuda vd., 1997).

Bakterinin bir işletmeye girişi ve hastalığı meydana getirmesi farklı metotlarla ve farklı kaynaklarla gerçekleşmektedir (Vendrell vd., 2006). Çok sayıda balığın çiftliğe transferi en sık görülen enfeksiyon kaynağıdır. Asemptomatik taşıyıcılar bakteriyi dışkı yolu ile havuza yayarlar ve böylece sağlıklı balıklar enfekte edilmiş olur. Ayrıca hastalığı geçirmiş balıklar da belirli periyotlarda etkeni yayabilirler (Ghittino vd., 1998). Çiftliklerde ki asemptomatik balıkların varlığı PCR metodu ile belirlenmiş ve çevre durumu bakteri lehine optimum olunca hastalığın ortaya çıktığı saptanmıştır (Cheng vd., 2002). Etken çiftliklerde havuz suyundan, çamurdan sedimentten ve akuatik ekipmanlardan da izole edilmiştir (Kusuda vd., 1991; Kitao vd., 1979). Hastalıkta bulaşma temelde horizontal yolla olmaktadır. Özellikle aynı ortamı paylaşan balıklar arasında yaralı balıkların birbirine teması yada fekal-oral yol ile bulaşma olmaktadır (Afonso vd., 2003). Ayrıca enfekte balık yada diğer gıdaların yem olarak kullanılması ile de etken işletmelere bulaşabilir (Yasunaga vd., 1982 ).

### 1.1.6. Teşhis

Hasta balıklarda görülen lezyonlar ve karakteristik semptomlar benzer hastalıkta da görülebildiği için kesin teşhis için bakteriyel etkenin laboratuvar metotları ile tanımlanması gerekmektedir (Vendrell vd., 2006 ).

Hastalığın görüldüğü yerden ölü yada hasta görünümlü balıklar laboratuara alındıktan sonra, en uygun organlar böbrek ve beyin olmasına rağmen dalak, karaciğer, bağırsak, gözler ve kandan da etken izole edilebilir (Ghittino vd., 1998). *Lactococcus garvieae* 'yi izole etmek için BHIA, TSA, BA yada Nutrient agar (NA) gibi besi yerleri kullanılmaktadır (Kusuda vd., 1991; Austin vd., 1999). 37°C'lik sıcaklık ve 24 saat *L. garvieae* ' nin gelişmesi için optimum şartlar olduğu gibi balıklarda hastalık yapan diğer birçok bakterinin üremesi engelleneceği için teşhiste önemlidir (Prieta vd., 1993). Etkenin biyokimyasal karakterini ortaya çıkarmak amacıyla klasik biyokimyasal metotlar kullanılabilir. Yine bu amaçla kullanılan API-20 strep ve API-rapid ID32 gibi minitarize sistemler aynı zamanda bakterinin fenotipik karakterini ortaya çıkarmaktadır (Ravelo vd., 2001). *Lactococcus garvieae*, *L. lactis subs. lactis* ile sıklıkla karıştırılabilirse de Klindamisin testi ve PZR metodu ile bu iki tür birbirinden ayrılabilir (Elliot vd., 1991; Zlotkin vd., 1998). *Lactococcus garvieae*'nin teşhisinde serolojik olarak: lam aglütinasyon testi (Kitao vd., 1982, Eldar vd., 1995) ve florasan antikor tekniği (Kawahara vd., 1987 ) kullanılmaktadır. Son yıllarda geliştirilen PCR protokolü ile dizayn edilen primer setleri yardımıyla 16S rDNA sekans analizleri yapılarak *L. garvieae* ' nin spesifik tür tayini yapılabilmektedir (Zlotkin vd., 1998; Altinok, 2011). Yine son zamanlarda balıklarda bulunan birden fazla patojeni eş zamanlı olarak tespit için multipleks PCR metodu geliştirilmiştir. Bu teknik hem saf kültürlerden hem de doğal infekte balık dokusundan *L. garvieae* 'nin dışında birden fazla etkeninde aynı anda tespitine olanak vermektedir (Mata vd., 2004; Altinok, 2011).

### 1.1.7. Tedavi

Balıklarda *Streptococcus* cinsi etkenlerden kaynaklanan enfeksiyonlarda tedavi amaçlı eskiden beri antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak bu kimyasalların gelişigüzel kullanımı antibiyotiklere olan direnci arttırmıştır (Robinson vd., 1966; Katao vd., 1982).

Bu ilaçların bazılarının in vitro şartlarda *L. garvieae*'ye karşı etkili olmalarına rağmen, gerek balıkta ani gelişen iştahsızlık gerekse dirençli suşların oluşmasından dolayı in vivo şartlarda etkisiz oldukları gözlenmiştir (Bercovier vd., 1997). Gökkuşacağı alabalıklarında ortaya çıkan *Lactococcosis* salgınlarında hastalığı kontrol altına almak için çoğunlukla eritromisin, oksitetrasiklin, amoksisilin ve doksasiklin kullanılmaktadır (Munday vd., 1994). Farklı coğrafik orijinli *L. garvieae* suşları ile yapılan çalışmalarda suşların tümünün enrofloksasin ve nitrofurantoin'e duyarlı olduğu, oksolinic asit ve sulfametoksazol-trimetoprim'e ise dirençli olduğu gözlemlenirken eritromisin, cloramfenikol, oksitetrasiklin ve ampisilin'e karşı ise sonuçların orijine göre değişken olduğu görülmüştür (Ravelo vd., 2001).

Son yıllarda Türkiye'de ki salgınlarda *L. garvieae* izolatlarının eritromisin, ofloksasin, ampisilin ve kloramfenikole karşı duyarlı, penisilin ve klindamisiine karşı ise dirençli oldukları saptanmıştır (Diler vd., 2002). Kültür ortamında *L. garvieae* ile mücadelede bakteriyofajlar da denenmiş fajların özellikle oral yolla alındıklarında mortaliteyi düşürdükleri saptanmıştır (Nakai vd., 1999). Yine son yıllarda probiyotiklerin *Lactococcosis* ve *Streptococcosis* enfeksiyonlarını lökosit sayısının artırılması ve fagositik aktivitenin genişlemesi sayesinde engellediği gözlenmiştir (Brunt vd., 2005).

### 1.1.8. Koruma ve Kontrol

Etkenin bir çiftliğe girişini engellemenin ilk yolu koruyucu önlemlerdir. Balığa elle müdahalenin minimuma indirilmesi, ölü yada hasta balıkların hemen uzaklaştırılması, stok yoğunluğunun düşük tutulması, alet ve ekipmanda hijyene dikkat edilmesi ve kaliteli yem kullanımı alınması gereken en önemli tedbirlerdir.

Ayrıca tankların periyodik temizliği alet ve ekipmanın formaldehit, kloramin-T, hidrojen peroksit potasyum permanganat gibi dezenfektanlar ile dezenfeksiyonu etkenin yayılmasının engellenmesi için faydalıdır (De Kinkelin vd., 1991; Romalde vd., 2004). Ayrıca etkenin girişini engellemek amacıyla tesise yumurta ve yavru balık girişlerinin kontrol altına alınması ve hastalıktan arındırılmış sağlık sertifikalı yumurtaların alınması gereklidir (De Kinkelin vd., 1991; Romalde vd., 2004). Hastalık çıkışının engellenmesinde fizikokimyasal parametrelerin kontrolü çok önemlidir. Su sıcaklığının 15°C nin üzerine çıkması, amonyum konsantrasyonunun artması ve ardından oksijen

doygunluğunun azalması hastalığın ortaya çıkmasını ve şiddetini arttırmaktadır (Fukuda vd., 1997; Hurvitz vd., 1997).

*Lactococcosis*'i kontrol altına almak için duyarlı popülasyon aşılabilir. *Lactococcosis* salgınları görülen yerlerden alınan *L. garvieae* izolatları ile inaktive aşılar geliştirilmiştir (Eldar vd., 1995; Eldar vd., 1997). İspanya'da balık çiftliklerinde bu tip aşılarla yapılan denemelerde aşılınmış balıklardaki mortalitenin aşılınmamış üstelik eritromisin ile tedavi edilen balıklarda ki mortalite oranına oranla üç kat daha düşük olduğu gözlenmiştir (Prieta vd., 1993). Son yıllarda farklı mineral yağlar ile adjuvantlı aşılar geliştirilmiş olup bu aşuların aşılama sonrası koruma süresi diğer aşılara göre daha uzun olduğu saptanmıştır ( Vendrell vd., 2004, Ghittino vd., 1999). Yine son çalışmalar mineral yağ içermeyen adjuvant aşuların aşılama sonrası koruma süresini arttırdıkları gözlemlenmiştir (Ravelo vd., 2005). Günümüzde *Loctococcosis* salgınlarının önlenmesinde intraperitoneal yol ile yağ adjuvantlı aşılamanın en etkili yöntem olduğu düşünülmektedir (Vendrell vd. 2006).

Aşılamanın *Lactococcosis* ile mücadelede etkin bir yol olduğu düşünülse de aşılamanın başarısı konakçının türüne, uygulama yoluna ve adjuvantın tipine göre değişmektedir. Genel olarak alabalıklarda bu hastalığa karşı yapılan aşılamanın etkinliğinin düşük olduğu ve koruma sürelerinin kısıtlı (3-6 ay) olduğu bildirilmiştir (Afonso vd., 2003).

## **1.2. Bakteriyel Balık Hastalıklarında Moleküler ve Epidemiyolojik Yöntemler**

Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte patojen balık hastalılarının tespiti ve etkenlerin epidemiyolojisine yönelik çalışmalar yaygın olarak yapılmakta ve bu sayede balık hastalıklarının önlenmesi, antibiyotik direncinin azaltılması gibi konularda önemli adımlar atılabilmektedir (Altinok ve Kurt, 2003).

### **1.2.1. Enterobacterial repetitive Intragenic consensus element (ERIC-PZR)**

ERIC bir örnekteki nükleik asidin amplifikasyonu yapılarak kısa zamanda ve yüksek güvenilirlikte gerçekleştirilebilen genotiplendirmede kullanılan PCR bazlı metottur. PCR ürünü DNA'nın agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra etidiyum bromür ile

boyanan jelde oluşan DNA bantların yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğdir. Bu metot bakteriyel kromozom ve ekstra kromozomal DNA'nın veya viral genomun (RNA ve DNA) restriksiyon profillerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Dört temel adımda gerçekleştirilir. DNA'nın izolasyonu, tek bir primer ile PCR yapılması, amplifike olan DNA'nın jelde elektroforezi ve en son aşama ise jeldeki DNA'nın görüntülenmesidir (Yağcı, 2004).

ERIC-PCR Enterobakterilerin genotiplendirilmesinde başarıyla kullanılmıştır. Son günlerde bu metot *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ve *Aeromonas sp.* suşlarının epidemiyolojik araştırmalarında ve genetik araştırmalarının değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Yingwang vd., 2008). ERIC-PCR metodu Enterobakterilerin rutin epidemiyolojik araştırmalarında yeterli ayırt edebilme gücüne sahip, hızlı ve nispeten kolay bir tekniktir (Matsumoto vd., 2001).

### **1.2.2. Pulsed-Field Gel Elektroforesiz (PFGE) Metodu**

Pulsed-field gel elektroforesiz ilk kez Schwartz ve Cantor tarafından tanımlanmıştır (Schwartz vd., 1994). Bu metot genomik DNA'nın kesici restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanarak PFGE tarafından fragmentlerin ayrılması ve bant örneklerinin yorumlanması esasına dayanır. Geleneksel jel elektroforesiz 50 kilobaza kadar olan DNA fragmentlerini ayrıştırabilirken PFGE fragmentleri 10 megabaz büyüklüğündeki fragmentleri ayrıştırabilir (Kaufmann, 1998).

PFGE enfeksiyon etkeni izolatların karşılaştırılmalarında kullanılan bir metot olup bakteri suşlarının tanımlanmasında nadiren kullanılır. Son yıllarda izolatlar arası benzerlik yada farklılıkların tespitinde mevcut en tartışmasız ayırıcı metottur (Kaufmann, 1998). PFGE de temel özellik bir homojen elektrik alanının çoklu elektrot ve farklı voltajlar kullanarak üretilmesidir (Chu vd., 1986 ). DNA'nın kalite ve konsantrasyonu, agaroz konsantrasyonu, voltaj ve pulse zamanı, buffer in sertliği ve sıcaklık gibi bir çok faktör DNA'nın ayrışmasını etkilemektedir (Kaufmann, 1998).

### 1.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu DNA'nın spesifik bir bölgesinin iki primer ve ısıya dayanıklı Taq polimeraz (thermostable DNA polymerase) enzimi yardımı ile laboratuvar koşullarında en az bir milyon kez çoğaltılması esasına dayanır. DNA ya bağlı bir teşhis metodudur ve bir çok balık patojeninin tespitinde ve epidemiyolojisinde yararlanır (Altınok ve Kurt, 2003). Çoğaltılan bölge 150-3000 baz çifti uzunluğundadır ve PZR ürünü gel elektroforez yardımıyla saptanabilir (McPhearson vd., 1991).

### 1.2.4. Multipleks (Çoklu) PZR

Bu metot daha az zaman ve düşük maliyetle bir kaç patojenin aynı anda tespitine olanak sağlayan bir tekniktir (Williams vd., 1999). Klasik PZR ye benzer fakat birden fazla PZR amplifikasyonu birden fazla primer çifti tarafından aynı reaksiyon içerisinde gerçekleşir.

Aynı reaksiyon içerisinde birden fazla hedefin amplifikasyonu sağlanacağı için; primerlerin seçimine dikkat edilmesi, bağlanma sıcaklıklarının birbirine uygun olması, farklı primer çiftlerinin bir arada çalışmaları için en uygun konsantrasyonlarının belirlenmesi gibi konulara önem gösterilmelidir (Chamberlain vd., 1988; Chamberlain vd., 1989; Altınok, 2011).

## 1.3. Çalışmanın Amacı ve Pratik Önemi

Ülkemizde su ürünleri sektörü hızla gelişmekte olup, havuzlarda, baraj gölleri ve denizlerdeki ağ kafeslerde giderek artan sayıda işletme faaliyete geçmektedir. Yetiştiriciliği yapılan türler arasında çok önemli bir yere sahip olan gökkuşacağı alabalığı ve deniz levreğinde (*Dicentrarchus labrax*) *L. garvieae*'nin neden olduğu epizootiler önemli bir yer tutmaktadır. Hastalık ilk defa Ege Bölgesi ve civarındaki işletmelerde görülmesine rağmen kısa sürede her bölgeye yayılmış olup alabalıklar arasında sık görülen ve %50 nin üzerinde mortaliteye sebep olan bir hastalıktır.

Amaç yurt genelinde her bölgeden, yurt dışından ve saha çalışması ile elde edilen *L. garvieae* suşlarını biyokimyasal olarak ve genotipik analiz yöntemlerinden olan ERIC-PZR

tekniklerini kullanarak bu bakterinin genetik yapısını ve yayılım paternini (epidemiyolojik özelliklerini) incelemek, *L. garvieae* suşlarını karakterize etmek ve suşlar arasındaki genetik bağı belirlemektir. Ayrıca aynı yöntemle ülkemiz suşları ile yurt dışından temin edilen suş arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymaktır.

Yine bu araştırmada amaç referans suş ile birlikte bütün suşları antibiyogram testine tabi tutmak ve bakterinin antibiyotik duyarlılığı belirlemektir.

#### 1.4. Önceki Çalışmalar

Kültür balıkçılığının gelişimi ve yaygınlaşmasıyla birlikte bulaşıcı balık hastalıkları da artmıştır. Bu hastalıklardan kaynaklanan kayıpları azaltmak için patojenlerinin teşhisi, tedavisi ve moleküler metotlarla tiplendirilmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda artmıştır. Bakterilerin teşhisinde kullanılan en yaygın yöntemlerin başında biyokimyasal testler gelmektedir. Klasik biyokimyasal testlerin yanında API kitleri de kullanılmaktadır. Ancak özellikle gram negatif sitokrom oksidaz negatif enterobakteriler için kullanılan API 20E kiti inkübasyon sıcaklığından kaynaklanan yanlış sonuçlar vermektedir.

Türkiye’de *Lactococcus garvieae* ile ilk çalışma Çağırhan (2004) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada alabalıklardan izole edilen 20 adet *L. garvieae* suşunu fenotipik özellikleri, serolojik özellikleri ve kapsül oluşumu yönünden incelemiştir. Tüm suşları API 20 Strep, API 50 CH ve klasik biyokimyasal testlerle tanımlayıp suşların birbirleri ile ve İspanya izolatı ile biyokimyasal benzerliğini ortaya koymuştur. Kav vd. (2007), Konya Bölgesi Gökkuşluğu Alabalığı çiftliklerinde *Streptococcus* etkeni olan *L. garvieae*’nin izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerini belirlemeye çalışmışlardır. API 20 Strep, klasik biyokimyasal yöntemler ve polimeraz zincir reaksiyonu metodunu kullanarak elde ettiği 30 saf kültürün homojen ve kapsüllü olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bakteriyel balık hastalıklarına sebep olan etkenlerin biyokimyasal olarak birbirine çok yakın olması ve biyokimyasal testlerle suşlar arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya konamamasından dolayı biyokimyasal tekniklerin yerine moleküler teknikler kullanılmaya başlamıştır. Bu bağlamda Mata vd. (2004), balıklarda görülen *Streptococcus inia*, *Streptococcus difficilis*, *Streptococcus parauberis* ve *Lactococcus garvieae* etkenlerinin teşhisine olanak sağlayan moleküler teknikler geliştirmiştir.

Avrupa Gökkuşluğu Alabalığı endüstrisine önemli zararlar veren *L. garvieae*’nin popülasyon yapısını araştırmak için farklı kaynaklardan, farklı ülke ve ekosistemlerden

elde edilen 81 suş, RFLP ve serolojik olarak incelenmiş ve enfeksiyonun endemik durumlarında bakteriler arasında genetik ilişkinin güçlü olmasına rağmen, sporadik durumlarda bakteriyel çeşitlilikten söz edilemeyeceği bildirilmiştir (Eyngor vd., 2004). Daha sonraki yıllarda da yine *Lactococcus garvieae*'nin moleküler tekniklerle teşhisine yönelik çalışmalar yapmıştır (Toranzo vd., 2005). Ayrıca Kuzey İtalya'da balıklardan ve süt ürünlerinden elde edilen *L. garvieae* izolatları arasındaki genetik ilişki RAPD-PZR, Sau-PZR ve AFLP metodu ile incelenmiş olup, 81 izolat arasındaki genetik ilişki düşük bulunmuştur (Foschino vd., 2008).

Çalışmaya konu olan *Lactococcus garvieae* izolatlarının genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılan ERIC-PZR metodu epidemiyolojik olarak Türkiye ve dünyada daha önce çalışılmamıştır. Mikroorganizmaların ayırımının yapılmasında ERIC-PZR son yıllarda pahalı ekipmanlara gerek duyulmaması, fazla zaman ve uğraş gerektirmemesi gibi nedenlerden dolayı PFGE ve RFLP gibi metotların yerini almıştır (Silveria vd., 2002). ERIC-PZR, *Enterobacter sakazakii* (Ye vd., 2008) ve *Haemophilus parasuis*'in (Macedo vd., 2010) kendi suşları arasındaki genotiplendirmede ve *Escherichia coli*'nin etkili yayılma yollarının araştırılmasında (Duan vd., 2009) kullanılmıştır.

Balıklarda *Streptococcus* cinsi etkenlerden kaynaklanan enfeksiyonlara karşı eskiden beri antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak bu kimyasalların gelişigüzel kullanımı antibiyotiklere olan direnci arttırmıştır (Robinson vd., 1966; Katao vd., 1982). Ravelo vd. (2001), farklı coğrafik orijinli *L. garvieae* suşları ile antibiyogram testi çalışmaları gerçekleştirmiştir. Suşların tümünün enrofloksasin ve nitrofurantoine karşı duyarlı olduğunu oksolinic asit ve sulfametoksazol-trimetoprim karşı ise dirençli olduğu bildirirken eritromisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin ve ampiciline karşı ise sonuçların orijine göre değişken olduğunu bildirmiştir. Türkiye'de bu konuda ilk çalışma Kubilay vd. (2005) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, 9 farklı *L. garvieae* suşunun disk difüzyon tekniği antimikrobiyal duyarlılıklarını incelemişler aynı zamanda E testi ile eritromisin antibiyotiğinin minimal inhibitör konsantrasyon değerlerini incelemişlerdir.

Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisine olanak sağlayan metotların artması ile beraber tedavi alternatifleri de artmaktadır. Su ürünleri sektöründe kullanımı 1940'lı yıllara dayanan antibiyotiklere 1985'li yıllarda yenileri eklenmiş sülfadiazin, oksitetrasiklin, kloramfenikol, kanamisin, oksalinik asit ve flumeguın gibi antibiyotikler bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (Austin ve Austin, 2007).



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Örnekleme

Örnekleme takvimi belirlenirken, *Lactococcus* salgınlarının görüldüğü mevsim ve denizlerdeki kafes işletmelerinde su sıcaklığına bağlı olarak balıkların denizden derelerdeki işletmelere yada derelerden tekrar denize alınması gibi kriterler dikkate alınmıştır. Bu nedenle hem deniz ve göllerde ki kafes işletmelerinden hem de dere üzerinde bulunan işletmelerden Mayıs ile Ekim ayları arasında beş işletmeden ikişer kez örnekleme yapılmıştır. Örnekleme çalışmaları 2009 ve 2010 yaz ve sonbahar aylarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hastalık durumlarında örnekleme kapsamında olan ve olmayan çevre işletmelerden gelen balık örnekleri de incelenmiştir.

Örneklemede, yüzme bozukluğu görülen, sırtı kararmış, hasta görünümlü yada yeni ölmüş balıklar alınmıştır. Her örneklemede ortalama 3,5 ile 300 gram arası ağırlığında 8 ile 25 arasında balık incelenmiştir. Örnekleme yapılan iller ve buralardan alınan balık türleri ve sayıları tablo 2’de belirtilmiştir.

Laboratuara uzak noktalardaki işletmelerden alınan balıkların işlenmesi tesise ait uygun alanlarda gerçekleştirilmiş olup yakın noktalardaki örnekler Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne ait laboratuara seyyar buzdolabı içerisinde getirilmiştir. Örnekleme yapılan işletmelerden ayrıca o anki su ve hava sıcaklığı balıkların menşei ve genel durumu gibi bilgiler de alınmıştır.

Ayrıca 2007-2010 yılları arasında Ege, Akdeniz ve Karadeniz Bölgesi’nde ki çeşitli işletmelerden çeşitli araştırmacılar tarafından izole edilen ve yurt dışından İtalya, Fransa ve Japonya’dan toplam 38 adet *L. garvieae* izolatları da çalışmaya dahil edilmiştir. Tablo 3., de bu izolatları kaynağı, izole edildikleri yıllar ve orijinleri belirtilmiştir.

Tablo 2. Çalışma süresince belirlenen bölgelerden alınan balıklar ve sayıları

Tür	Kayseri	Ordu	Gümüşhane	Rize	Trabzon	Toplam
Gökkuşığı alabalığı	40	-	18	15	30	103
Karadeniz alabalığı	-	-	1	10	9	20
Levrek	-	34	-	-	20	54
<b>Toplam</b>	<b>40</b>	<b>34</b>	<b>19</b>	<b>25</b>	<b>59</b>	<b>177</b>

Tablo 3. *Lactococcus garvieae* izolatları, ait oldukları yıllar ve bunların menşeleri

	<b>İzolat</b>	<b>Kaynak</b>	<b>Orijin</b>	<b>Yıl</b>
1	216-6	Gökkuşığı	Rize	2007
2	K5.K6,K9,K10/ M.T.	Gökkuşığı	Gümüşhane	2009
3	Sider-17	Gökkuşığı	Rize	2008
4	Ard. 17,22,30/M.T.	Gökkuşığı	Rize	2007
5	440-9,399-18,629-13	Gökkuşığı	Artvin	2008
6	673-5	Gökkuşığı	Gümüşhane	2008
7	İyi. Şfk.	Gökkuşığı	Rize	2009
8	Aşğ. Ard.-37	Gökkuşığı	Rize	2008
9	Ö. M. Eskit.	Gökkuşığı	Rize	2008
10	225-1 Pap.	Gökkuşığı	Artvin	2008
11	Muğla	Gökkuşığı	Muğla	2009
12	636-16	Gökkuşığı	Gümüşhane	2008
13	235-16	gökkuşığı	İzmir	2009
14	671-14	gökkuşığı	Gümüşhane	2008
15	Ard. Aşğ.	gökkuşığı	Rize	2008
16	512-8	gökkuşığı	Rize	2008
17	670-20	gökkuşığı	Gümüşhane	2008
18	Şer. 114/deniz	gökkuşığı	Trabzon	2009
19	511-15	gökkuşığı	Rize	2008
20	B. Barajı Ard.	gökkuşığı	Artvin	2008
21	Ard. F-14	gökkuşığı	Rize	2009
22	8740/03	gökkuşığı	İspanya	2003
23	M 300	keçi peyniri	İtalya	2001
24	G-27	Sığır sütü	İtalya	2003
25	PP60	Gökkuşığı	İtalya	2004
26	Muğ. 1	Gökkuşığı	Muğla	2002
27	Muğ. 2	Gökkuşığı	Muğla	2002
28	Muğ. 3	Gökkuşığı	Muğla	2003
29	A-58	Gökkuşığı	İtalya	2002
30	ATCC 49156	Sarıkuyruk	Japonya	1991
31	04/8782 ITP109	Gökkuşığı	İspanya	2002
32	2398	Gökkuşığı	Fransa	1998
33	1684	Gökkuşığı	İspanya	1997
34	1073/03C	Gökkuşığı	İspanya	-
35	04/8782 FTPI	Gökkuşığı	İspanya	2001
36	04/8782 (532)	Gökkuşığı	İspanya	2001
37	04/8782 (498)	Gökkuşığı	İspanya	2001
38	164 A/03	Gökkuşığı	İspanya	2000
39	8053 C/02	Gökkuşığı	İspanya	2000
40	L lactis	Gökkuşığı	Akdeniz	2005
41	Perşembe	Gökkuşığı	Ordu	2011

## 2.2. Örneklerin İncelenmesi

Laboratuara getirilen örneklerin kontaminasyonu önlemek amacıyla dış yüzeyleri % 70 lik alkol ile temizlendi. Daha sonra anüsten başlayarak baş kısmına kadar olan bölge bağırsaklara zarar vermeden steril bir makasla ensizyon yapılarak iç organlar açığa çıkarıldı. Ön böbreklerden ve karaciğerden steril swab (Copan Italia S.P.A) yardımıyla BHIA'a ekimler yapılarak aerobik şartlarda 25-30°C de 24-48 saat inkube edildi.

## 2.3. Bakterilerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

İki günün ardından üreme görülen besi yerlerinde bakterilerin oluşturduğu koloniler renk, şekil ve parlaklık gibi morfolojik özellikleri bakımından incelendi. Farklı koloni morfolojisi gösteren bakteriler yeniden BHIA ve TSA besi yerlerine ekilerek saflaştırıldı. 25°C 24-48 saatlik inkubasyon sonucunda üreyen saf bakterilerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile gram boyama yapıldı. İzolatların hareket özellikleri lam üzerinde mikroskopta incelendi. Gram ve hareket gibi temel özellikler belirlendikten sonra biyokimyasal testler o yönde şekillendirildi.

## 2.4. Bakterilerin Biyokimyasal Karakterlerinin Belirlenmesi

Saflaştırdığımız bakterilerin biyokimyasal karakterlerinin belirlenmesi için oksidaz, katalaz, oksidasyon/fermentasyon, hareket, sitrat, jelatin, H<sub>2</sub>S üretimi, indol, Voges Proskar (VP), metil red (MR), laktoz, glikoz, sakkaroz, hemoliz, arjinin dehidrolaz (ADH), PYR, starch, %4 ile %6,5 NaCl'de üreme ve 4°C ile 45°C de üreme gibi klasik testler yapıldı (Cagirgan, 2004). Bu testlerin dışında izole edilen gram (+) bakterilere API 20Strep ve gram (-) lere ise API 20E ve API 20NE (Biomerieux, France) testlerini uygulandı.

Tüm *L. garvieae* suşları daha sonra PZR ve diğer işlemlere geçilinceye kadar %15 gliserol içeren TSB (triptik soy brot) içerisinde -80°C'de saklandı.

## 2.5. Biyokimyasal Testlerin Uygulanması

Biyokimyasal testler ve API 20Strep uygulamaları örneklemeleri takiben saf olarak izole edilen bakterilere ve diğer araştırmacıardan temin edilen *L. garvieae* izolatlarının

tümüne uygulandı. Stoktan (-80°C) çıkartılan izolatlar TSA'ya ekildi. 30°C de 24 saat inkübe edildikten sonra biyokimyasal testlere geçildi. API 20 Strep testi (Biomerieux, France) bakterilerin biyokimyasal karakterlerini araştırmak için inkubasyon sıcaklığı hariç (30°C) üretici firma talimatlarına göre yapıldı.

Oksidaz testi için (Microbiology Bactident Oxidase-Merck) den yararlanıldı. TSA da üreyen bakterilerden steril öze yardımı ile bir miktar alınarak serum fizyolojik ile ıslatılmış test kağıtlarına yayılarak 30 saniye içerisinde kağıt yüzeyinde renk değişimine bakıldı. Katalaz testi TSA da üremiş taze koloniden steril öze yardımı ile alınan bir öze dolusu bakteri temiz bir lam üzerine damlatılmış bir damla %3'lük hidrojen peroksit üzerine yayılarak gerçekleştirildi.

Voges Proskar ve metil red testleri VP-MR medium (Merck) üretici talimatlarına uygun şekilde hazırlanarak yapıldı. Oksidasyon ve fermantasyon testleri (OF) Becton Dickenson BBG O/F basal medyum talimatlarına uygun olarak hazırlanarak yapıldı. Jelatin testi için Nutrient-Gelatin Test Medium hazırlanarak talimatlara uygun gerçekleştirildi.

Sukroz, maltoz ve glukoz testleri TSI (Triple Sugar Iron Agar, Merck) talimatına uygun olarak hazırlandı ve yapıldı. H<sub>2</sub>S, indol ve motilite testleri SIM medyuma (Sülfür, İndol, Motilite, Merck) göre hazırlanıp yapıldı (*Biotechnology Procedures and Experiments Handbook*. S.237). Sitrat kullanım testi, Simmon's Citrate Agar, Merck e göre hazırlanıp yapıldı.

İzolatların tuz toleranslarını test etmek amacıyla %4 ve %6.5 NaCl içeren TSA hazırlandı ve 30°C'de 14 gün inkubasyona bırakıldı. Yine 4°C ve 45°C'de üremelerini test etmek amacı ile %0,5 NaCl içeren TSA hazırlandı ve 14 gün süreyle sözü edilen sıcaklıklarda inkubasyona bırakıldı (Cagırgan, 2004). Negatif yada belirsiz sonuç veren izolatlar için bu işlemler 2 kez tekrarlandı.

İzolatların hemoliz özelliklerini araştırmak amacıyla piyasada ki hazır koyun kanlı agarlar (Or-Bak, Türkiye) kullanıldı. PYR aktivite testi *Lactococcus*'ların kendi aralarında tür tayini açısından önemli bir test olup hazır test kitleri ile (Oxoid Biochemical Identification System) üretici firma talimatlarına uygun şekilde yapıldı.

Starch hidroliz testi için starch agar kullanıldı (Anonim, *Biotechnology Procedures and Experiments Handbook*. S. 234).

## 2.6. Antibiyogram Testi

Elde edilen *L. garvieae* izolatlarının tümüne antimikrobiyal hassasiyetlerini belirlemek ve suşlar arasındaki antibiyotik direnç farklılıklarını tespit etmek amacıyla çeşitli antibiyotikler ile disk difüzyon testi uygulandı. Bu amaçla ticari antibiyotik diskleri (oxid) florfenikol 30, enrofloksasin 5, eritromisin 15, amoksisilin 10, oksitetrasiklin 30, tetrasiklin 30, penisilin G 10U, gentamisin 10, trimetoprim+sulfametoksazol 25 ve siprofloksasin 5 ( $\mu\text{g}/\text{disk}$ ) kullanıldı. Seçilen antibiyotiklerin arasında hem bakterisit hem de bakteristatik bileşiklerin bulunmasına dikkat edilmiştir.

Bu amaçla izolatlar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de stok kültür ortamından çıkartılıp oda sıcaklığında bekletildikten sonra steril öze yardımıyla TSA agara ekildi.  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat üretildikten sonra içerisinde birer ml serum fizyolojik suyu bulunan ependorflarda bakteri bulanıklığı aynı olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı (Kubilay vd., 2005). Bu bakteri süspansiyonlarından 0.1 ml alınarak Müller Hinton Agar üzerine steril eküvyon yardımıyla iyice yayıldı ve steril kabin içerisinde 5 dakika beklenerek petrilerin kuruması sağlandı. Daha sonra agar yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş diskler steril pens yardımı ile eşit mesafede yerleştirilerek  $30^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda oluşan zon çapları hassas cetvel ile ölçüldü. Test sonuçları suşlar için hassas (S) ve dirençli (R) şeklinde kaydedildi. Hassas kabul edilen sınır değerleri ortalama oksitetrasiklin için 13 mm, gentamisin için 14 mm, amoksisilin için 15 mm, florfenikol ve trimetoprim+sulfametoksazol için 16 mm, eritromisin için 18 mm, enrofloksasin, tetracycline ve penisilin G için 20 mm, ve siprofloksasin için 22 mm olarak kabul edildi (NCCLS, 2002).

## 2.7. PCR için DNA İzolasyonu

Mevcut tüm izolatlara teyit amacıyla PCR yapıldı. Örneklerin toplam genomik DNA'sı, QIAamp DNA Mini Kit, (QIAGEN) hazır ticari kiti ile (gram + bakteriden DNA izolasyonu) ekstrakt edildi. Ekstraksiyon aşamalarında üretici firma talimatlarına aynen uyulmuştur. Elde edilen DNA'lar PCR işlemine geçilinceye kadar  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklandı.

## 2.8. PCR Şartları ve Görüntüleme

Çalışmada daha önceden *L. garvieae* için dizayn edilen primerler kullanıldı. Bu amaçla 857 bp'lik LgF: 5'-CCA ACT TCC GTG GTG TGA CG-3'; LgR 5'-AGT GGC TCA ACC ATT GTG TGC-3' şeklinde spesifik primerler kullanıldı (Altinok, 2011). PCR işleminde pozitif kontrol olarak (ATCC 49156) bakterisi kullanıldı. Ayrıca örnek DNA sı içermeyen negatif kontrolde kullanıldı.

DNA'nın yükseltgenme işlemi her bir örnek DNA'sı ile birlikte toplam 25 µl'lik PZR hacminde yürütüldü. Bu karışım içerisinde sırasıyla; DNA, ileri ve geri yönlü primerler, PZR Master karışım, 2X (PROMEGA) ve dH<sub>2</sub>O bulunmaktadır. Hazırlanan karışım 0,5 ml'lik PZR tüplerine dağıtıldı (Tablo 4).

Tablo 4. DNA'nın yükseltgenme işlemi için belirlenen PZR karışımının bileşenleri ve miktarları

PZR Bileşenleri	Miktar
2X Master Mix (50U/ ml Taq DNA polymerase, 400µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 3Mm MgCl <sub>2</sub> )	12,5µl
İleri Primer	0,5µl
Geri Primer	0,5µl
DNA	1µl
Nuclease free water	10,5µl
Toplam	25µl

Örneklerin 16S rRNA spesifik gen bölgelerinin çoğaltılması Thermal Cycler (Thermo hybrid) yardımıyla yapıldı. İlk adımda 94°C'de 3 dakika'lık bir denaturasyon işlemi yapılarak döngülere geçildi. Döngü içerisinde tekrar 94°C'de 1 dakikalık denaturasyon, 60°C'de 50 saniye annealing (yapışma), ve 72°C'de 60 saniye extension (uzatma) işlemi için uygulandı. 35 döngü sonrasında 72°C'de 10 dakika son uzama ile işlem tamamlandı (Altinok, 2011). PCR işleminden sonra örnekler 1x TBE tampon sisteminde %1,5'lük agaroz jelde yürütüldü. Daha sonra etidium bromür (1mg/100µl) ile boyanarak jel görüntüleri jel görüntüleme sistemine (Kodak Gel Logic 200) aktarıldıktan sonra analiz edildi.

## 2.9. ERIC-PCR Metodu

Bu amaçla yukarıda açıklandığı gibi PZR için ekstrakt edilen genomik DNA'lar kullanıldı. Daha önceki çalışmalarda ERIC1R ve ERIC2 primerleri kullanılarak yapılan denemelerde ERIC2 primerinin daha güçlü ayırt edici özelliğe sahip olduğu belirlendi (Matsumoto vd., 2001). Çalışmada ERIC2: 5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG3' primeri kullanıldı (Versalovic vd., 1991). DNA'nın çoğaltılması işlemi her bir örnek DNA'sı ile birlikte toplam 50 µl hacminde yapılmıştır. PZR karışımı 1 µL 10 µM Primer, 25 µL 2X Quigen multipleks PCR karışımı, 5 µL Q solution, 1 µL DNA ve 18 µl distile sudan oluşmuştur. ERIC-PZR başlangıç denaturasyon (95°C'de 15 dakika) takiben 30 siklus denaturasyon (94°C de 1 dakika), yapışma (25°C'de 1.5 dakika) ve DNA uzama (72°C de 1 dakika, 50 sn ) ve final uzama (72°C'de 10 dakika) şeklinde Termocycler (Termo Electron Corporation, USA) kullanılarak yürütüldü. PZR ürünü %1 agaroz jel de yürütüldükten sonra etidium bromür (1 mg/100 µl) ile boyandı ve UV altında jel görüntüleri jel görüntüleme sistemine aktarıldıktan sonra analiz edildi.

Bant desenleri Bionumerics Gelcompar II software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ile analiz edildi. Farklı izolatların bant desenleri arasında ki benzerlik Dice similarity coefficient kullanılarak %2,5 tolerans ve %1 optimizasyon kullanılarak hesaplandı. Sonrasında küme analizi kullanılarak [unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA)] dendogram oluşturuldu.

### **3. BULGULAR**

#### **3.1. İşletmelerin Genel Durumu**

2009 ve 2010 yaz aylarında iki kez örnekleme yapılan işletmeler balıkların bir kısmını sağım yoluyla kendileri yetiştirdikleri bir kısmının da Kayseri, İzmir, Muğla gibi yörelerden azda olsa çevre işletmelerden aldıkları tespit edilmiştir. Yumurta yada yavru alımı esnasında hastalık kontrollerinin profesyonelce yapılmadığı genellikle kulaktan dolma bilgilerle gerçekleştirildiği görülmüştür. Yine örnekleme yapılan büyük çaplı işletmelerin çevrelerinde ki küçük işletmelere yavru yada porsiyonluk boyda balık temin ettikleri belirlenmiştir.

Akarsular üzerine kurulu işletmelerin yıllık üretim kapasiteleri 30 ile 130 ton arasında değişmektedir. Denizlerdeki işletmelerin kapasiteleri çok daha yüksektir. Bu işletmelerin bazılarında suyun debisi, havuza giren suyun değişim süresi ve miktarı, havuzların yoğunluğu, suyun fiziksel ve kimyasal yapısı gibi basit kurallara uyulduğu bazılarında ise bu kriterlerin mevsime bağlı olarak değişim gösterdiği ve bazen sınır değerlerin dışında olduğu görülmüştür.

Yaz aylarında gerçekleştirilen örnek toplama işleminde hava sıcaklığı 15°C ile 28°C arasında su sıcaklığı ise buna paralel olarak 8°C ile 19°C arasında değişmektedir. Bazı işletmelerde coğrafik konumundan dolayı su sıcaklığının 14°C'yi hiç geçmediği bazılarında ise 22°C'yi bulduğu görülmüştür. İşletmelerdeki suyun pH'sı 6,2 ile 7,4 arasında değişmektedir. Özellikle ormanlık alanlar arasına kurulan işletmelerdeki suyun pH sı düşük bulunmuştur.

Baraj göllerinde ve denizlerde ki kafes işletmelerinde yapılan balık üreticiliğinde benzer yanlış yaklaşımlarla karşılaşmıştır. Kafeslerin kıyıdan uzaklığının ve derinliklerinin nizami olmaması, farklı işletmelere ait kafeslerin birbirine çok yakın olması, bazılarının sektörle ilgili yetkili eleman (Balıkçılık Teknolojisi Mühendisi, Su Ürünleri Müh. vs.) çalıştırmadığını gözlemlenmiştir.

Bazı işletmelerin kış aylarında su yollarının donması yazın su sıcaklıklarının balığın tolere edebildiğinden daha yukarılara çıkması fazla yağmur yağdığında suyun bulanıklaşması ve askıdaki katı madde miktarının artması gibi olumsuzluklar yaşadıklarını ve bu olumsuzluklara karşı bir b planlarının olmadığı görülmüştür.



Yine bazı işletmelerin hastalık çıktığında bu durumu ticari kaygı sebebi ile gizlemesi, orijini belirsiz bazı antibiyotikleri gelişi güzel test etmeden kullanması, son çare olarak üniversite yada enstitülere başvurması gibi durumlara şahit olunmuştur. İlaçların pozolojilerinin ayarlanması, uygulama ve saklanma şekilleri konusunda da yanlışlar yapılmaktadır. Tüm bu olumsuzluklar işletmelerde balık hastalıklarının çıkışını ve yayılmasını kolaylaştırmakta ve tedavi edilmesini bir o kadar güçleştirmektedir. Bilinçsiz ilaç kullanımı ile beraber dirençli suşlar gelişmekte bu durumda işletmelerde ekonomik kayba neden olmaktadır.

### 3.2. Biyokimyasal Test Sonuçları

Örneklerin karaciğer ve böbrek dokularından ilk olarak BHIA yada TSA'ya ekilmesinden sonra üreme görülen petriyelerdeki farklı morfoloji gösteren koloniler mikroskop altında tek tek alınarak saflaştırılmıştır. Saf koloniler halinde izole edilen izolatlara klasik biyokimyasal testler ve duruma göre API 20 Strep, API20 E yada API20 NE uygulanmıştır. Tüm bu testler ayrıca daha önceki yıllarda izole edilen *L. garvieae* olduğunu bildiğimiz suşlara da uygulanmış ve tüm izolatların tanımlanması yapılmıştır.

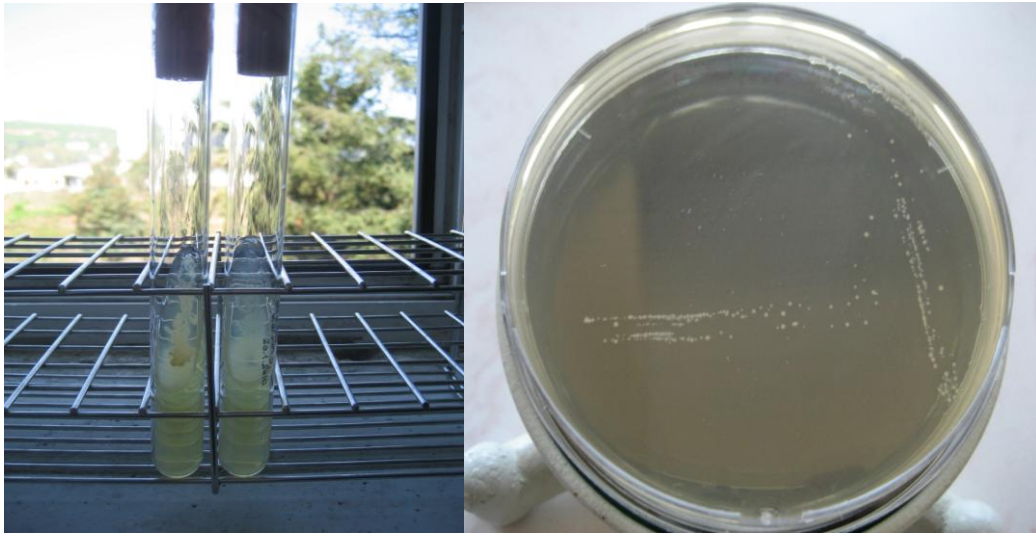
Örnekleme süresi boyunca üç işletmeden *L. garvieae* bakterisi izole edilmiş olup bunun dışında farklı işletmelerden *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*, *H. alvei*, *V. fluvialis* ve diğer *Vibrio sp.* türleri izole edilmiştir. Beş farklı işletmeden yedisi tür ve biride cins bazında olmak üzere toplam sekiz farklı bakteri izole edilmiştir. *Lactococcus garvieae* bakterisi 2009 da Rize'de dere işletmesinden, Gümüşhane'de baraj gölü işletmesinden ve 2010 yılında Perşembe deniz kafesi işletmesinden olmak üzere toplam üç ayrı yerden izole edilmiştir. Diğer bakteriyel patojenler identifikasyon işleminin ardından antibiyogram testine tabi tutulmuş ve sonuçları işletme sahipleri ile paylaşılmıştır.

Örnekleme yapılan balıklardan tanımlanan bakteriler ve hangi dokulardan izole edildikleri Tablo 5'da belirtilmiştir.

Tablo. 5. Denizde bulunan kafeslerden ve tatlı su işletmelerinden izole edilen bakteriler ve dokuları

Bakteri	Örnek	İzole Edilen Doku		
		Böbrek	Karaciğer	İşletme Sayısı
<i>L. garvieae</i>	15	12	7	3
<i>A.salmonicida ssp.</i>	8	8	6	1
Motil <i>Aeromonas</i>	16	13	10	2
<i>Vibrio fluvialis</i>	6	6	-	1
<i>Vibrio ssp.</i>	12	11	5	4
<i>Pseudomonas luteola</i>	7	6	4	2
<i>Yersinia ruckeri</i>	6	6	-	1
<i>Hefnia alvei</i>	5	5	-	1

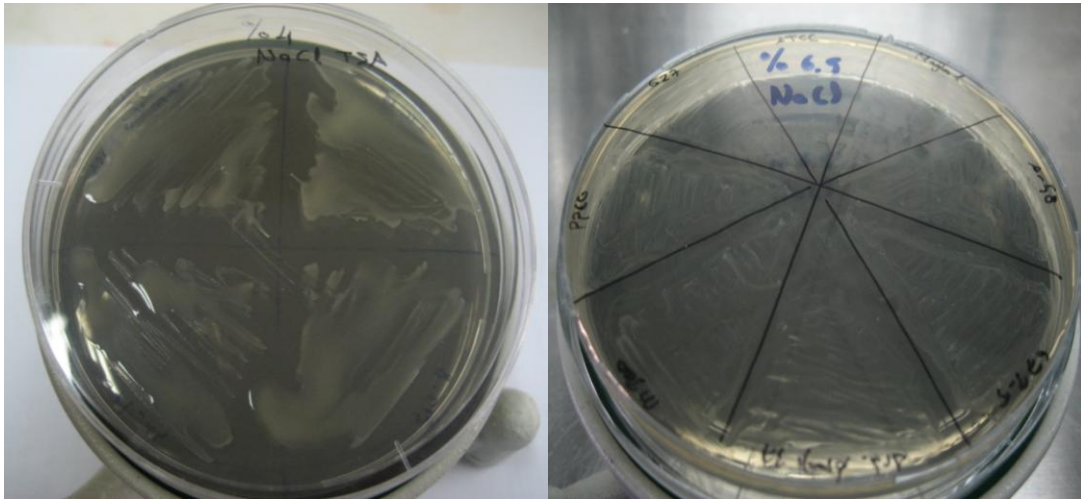
*Lactococcus garvieae* izolatından birisi su sıcaklığının 9-10°C’lerde seyrettiği ve balıkların sağlıklı görüldüğü bir işletmeden izole edilmiştir. *Lactococcus garvieae*’nin BHIA ve TSA ‘da 25°C de 24-36 saatte toplu iğne başı büyüklüğünde tek tek parlak düzgün kenarlı koloniler meydana getirdiği gözlenmiştir (şekil 1).



Şekil 1. *Lactococcus garvieae*’ nin TSA’ daki görüntüsü (tüp ve petri)

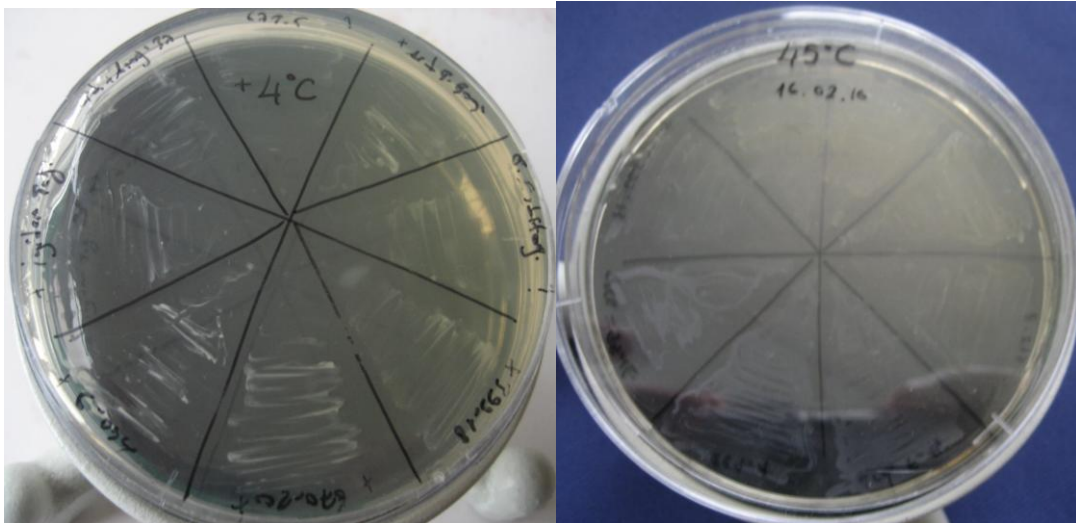
Rutin örneklemelerin dışında hastalık problemi ile çevre tesislerden gelen balık örnekleri de incelenmiştir. Bu amaçla yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda tatlı

sulardan en fazla *Yersinia ruckeri* izole edilirken denizlerdeki işletmelerden çoğunlukla *Vibrio* türleri izole edilmiştir. Bakteri izole edilen balıkların ağız çevresinde, anal, pektoral ve kaudal yüzgeçlerinde ve operkulumda yaygın kanamalar, iç organlarda değişen şekil ve miktarlarda kanamalar, karın boşluğunda sıvı birikimi (asides) ve bazılarında ekzoptalmus tespit edilirken bazı durumlarda balıkların hiçbir semptom göstermedikleri de (latent enfeksiyon) gözlenmiştir. Şekil 2 ve 3'de *L. garvieae* izolatlarına ait biyokimyasal testlerin bazıları gösterilmektedir.



a) % 4 NaCl de üreme

b) % 6,5 NaCl de üreme



c) 4°C de üreme

d) 45°C de üreme

Şekil 2. Bazı *L. garvieae* izolatlarının farklı tuzluluk ve sıcaklıklardaki görüntüsü

a) Hemoliz ( $\alpha$ )b) Starch hidrolizi (*L. garvieae*, *A. salmonicida*)

c) TSI (Triple sugar iron agar, - + +)



d) PYR Testi

Şekil 3. *L. garvieae* izolatlarına ait biyokimyasal testlerin bazıları



Şekil 4. *L. garvieae* izolatlarına ait API20 Strep testi (24 saat sonra)

*Lactococcus garvieae* izolatlarına ait klasik biyokimyasal ve API 20 Strep oranları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Klasik biyokimyasal ve API 20Strep sonuçları

Biyokimyasal Testler (Konvensiyonel)		Biyokimyasal Testler (API20 STREP)	
Katalaz	-(41/41)	VP	+(32/41)
Oksidaz	-(41/41)	HIP	+(21/41)
O/F	+(41/41)	ESC	+(29/41)
Motilite	-(41/41)	PYRA	+(40/41)
Sitrat	-(41/41)	α GAL	-(40/41)
Jelatin	-(41/41)	β GUR	-(41/41)
H <sub>2</sub> S	-(41/41)	β GAL	-(36/41)
İndol	-(41/41)	PAL	-(41/41)
MR	+(41/41)	LAP	+(39/41)
VP	+(41/41)	ADH	+(34/41)
LAC	+(41/41)	RIB	+(37/41)
GLU	+(41/41)	ARA	-(38/41)
SAC	+(41/41)	MAN	+(35/41)
α (alfa) Hemoliz	+(41/41)	SOR	-(41/41)
%4Nacl	+(41/41)	LAC	-(32/41)
%6,5Nacl	+(33/41)	INU	-(41/41)
45°C üreme	+(35/41)	RAF	-(41/41)
4°C üreme	+(40/41)	AMD	-(41/41)
Starch	-(41/41)	GLYD	-(38/41)
ADH	+(41/41)	TRE	+(37/41)
PYR	+(41/41)		





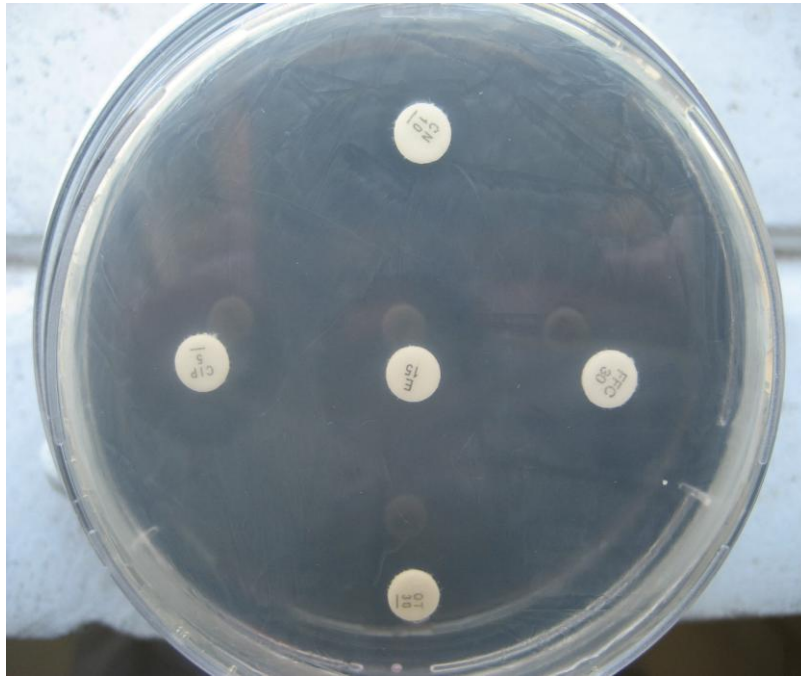
Tablo 7'nin devamı

Suşlar/ Test	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
OX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kat.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Motil.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
VP kls.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HIP	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ESC	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Pyra	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α Gal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
β Gur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β Gal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ADH	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RIB	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MAN	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
TRE	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYD	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
HEM	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α
45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
4°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%6,5Nacl	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
%4 Nacl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GLU kls.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC kls.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH kls.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC kls.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 7'nin üst satırındaki numaralar Tablo 4'de yazılı izolatlar ile aynı sırayı temsil etmektedir.

### 3.3. Antibiyotik Duyarlılıkları

*Lactococcus garvieae* suşlarının yapılan disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları her bir suş için ayrı ayrı tablo 8’de verilmiştir. Bu test gerek yakın dönem *L. garvieae* izolatların antibiyotik dirençlerinin ortaya çıkarılması gerekse suşlar arası farklılıkların görülmesi açısından önemli bulgular ortaya koymaktadır. Antibiyogram testinde bakteriye karşı duyarlı olan antibiyotiklerde değişen miktarlarda bir inhibisyon zonu oluşmuştur (şekil 5).



Şekil 5. Bir *L. garvieae* suşuna uygulanan antibiyogram testi

Bu sonuçlara göre antibiyogram testi uygulanan suşların genel olarak; oksitetrasiklin, amoksisilin, tetrasiklin ve florfenikol gibi antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları, gentamisin ve sulfametoksazol+trimethoprim gibi antibiyotiklere karşı ise dirençli oldukları saptanmıştır. Bunun yanı sıra aynı bakterilerin siprofloksasine karşı %68, penisiline karşı %33, enrofloksasine karşı ise %40 ve eritromisin antibiyotiğine karşı %12’sinin direnç gösterdiği saptanmıştır.



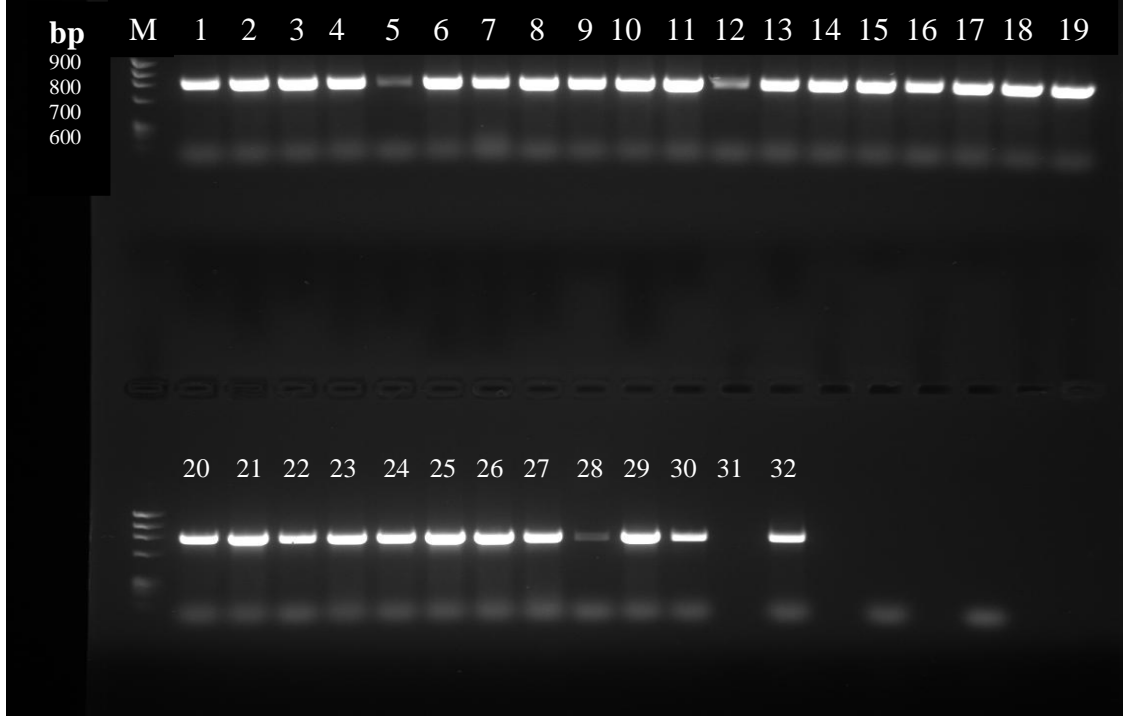
Tablo 8. *L.garvieae* izolatlarının disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları

<b>Suşlar/ Antib.</b>	T30	AML10	E15	CIP5	TE30	P10	FFC30	CN10	SXT25	ENR5
<b>216-6</b>	S(21)	R(15)	R(13)	R(19)	S(23)	R(14)	S(24)	R(12)	S(20)	S(22)
<b>K5,6,9,10 M.T.</b>	S(36)	S(20)	S(35)	R(20)	S(32)	S(30)	S(30)	R(13)	R(0)	R(18)
<b>Sider17</b>	S(41)	S(23)	R(13)	S(28)	S(38)	R(12)	S(36)	R(13)	R(0)	S(35)
<b>Ard. 17,22,30</b>	S(38)	S(20)	R(10)	S(30)	S(38)	R(10)	S(32)	R(11)	R(0)	R(19)
<b>399-18,629-13</b>	S(23)	S(18)	S(20)	R(16)	I(21)	R(17)	S(19)	R(9)	R(0)	R(19)
<b>İyd. Şafk.</b>	S(24)	S(21)	S(21)	R(16)	S(26)	R(18)	S(18)	R(10)	R(0)	R(17)
<b>Aşğ.Ard.-37</b>	S(27)	S(19)	S(21)	R(16)	S(23)	I(20)	S(19)	R(11)	R(0)	R(0)
<b>Ö.M. Eskit.</b>	S(26)	S(21)	S(22)	R(18)	S(22)	I(20)	S(23)	R(10)	R(0)	S(22)
<b>225-1,Pap.</b>	S(26)	S(22)	S(21)	R(19)	S(27)	S(21)	S(21)	R(10)	R(0)	R(19)
<b>Muğla</b>	S(23)	S(21)	S(25)	I(21)	S(22)	S(27)	S(33)	R(9)	R(0)	S(25)
<b>636-16</b>	S(26)	S(18)	S(22)	R(17)	S(24)	R(18)	S(18)	R(10)	R(0)	R(15)
<b>235-16</b>	S(24)	S(22)	S(25)	R(20)	S(27)	S(21)	S(20)	R(10)	R(0)	I(20)
<b>671-14</b>	S(17)	S(19)	S(19)	R(17)	R(18)	S(21)	S(17)	R(10)	R(0)	R(17)
<b>Ard. Aşğ.</b>	S(30)	S(27)	S(22)	R(16)	S(26)	I(20)	S(22)	R(10)	R(0)	R(19)
<b>512-8</b>	S(22)	S(20)	S(28)	R(18)	S(22)	I(20)	S(28)	R(10)	R(9)	S(22)
<b>670-20</b>	S(22)	S(20)	S(22)	S(26)	S(25)	S(21)	S(24)	R(10)	R(14)	I(20)
<b>Şer. 114/deniz</b>	I(14)	R(8)	S(23)	I(21)	I(20)	R(9)	S(20)	R(10)	R(12)	R(18)
<b>511-15</b>	S(24)	S(21)	S(22)	R(18)	S(23)	I(20)	S(18)	R(9)	R(0)	S(21)
<b>B. Barajı Ard.</b>	S(21)	S(20)	S(20)	R(15)	S(23)	I(19)	S(20)	R(10)	R(0)	R(15)
<b>Ard. F-14</b>	S(23)	S(21)	S(21)	R(14)	S(27)	I(20)	S(22)	R(10)	R(0)	R(17)
<b>637-5, 675-5</b>	S(19)	S(18)	I(16)	R(20)	S(25)	R(15)	S(22)	R(11)	R(0)	I(20)
<b>M 300</b>	S(29)	S(22)	S(23)	I(21)	S(24)	S(27)	S(30)	S(18)	S(30)	S(25)
<b>G-27</b>	R(12)	S(26)	R(0)	R(18)	R(10)	S(22)	S(26)	R(9)	R(0)	I(20)
<b>PP6O</b>	S(26)	S(22)	S(23)	S(24)	S(30)	S(28)	S(26)	R(13)	R(0)	R(19)
<b>Muğ. 1</b>	S(28)	S(23)	S(27)	S(22)	S(27)	S(29)	S(25)	I(16)	R(0)	S(27)
<b>Muğ. 2</b>	I(14)	S(22)	S(29)	R(19)	S(24)	S(26)	S(31)	I(14)	R(0)	S(22)
<b>Muğ. 3</b>	S(27)	S(22)	S(25)	S(28)	S(29)	S(28)	S(27)	I(15)	R(0)	S(22)
<b>A-58</b>	S(22)	S(21)	S(24)	S(22)	S(25)	S(23)	S(26)	R(13)	R(0)	S(23)
<b>ATCC 49156</b>	S(27)	S(20)	S(21)	I(21)	S(27)	S(24)	S(20)	R(13)	R(0)	R(19)
<b>04/8782 ITP109</b>	S(31)	S(25)	S(26)	R(15)	S(24)	R(16)	S(18)	I(14)	R(10)	R(17)
<b>2398</b>	S(25)	S(21)	S(22)	R(20)	S(22)	S(23)	R(12)	R(11)	R(0)	R(19)
<b>1684</b>	S(23)	S(21)	I(17)	R(16)	R(18)	R(17)	I(16)	R(11)	R(0)	S(22)
<b>1073/03C</b>	S(24)	S(19)	S(19)	R(18)	S(22)	I(20)	I(16)	R(12)	R(0)	S(22)
<b>04/8782 FTPI</b>	S(24)	S(21)	S(20)	R(19)	I(21)	R(16)	I(16)	I(14)	R(0)	S(22)
<b>04/8782 (532)</b>	S(22)	S(22)	S(23)	R(19)	S(23)	S(24)	S(22)	R(0)	R(0)	S(21)
<b>04/8782 (498)</b>	S(26)	S(22)	S(30)	S(30)	S(34)	S(24)	S(21)	S(21)	R(0)	S(21)
<b>164 A/03</b>	S(18)	S(22)	I(17)	R(14)	S(27)	R(18)	S(20)	R(13)	R(0)	S(22)
<b>8053 C/02</b>	S(20)	S(24)	S(26)	R(18)	S(26)	S(25)	S(22)	R(0)	R(0)	S(27)
<b>L. lactis spp.</b>	S(24)	S(26)	R(11)	R(18)	S(22)	I(20)	S(18)	R(8)	S(28)	R(19)
<b>8740/03 C</b>	S(38)	S(27)	S(25)	S(24)	S(33)	S(24)	S(22)	I(15)	R(0)	S(40)

[T:Oksitetrasiklin, AML: Amoksisilin, E: Eritromisin, CIP: Siprofloksasin, TE: Tetrasiklin, P: Penisilin G, FFC: Florfenikol, CN: Gentamisin,SXT: Sulfamethoksazol+Trimetoprim, ENR: Enrofloksasin, Duyarlılık; R: Dirençli, S: Duyarlı, Zon çapı (mm)]

### 3.4. PCR Sonuçları

Klasik biyokimyasal testler ve API20 Strep sonuçlarına göre *L. garvieae* olarak identifiye edilen tüm izolatlara teyit amacıyla PCR yapılmıştır.

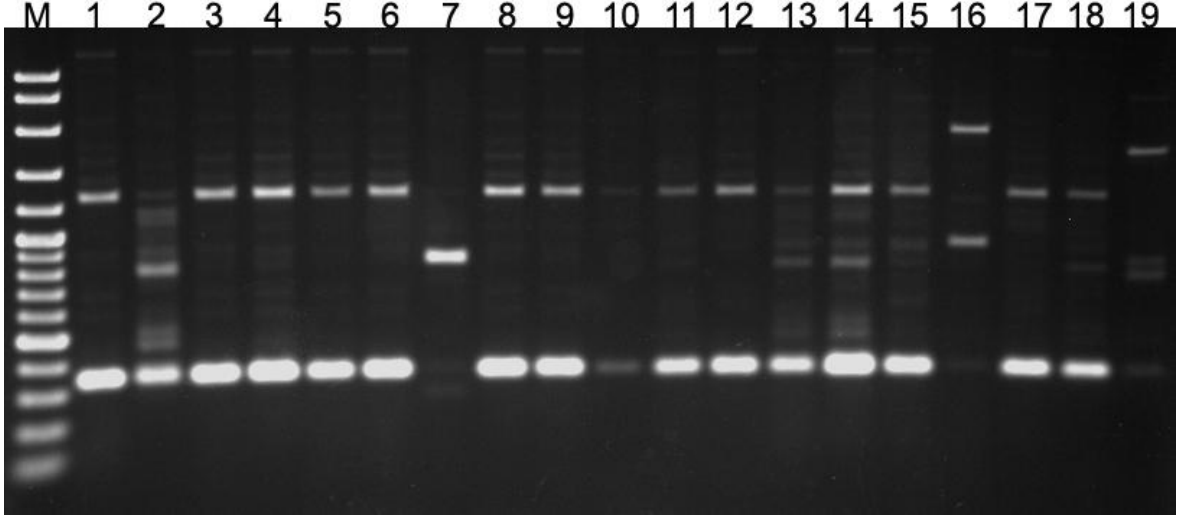


Şekil 6. PZR testi sonucu bazı *L. garvieae* suşlarının alınan görüntüleri, (M: Markır, 1:K-5, 2: Ard.30, 3: sider17, 4:399, 5:637-5, 6:İ.Şaf, 7:Ard.37, 8:Ö.eskit, 9:225-1, 10:Muğla, 11:636-16, 12:235-16, 13:M1, 14:M2, 15:M3, 16:M300, 17:A-58, 18:671-14, 19:512-8, 20:670-20, 21:Şer-114, 22:G-27, 23:511-15, 24:ITP109, 25:2398, 26:B. Baraj, 27:F-14, 28:1073, 29:8782, 30:164 A/03, 31:(-) kontrol, 32:ATCC49156

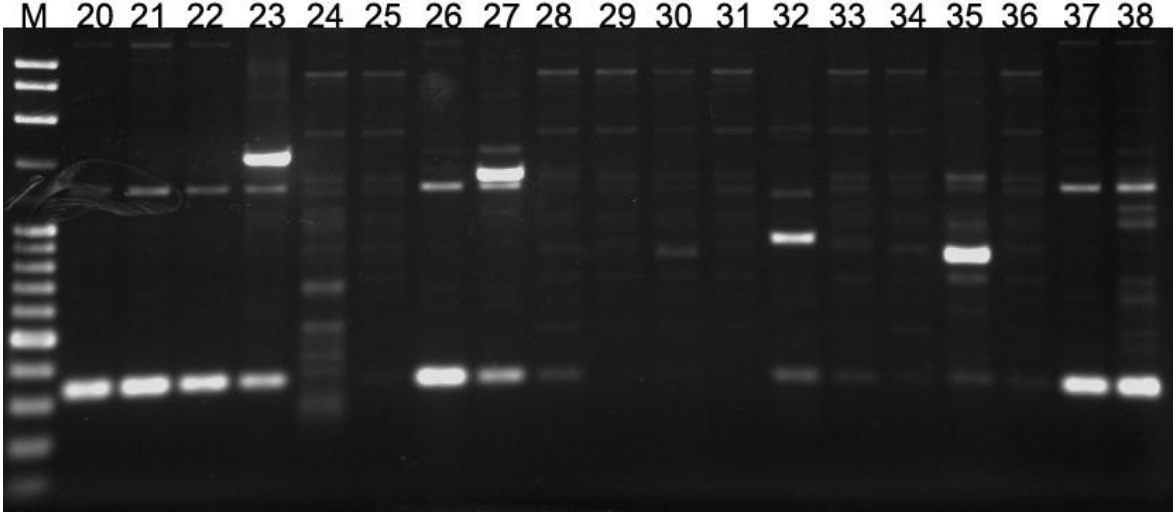
Bu işlem sonucunda mevcut kırk suşun *L. garvieae* olduğu saptanmıştır. Ayrıca Perşembe suşu teyit amacıyla sekansa gönderilmiştir. Elde edilen bakteri DNA'ları jelde yürütülerek marker ile ölçülmüş ve 857 bp'lik ürün boylarının aynı olduğu görülmüştür. Biyokimyasal yöntemler ve API sonuçlarına göre izole edilen *L. garvieae* bakterileri PCR yöntemi ile de doğrulanmıştır.

### 3.5. ERIC-PZR Sonuçları

*Lactococcus garvieae* izolatlarının genotiplendirilmesi amacıyla enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PZR) epidemiyolojik olarak Türkiye ve dünyada daha önce çalışılmamıştır. Bu çalışmada 5 farklı ülkeden ve farklı kaynaklardan 2001-2011 yılları arasında izole edilen toplam 39 adet *L. garvieae* izolatu ile 1 adet *L. lactis* izolatının genetik benzerlikleri karakterize edilmiştir. Bunun sonucunda *L. garvieae*'nin yayılımı ve bu olayın mekanizması hakkında daha derin bilgi edinilmiştir. ERIC-PZR için spesifik primer kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonundan sonra PCR ürünü agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuş ve sonra etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantların yeri ve sayısı kıyaslanarak çeşitlilik elde edilmiştir (Şekil 6). Çoğaltılan bantların yoğunluğuna bağlı olarak oluşan bir yada daha fazla bant farkı, farklı eric tiplerini ortaya koymaktadır. ERIC-PZR metoduna göre *L. garvieae* suşları 88 bp ile 3826 bp arasında 2 ile 15 adet farklı ürünler vermiştir.



Şekil 7.1. *L. garvieae* suşlarının ERIC-PZR modeli. M: markır (100bp), 1: A30, 2: A.A37, 3: B. Baraj, 4:235-16, 5:511-15, 6:671-14, 7:399-18, 8: Sider-17, 9: 673-5, 10: 216-6, 11: İy. Şaf, 12. 512-8, 13:225-1, 14: 235-16,15: F-14, 16: *L. lactis*, 17: Muğla, 18: 636-16, 19.Şer-114.



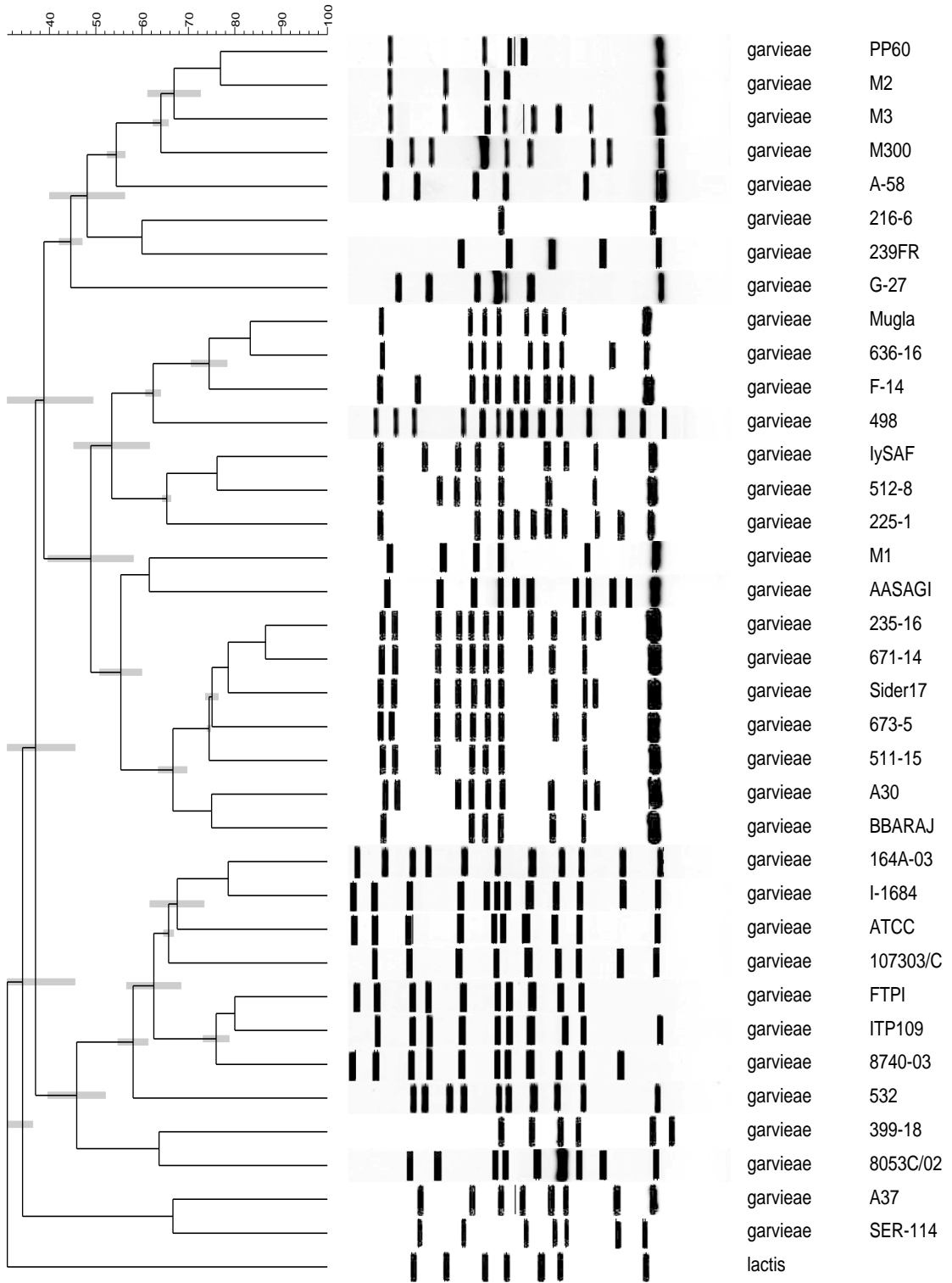
Şekil 7.2. *L. garvieae* suşlarının ERIC-PZR modeli. M: markır, 20: PP60, 21:M3, 22: M2, 23: M300, 24: 498, 25: 532, 26: A-58, 27: G-27, 28: 164A-03, 29: FTPI,30: ITP109, 31: 8740-03, 32: 2398Fr, 33: 1-1684, 34: 107303/c, 35: 8053C/02, 36: ATCC, 38: M1, 39: A.Aşağı.

Kırk adet suşun genomik DNA'larının ERIC-PZR ile çoğaltılmaları sonucu 40 farklı ERIC alt tipi oluşmuştur. ERIC-PZR 39 adet *L. garvieae* suşunu 8 temel kümede (E1-E8) guruplandırılmıştır.

Farklı alanlardan izole edilen 40 adet *Lactococcus* izolatu için ERIC-PZR ürünlerinin elektroforetik profilleri belirlendi. Tüm *L. garvieae* ve *L. lactis* izolatların görüntüsü software yardımıyla farklı kümeler içerisinde farklı benzerlik oranlarında gruplandırılmıştır (Şekil 7).

Bu sonuçlara göre izolatlar arası benzerlik oranları çok yüksek değildir ( $\leq$  %80). E1 kümesi 4 İtalya suşunun üçünü (%75), 4 Muğla suşunun ikisini (%50), 1 Fransa ve 1 de Karadeniz suşu içermektedir. İtalya'dan izole edilen ve ikisi gökkuşağı alabalığından biride peynirden elde edilen suşlar yakın özellik göstermektedir. E2 kümesini ise bir diğer İtalya suşu olan ve inek sütünden izole edilen G- 27 suşu tarafından oluşturulmaktadır. Bu suşun diğer İtalya suşları ile bağlantısı zayıftır (% 45). E3 kümesi ise Karadeniz'den izole edilen suşların %30'u (5/16), 1 Muğla ve birde İspanya izolatından oluşmaktadır. Bu grupta yer alan ve dar bir alandan izole edilen iy-şaf, 512-8 ve 225-1 suşları birbirleri ile benzer özellik göstermektedir. E4 kümesini 1 Muğla suşu ile 1 Karadeniz suşu teşkil etmektedir. E5 kümesi ise İzmir'den izole edilen 1 suş ile Karadeniz'den yakın çevreden izole edilen altı suştan oluşmaktadır. E6 kümesini tüm İspanya suşlarının %89'u (8/9), Japonya'dan izole edilen referans suş ATCC 49156 ve bir Karadeniz suşu oluşturmaktadır.

E7 kümesini birbirine yakın alanlardan izole edilen iki Karadeniz suşu oluşturmaktadır. Bu iki suş diğer kümelere dahil edilen Karadeniz suşlarının bazılarıyla benzerlik göstermektedir. E8 kümesi ise *Lactococcus lactis* izolatıdır. Türkiye'den izole edilen bu suş hiçbir *L. garvieae* izolatı ile yakınlık göstermemektedir.



Şekil 8. *Lactococcus* izolatların dendogramı

## 4. TARTIŞMA

### 4.1. Biyokimyasal Test Sonuçları

*Lactococcus* bir çok ülkede yüksek mortalite düzeyi ile seyretmiştir (Austin ve Austin, 1999). Bu nedenle Avrupa'nın birçok ülkesinden birçok araştırmacı bu hastalığın epidemiyoloji ile ilgili çok sayıda araştırmalar yapmışlardır. Ülkemizde yurt içi ve yurt dışından balıklardan izole edilen *L. garvieae* izolatları arasında epidemiyolojik ilişki bakımından yeterince araştırma yapılmamıştır. Bu nedenle hastalığın kaynağının ne olduğu, nereden ve nasıl yayıldığı ayrıca yakın zamanda balık yetiştiriciliğini bu alanda ne gibi tehlikelerin beklediği konusu muğlaktır.

Vela vd., (2000) *L. garvieae*'nin değişik ülkelerdeki değişik türlerden izole edilmiş 13 biyotipinden söz ederken, Eldar vd., (1999) 3 biyotipi olduğunu rapor etmiştir. Elimizdeki referans suş biyotip 1 olarak bilinmektedir (Eldar vd., 1999). Bu araştırmada tüm suşlar gram pozitif 2-8 arası kısa zincirler halinde oval koktan oluşan, kanlı agarda  $\alpha$  hemolitik bakteriler olarak belirlenmiştir.

Uygulanan 21 klasik testten (gram boyama, oksidaz, katalaz, oksidasyon/fermentasyon, hareket, sitrat, jelatin hidrolizi, hidrojen sülfür üretimi, indol üretimi, metil ret, Voges Proskar, glikoz, sakkaroz, laktoz ve nişasta asidifikasyonu, arjinin dihidrolaz, hemoliz, %4'lük NaCl de üreme) gibi testlerde suşlar arasında homojenite görülmüştür. Bu sonuçlar Kubilay vd. (2005), Çağırğan (2004) ve Eldar (1999)'un yaptıkları araştırmalar ile benzerlik göstermektedir. Bunların dışında 4°C'de üreyebilme özelliği sadece biyotip 1 olarak bilinen referans suş (ATCC 49156) da negatif iken diğer bütün suşlarda pozitif sonuç vermiştir. 45°C'de üreme özelliklerine bakıldığında Türkiye'den izole edilen suşlar ile referans suş benzer özellik gösterirken (+), dört adet (%10) İspanya ve Fransa izolatları (-) özellik göstermişlerdir. %4 lük NaCl de tüm izolatlar ürerken %6,5'luk NaCl de referans suş ile birlikte İspanya ve Fransa'dan izole edilen toplam 9 adet izolat (%22,5) zayıf yada hiç ürememişlerdir. Bu üreme özellikleri ile İspanya'dan elde edilen izolatlar yerli izolatlardan ayrılmaktadır. Murray, (1990) test ettiği *Lactococcus*'ların %56 sının %6,5 luk NaCl de üreyebildiği ayrıca bunlarında %25 inin 45°C'de üreyebildiğini belirtmiştir.

Bu iki özellik ayrıca *Lactococcus*'ları diğer 5 farklı gram (+) kok türlerinden ayıran özelliklerdir (Eldar vd., 1999). Üreme özelliklerine bakıldığında Türkiye'den izole edilen suşlarla biyotip 1 olarak kabul edilen referans suşun farklı olduğunu söyleyebiliriz. Laktozdan asit üretimi klasik olarak gerçekleştirilen biyokimyasal test sonuçlarına göre tüm suşlarda (+) iken API 20 Strep test sonuçlarına göre sadece dokuz adet izolat (%22) aynı sonucu vermiştir.

İzolatların hemen hepsi riboz, glikoz, sakkaroz ve trehaloz gibi karbonhidratlardan asit üretebilirken, az sayıda izolat (%14) mannitolden ve eskulinden (%30) üretememiştir (yerli izolatlar). İtalya, Fransa ve bazı yerli izolatlar biyotip 1 referans suşu ile karbonhidratların asidifikasyonunda benzer özellik göstermişlerdir. Tüm suşlar LAP (Lösin aminopeptidaz) ve klasik olarak gerçekleştirdiğimiz PYR (PYRrolidonyl Arylamidaz) pozitifdir. Eldar vd. (1999)'a göre, HIP (hippurik asit hidrolizi) ve  $\beta$  GAL ( $\beta$  galaktosidaz) çalıştıkları tüm suşlar negatif iken, bu çalışmadaki test sonuçları sırası ile %48 ve %88 oranında aynı çıkmıştır.  $\alpha$  GAL ( $\alpha$  galaktosidaz) ve  $\beta$  GUR ( $\beta$  glukuronidaz) sonuçlar eşdeğer (-) çıkmıştır. Sadece *Lactococcus lactis* olarak bildiğimiz suş  $\alpha$  GAL (+) sonuç vermiştir. Ayrıca *L. garvieae*'yi *L. lactis*'den ayırdığı bilinen ve hem API hemde kit yardımı ile klasik olarak gerçekleştirdiğimiz PYR testi aynı sonucu vermiştir. Tüm izolatlar inulin, rafinoz, amidon ve glikojen asidifikasyonu bakımından negatiftir. Bu sonuçlar Kubilay vd., (2005); Çağırğan, (2004); Eldar vd., (1999) nın yaptıkları araştırmalar ile aynı sonucu göstermektedir.

Klasik olarak gerçekleştirdiğimiz testlerde suşlar arasında görülen tam homojeniteden API 20 Strep'de söz edilememektedir. Genel olarak bakıldığında biyotip 1 olan ATCC 49156 Japonya suşunun API20Strep'e göre Türkiye'den elde edilen izolatlar ile birkaç istisna dışında ortak özellik gösterdiği, buna karşın İtalya, İspanya ve Fransa menşeli balık ve diğer hayvanlardan izole edilen izolatlar ile fazlaca farklı biyokimyasal özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Bakteri izolatları ile gerçekleştirilen fenotipik denemeler yalnız başına bakterinin karakteristik özelliklerini oransal olarak ifade eder. İzolatlar arası genetik çeşitliliğin belirlenmesi için fizyolojik denemeler tek başlarına yeterli olmayıp genetik çalışmalarla mutlaka desteklenmelidir (Eldar vd., 1999).



#### 4.2. ERIC-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tarih boyunca türlerin genetik yakınlıklarının araştırılması amacı ile pek çok metod denenmiştir. Bunlardan PZR bazlı olanları geniş yayılım göstermiştir. PZR reaksiyonları diğerlerine oranla kolay, güvenilirlikleri yüksek ve nispeten ucuzdur (Duan vd., 2009). Mikroorganizmaların ayırımının yapılmasında Pulse Field Gel Elektroforesis (PFGE) son yıllarda en güvenilir metot olarak bilinmesine rağmen RFLP en sık kullanılan metodlardan biridir. Ne var ki her iki teknikte geniş kalitede DNA, pahalı ekipmanlar, fazla zaman ve uğraş gerektirmektedir (Silveria vd., 2002). ERIC-PZR son yıllarda elde edilen sonuçlara bakıldığında rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi (RAPD-PZR) ve restriksiyon parçacık uzunluğu polimorfizmi (RFLP) gibi moleküler karakterizasyon tekniklerinin yerini almıştır (Silveria vd., 2002). ERIC-PCR bir RAPD-PZR olarak düşünülebilir (Versalovic vd., 1991). Geçmiş yıllarda RAPD-PZR ve RFLP gibi teknikler kullanılarak aynı bakterinin farklı suşları arasında yapılan genotiplendirmeler daha sonra ERIC-PZR ile test edildiğinde sonuçların daha ayırt edici ve genetik farklılık düzeyinin daha düşük olduğu görülmüştür (Maurer vd., 1998). ERIC-PZR metodu ile daha az zaman ve masrafla doğru sonuçlara ulaşılabilmektedir. Matsumoto vd, (2001) ERIC-PZR metodunun gram (-) bakteriler ile çalışıldığında çok kullanışlı olduğunu ve PFGE ile denk ayırd edici güce sahip olduğunu fakat gram (+) bakterilerde daha düşük duyarlılıkta olabileceğini belirtmiştir.

Bu çalışmada *L. garvieae* izolatlarının genotiplendirilmesi amacıyla ERIC-PZR metodu optimize edilerek kullanılmıştır. Beş farklı ülkeden ve farklı kaynaklardan izole edilen 40 adet patojenik *Lactococcus* izolatu analiz edilmiştir. Bu çalışmada benzerlik oranı düşük bulunan *L. garvieae* suşları 8 kümede toplanmıştır. Bu da suşlar arasında önemli taksonomik heterojenitenin olduğunu göstermektedir (şekil 7). İzolatlar arası benzerlik oranlarının düşük olması bu izolatların çoğunun birbirine uzak alanlardan elde edilmesi ve bakteri suşlarının mutasyon ve benzeri bazı olaylar sonucu genetik yapılarında değişiklik olabileceğini akla getirebilir. Bu tarz genetik kökenli olaylar antibiyotik kullanımını sınırlandırarak bakteri ile mücadeleyi güçleştirmekte, dolayısı ile etkenin yayılmasına engel olunamamaktadır.

Biri hariç tüm İspanya izolatları aynı küme içerisinde (E6) gruplandırılmıştır. Bu kümenin diğerlerinden önemli şekilde ayrılması bakterilerin aynı orijinli olmaları şeklinde yorumlanabilir. Karadeniz Bölgesi'nden dar bir alandan izole edilen suşların çoğunluğu 2 grup (E3, E5) içerisinde yer almıştır. Ayrıca Karadeniz izolatlarının yer aldığı gruplarda

birer ikişer Muğla ve İzmir izolatları yer almaktadır. Bu sonuçlar özellikle Karadeniz Bölgesinde balık hareketlerinin bilinçsiz yapıldığı bölgede dar alanda balık ve yavru alışverişinin sıklıkla yapıldığı ayrıca yılın belli dönemlerinde İzmir, Muğla ve çevresindeki büyük çaplı kuluçkahanelerden bölgedeki işletmelere yavru balık ve yumurta transferi yapıldığı gerçeğini akla getirmektedir. *L. garvieae* bakterisinin ilk olarak Ege Bölgesi'nde çıktıktan bir süre sonra Karadeniz Bölgesi'ndeki işletmelerde görülmesi bu hastalığın yukarıda açıklandığı gibi horizontal olarak bulaştığını akla getirmektedir. Mevcut 1 Fransa suşu, İtalya suşları ve 2 adet Muğla suşlarının aynı küme (E1) içerisinde yer alması benzer durum olarak düşünülebilir.

Filogenetik ağaç analiz edildiğinde tüm *L. garvieae* suşları ile *L. lactis* arasında klasik biyokimyasal testler ve API 20 Strepte görülmeyen yüksek heterojenite görülmektedir. Bu sonuç ERIC-PZR metodunun yüksek ayırt etme gücünü ve biyotiplendirmenin mutlaka genetik bir metot ile desteklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Klasik biyokimyasal test ve API 20 Strep sonuçlarını ERIC-PZR ile karşılaştırdığımızda birkaç istisna hariç sonuçların benzer olduğu görülmektedir. Her iki analizde de aynı ülkeden yada yakın lokalizasyonlardan izole edilen suşlar benzer özellikler göstermekte bu gruplar arasına tek tük diğer ülke yada bölge izolatları dahil olmaktadır.

ERIC-PZR tekniği gram (-) ve gram (+) bakterilerin tiplendirilmesinde geniş bir biçimde kullanılmaktadır (Niemann vd., 1999). ERIC-PZR ülkemizdeki *Lactococcus* ve diğer bakterilere ait salgınlarının araştırılmasında ve kontrol altına alınmasında kullanılabilir ve *L. garvieae* izolatları arasındaki genetik farklılıkların bilinmesi salgınlarda aşılama için suşların seçimi konusunda yardımcı olabilir.

### 4.3. Antibiyotik Dirençleri

Balık yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalıkları kontrol altına alabilmek için iyi yönetim, uygun çevre koşulları ve koruyucu önlemlerin yanı sıra gerektiğinde antimikrobiyal bileşenlerinde kullanılması gereklidir. Akuakültürde ilaçların bilinçsiz kullanımı sucul bakterilerde antibakteriyel direnci arttırmaktadır. Bazen ilaç dirençleri plazmit kökenli olup diğer jenerasyonlara rahatça nakledilebilir. 2001 yılında hastalığın ülkemizde görülmesinin (Diler vd., 2002) ardından hızla diğer bölgelere yayılması ve önemli ekonomik kayıplara yol açması hastalıkla etkin mücadele edilmesini ve

kemoterapotiklere başvurulmasını şart kılmıştır. Yapılan bu çalışmada etkenin birçok antibiyotiğe duyarlı olması hastalığın antibiyotiklerle tedavisinin mümkün olduğunu göstermektedir. Ancak gelişigüzel antibiyotik kullanımına bağlı olarak direnç gelişimi, canlı dokusunda kalıntı oluşması ve tedavi masraflarının yüksekliği gibi nedenlerden ötürü duyarlı antibiyotiğin seçilmesi konusu önem kazanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan izolatların oksitetrasiklin, amoksisilin, tetrasiklin, florfenikol, penisilin, enrofloksasin ve eritromisine karşı duyarlı oldukları gentamisin ve sulfametoksazol+trimetoprim gibi antibiyotiklere karşı ise dirençli oldukları saptanmıştır. Referans olarak kullanılan ATCC 49156 (Japonya) suşu genel sonuçla benzerlik göstermektedir. Çalışılan suşların tamamına yakınında sulfametoksazol+trimetoprim bileşiğine karşı hiç zon alanının oluşmaması ilerde bu bileşik kullanılarak *L. garvieae* için selektif besi yeri oluşturma çalışmalarında kullanılabilir.

Austin vd., (1999) eritromisinin 25 mg/kg balık oranında ve 7 gün süre ile sarıkuyruklarda streptococcosis tedavisinde kullanıldığında oksitetrasiklin ve ampisilinden daha etkili olduğunu bildirmiştir. Oysa bu çalışmada oksitetrasiklin ve ampisilin eritromisine göre daha etkili bulunmuştur.

Türkiye’de yapılan başka bir çalışmada *L. garvieae* suşlarının amoksisilin+klavulanik asit, enrofloksasin, tetrasiklin, doksasiklin, kloramfenikol, eritromisin ve nitrofrantoin gibi antibiyotiklere karşı duyarlı olduklarını, kanamisin penisilin, sefuroksim, siprofloksasin, klindamisin, trimetoprim+sulfametoksazol gibi antibiyotiklere karşı dirençli oldukları bulunmuştur (Kubilay vd., 2005).

Genel bir bilgi olarak eritromisin ve türevi antibiyotiklerin gram (+) bakterilere karşı en etkili bileşikler olduğu bilinmesine rağmen bu çalışmada suşların %12 sinin dirençli bulunması bu bileşiğin bu alanlarda yaygın olarak kullanıldığını akla getirebilir.

Mazzolini vd., (2003) Kuzey İtalya’da klinik izolatlarından yaptıkları çalışmada *L. garvieae* suşlarının ampisilin, amoksisilin, oksitetrasiklin ve eritromisine karşı duyarlı oksolinik asit, streptomisin, trimetoprim ve sulfadiazine karşı dirençli olduğunu saptamıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular da bunu doğrular niteliktedir.

Bu ilaçların bazılarının in vitro şartlarda *L. garvieae* ye karşı etkili olmalarına rağmen, gerek balıkta ani gelişen iştahsızlık gerekse dirençli suşların oluşmasından dolayı in vivo şartlarda etkisiz oldukları gözlenmiştir (Bercovier vd., 1997).

Ravelo vd., (2001)’ e göre farklı coğrafik orijinli *L. garvieae* suşları ile yapılan çalışmalarda suşların tümünün enrofloksasin ve nitrofurantoin duyarlı olduğu, oksolinic

asit ve sulfametoksazol-trimetoprim ise direçli olduğu gözlemlenirken eritromisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin ve ampisiline karşı ise sonuçların orijine göre değişken olduğu görülmüştür. Bu çalışmada da benzer sonuçlara ulaşılması yani bakterinin aynı antibiyotiğe karşı farklı direnç seviyelerinin belirlenmesi suşların bölgesel farklılığı olarak izah edilebilir.

Çalışmada her bölgedeki izolatların florfenikole karşı duyarlı olduğu görülmektedir. Buda Avrupa Birlięi İlaç Düzenleme Konseyi tarafından kullanımı serbest kılınan bu antibiyotiğin akuakültürde kullanıma yeni başlanmasından kaynaklanmaktadır. Karadeniz bölgesinden izole edilen *L. garvieae* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları konusunda etkin çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma son zamanlarda sıkça karşımıza çıkan *Lactococcus* enfeksiyonlarında üreticilerin bilinçli antibiyotik kullanımı konusunda uyarılması açısından önemli sayılabilir.

## 5. SONUÇLAR

*Lactococcus garvieae*'nin genotiplendirilmesi amacı ile İspanya, İtalya, Fransa, Japonya ve Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan *L. garvieae* izolatlarının yanı sıra beş farklı alandan 2009 ve 2010 yaz aylarında örnekleme yapılmıştır.

Örnekleme esnasında işletmelerin birçoğunun balık sağlığı açısından yeterince bilgi sahibi olmadıkları, hastalık yönetimi ve ilaç kullanımı konusunda bilinçsiz davrandıkları görülmüştür. Bazılarında su kriterlerinin mevsime bağlı değişim göstermesi ve özellikle de balık hareketlerinin gelişi güzel yapılması sık rastlanılan aksaklıklar arasındadır. İşletmelerin bir kısmı yıllık balık ihtiyaçlarını kuluçkadan porsiyonluk boya kadar kendileri karşılarken, büyük kısım işletmeler artan balık ihtiyaçlarını yavru ya da yumurta şeklinde bölge içinden ya da diğer bölgelerdeki büyük çaplı işletmelerden karşılamaktadır. Hatta bazı işletmeler bu ihtiyaçlarını yurt dışından karşılayabilmektedir. Çoğunlukla kontrolsüz gerçekleştirilen bu balık hareketleri balık patojenlerinin yayılmasına ve beraberinde birçok problemin de doğmasına neden olmaktadır.

Zoonoz, oksidaz katalaz (-) ve gram (+) kok özellikleri taşıyan *L. garvieae* bakterisi örnekleme yapılan alanların üçünden izole edilmiştir. Türkiye'den ve diğer ülkelerden farklı kaynaklardan geçmiş yıllarda izole edilen 38 suş çalışmaya katılarak toplam 41 suş ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Tüm suşlara teyit amacıyla spesifik primerler kullanılarak PZR yapılmıştır. *L. garvieae* oldukları bilinen 41 suşa klasik biyokimyasal testler ve Api 20 Strep testi uygulanarak suşlar arası genetik benzerlikler/ farklılıklar biyokimyasal olarak ortaya koyulmuştur. Yapılan örnekleme çalışmalarında *L. garvieae* dışında toplam 7 farklı balık patojeni daha isimlendirilmiştir. Bunlar arasında tatlı sularda en sık rastlanılan *Yersinia ruckeri* iken denizlerde *Vibrio* türleridir.

Klasik testlerde suşlar arasında homojenite mevcuttur. API 20 Strep'de bundan tam olarak söz edilememektedir. Genel olarak bakıldığında biyotip 1 olan ATCC 49156 Japonya suşu klasik biyokimyasal testler ve API 20 Strep'e göre Türkiye'den elde edilen izolatlar ile birkaç istisna dışında ortak özellik göstermiştir. Buna karşın İtalya, İspanya ve Fransa menşeli balık ve diğer hayvanlardan izole edilen izolatlar ile fazlaca farklı biyokimyasal özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

ERIC-PZR metoduna göre benzerlik oranı düşük bulunan *L. garvieae* suşları 8 küme içerisinde gruplandırılmıştır.

API 20 Strep ile ERIC-PZR sonuçları karşılaştırıldığında birkaç istisna hariç sonuçların benzer olduğu görülmüştür. Her iki analizde de aynı ülkeden yada yakın coğrafik alanlardan izole edilen suşlar benzer özellikler gösterdiği bu gruplar arasına tek tük diğer ülke yada bölge izolatlarının dahil olduğu görülmüştür.

*Lactococcus garvieae* izolatlarının tümüne antimikrobiyal hassasiyetlerini belirlemek ve suşlar arasındaki antibiyotik direnç farklılıklarını tespit etmek amacıyla çeşitli antibiyotikler ile disk difüzyon testi uygulanmıştır. Bunun sonucunda antibiyogram testi uygulanan suşların genel olarak; oksitetrasiklin, amoksisilin, tetrasiklin ve florfenikol gibi antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları, gentamisin ve sulfametoksazol+trimethoprim gibi antibiyotiklere karşı ise dirençli oldukları saptanmıştır. Bunun yanı sıra aynı bakterilerin siprofloksasin, penisilin, enrofloksasin, ve eritromisin antibiyotiğine karşı değişen derecelerde direnç gösterdiği saptanmıştır.

## 6. ÖNERİLER

Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliği sektörü hızla gelişmektedir. Son yıllarda dereler üzerine kurulan işletmeler ve denizlerde gerçekleştirilen kafes balıkçılığının yanı sıra baraj gölleri üzerine de kafesler kurulmaya başlanmıştır. Gerçekleştirilen bu yoğun yetiştiricilik faaliyetleri beraberinde birtakım sorunları da getirmiştir. Balık hastalıkları, üretimi sınırlandıran ve ekonomik anlamda darbe vuran önemli sorunlardan biridir.

2001 yılında ülkemizde ilk defa Ege Bölgesi'nde görülen, ardından hızla diğer bölgelere yayılan ve son yıllarda Karadeniz Bölgesi'nde yoğun bir şekilde karşılaşılan *Lactococcus* etmeni *L. garvieae*'nin doğru teşhis ve tedavi edilmesi ve yayılımının bilinmesine yönelik bu çalışma önemli sonuçlar ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar temelinde su ürünleri sektöründeki bilinçli üreticilere, konu ile ilgilenecek araştırmacılara ve sektörle ilgili yasal düzenlemelere katkı sağlayabilecek öneriler şöyle sıralanabilir;

1. Su ürünleri yetiştiriciliği yapacak bir işletme öncelikle kaynaklarının yeterliliğini ve alt yapısını çok iyi gözden geçirmelidir. Üretim ve Pazar ilişkisini göz önüne alarak tesis kapasitesi ve su kaynakları yönünden kendi kendine yeter olmalıdır.
2. Yetiştiriciler, üretimdeki en önemli maddi kayıp nedenlerinden biri olan balık hastalıkları konusunda bilinçli olmalı, bünyesinde ya da yakınında ki uzmanlar ile iletişim halinde olmalıdır.
3. Bu çalışmada biyokimyasal ve moleküler metotlar kullanılarak *L. garvieae*'nin genetik çeşitliliği ve yayılımı konusunda bilgi verilmiştir. Üretim aşamasında sıklıkla karşılaşılan diğer balık patojenleri içinde benzer çalışmalar yapılmalı ve korunma stratejileri belirlenmelidir.
4. Balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen direnç ileride bakteriyel hastalıkların tedavisinde zorluklar yaşanacağını göstermektedir. Hastalıklarla mücadelede etken isimlendirilmeli, antibiyogram yapılmalı, uygun pozoloji ve uygulama şekli belirlenmeli ve üreticiler ile paylaşılmalıdır.
5. Çalışmadaki bazı antibiyotikler tüm suşlara tam direnç göstermesinden yola çıkarak ileride *L. garvieae*'nin teşhisine olanak sağlayacak spesifik besi yeri üretimi düşünülmelidir.

6. Alt tipleri belirlenen *L. garvieae* izolatları ile ileride patojenite çalışmaları yapılmalı uygun izolat belirlenerek koruyucu aşı denemeleri yapılmalıdır.
7. *Lactococcus garvieae* ve benzeri hastalık etmenlerinin yayılmasında en önemli etken olan balık hareketlerinin mümkünse Tarım Bakanlığı ya da üniversiteler kontrolünde olmalı. Büyük çapta üretim yapan işletmeler sertifikalandırılmalı ve diğer üreticiler hastalıktan ari sertifikalı yavru ve yumurta alımı konusunda bilgilendirilmelidir.
8. İhbarı zorunlu hayvan hastalıklarında uygulanan karantina tedbirlerine benzer tedbirler mortalitesi yüksek diğer balık hastalıklarında da uygulanmalıdır.



## 6. KAYNAKLAR

- Afonso, A., Silva, J. ve Gomes, S., 2003. *Lactococcus garvieae* Trout Infections in Portugal: A New Challenge on Fish Vaccinology. IBMC News, February, 4–6.
- Aguirre, M. ve Collins, MD., 1993. Lactic Acid Bacteria and Human Clinical Infection. J. Appl. Bacteriol., 75, 95–107.
- Aizpurua, J. ve Esnault, F., 1999. Revista de Acuicultura Trouvit Informa. Invierno, 21–3.
- Altinok, I., Grizzle, J.M. ve Liu, Z., 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in Rainbow Trout Blood by Use of Polymerase Chain Reaction, Dis. Aquat. Org., 44, 29-34.
- Altinok, I. ve Kurt, I., 2003. Molecular Diagnosis of Fish Diseases: A Review. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 3, 131-138.
- Altinok, I., 2011. Multiplex PCR Assay for Detection of Four Major Bacterial Pathogens Causing Rainbow Trout Disease. Dis. Aquat. Org., 93, 199–206.
- Antolin, A., Ciguñenza, R., Saluena, I., Vazquez, E., Hernandez, J. ve Espino, D., 2004. Liver Abscess Caused by *Lactococcus lactis* cremoris: A New Pathogen. Scand. J. Infect. Dis., 36, 6–7,490–1.
- Arda, M., 1997. Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayın, 25 Ankara, 490 s.
- Austin, B. ve Austin, DA., 1999. Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish, Third Edition, Chichester, UK: Springer-Praxis.
- Austin, B. ve Austin, D.A., 1999. Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish, Third (Revised) Edition, Praxis Publishing Chichester, U.K., 457 s.
- Austin, B. ve Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish, Fourth Edition, Springer Publishing, New York.
- Baek, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K. ve Park, S.C., 2006. Isolation and Characterization of *Streptococcus* sp. From Diseased Flounder (*Paralichthys olivaceous*) in Jeju Island. J. Vet. Sci., 7, 53–58.
- Barakat, R.K., Griffiths, M.W. ve Haris, L.J., 2000. Isolation and Characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from Cooked, Modified Atmosphere, Packaged, Refrigerated, Poultry Meat. Int. J. Food Microbiol., 62, 83–94.
- Bark, S. ve Mc Gregor, D., 2001. The First Occurrence of Lactococcosis in Farmed Trout in England. Trout News, 31, 9–11.

- Barnes, A.C., Guyot, C., Hansen, B.G., Mackenzie, K., Horne, M.T. ve Ellis, A.E., 2002. Resistance to Serum Killing may Contribute to Differences in The Abilities of Capsulate and Non-Capsulated Isolates of *Lactococcus garvieae* to Cause Disease in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shell Immunol., 12, 155–168.
- Barnes, A.C. ve Ellis, A.E. 2004. Role of Capsule in Serotypic Differences and Complement Fixation by *Lactococcus garvieae*. Fish Shell Immunol., 16, 207–214.
- Bercovier, H., Ghittino, C. ve Eldar, A., 1997. Immunization with Bacterial Antigens: Infection with *Streptococci* and Related Organisms. Dev. Biol. Stand., 90, 153–160.
- Brunt, J. ve Austin, B., 2005. Use of a Probiotic to Control Lactococcosis and *Streptococcosis* in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis., 28, 693–701.
- Cagirgan, H., 2004. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 21, 3-4, 267-269.
- Carson, J., Gudkovs, N. ve Austin, B., 1993. Characteristics of an *Enterococcus*-like Bacterium from Australia and South Africa, Pathogenic for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). J. Fish Dis., 6, 381–388.
- Carvalho, M.G., Vianni, M.C., Eliot, J.A., Reeves, M., Facklam, R.R. ve Teixeira, L.M., 1997. Molecular Analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* Isolated from Water Buffalos with Subclinical Mastitis. Adv. Exp. Med. Biol., 418, 401–404.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N. ve Caskey, C.T., 1988. Deletion Screening of The Duchenne Muscular Dystrophy Locus via Multiplex DNA Amplification, Nucleic Acids Res., 16, 11141- 11156.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N. ve Caskey, C.T., 1989. Multiplex PCR for The Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy, in Gelfand, D.H., Innis, M.A., Shinsky, J.J. ve White, T.J., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Pres, San Diego, California, 272-281.
- Chang, P.H., Lin, C.W. ve Lee, Y.C., 2002. *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.
- Chen, S.C., Lin, Y.D., Liaw, L.L. ve Wang, P.C., 2001. *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.
- Chen, S.C., Liaw, L.L., Su, H.Y., Ko, S.C., Wu, C.Y. ve Chaung, H.C., 2002. *Lactococcus garvieae*, a Cause of Disease in Grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. J. Fish Dis., 25, 727–732.

- Cheng, W. ve Chen, J.C., 1999. 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.
- Cheng, W., Liu, C.H. ve Chen, J.C., 2002. Effect of Nitrite on Interaction Between The Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its Pathogen *Lactococcus garvieae*. Dis. Aquat. Org., 50, 189–197.
- Chu, G., Vollrath, D. ve Davis, R.W., 1986. Separation of Large DNA Molecules by Contour Clamped Homogeneous Electric Field. Science, 234, 1582
- Colorni, A., Ravelo, C., Romalde, J.L. ve Toranzo, A.E., 2003. Diamant a *Lactococcus garvieae* in Wild Red Sea Wrasse *Coris aygula* (Labridae). Dis. Aquat. Org., 56, 275–278.
- De Kinkelin, P., Michel, C.H. ve Ghittino, P., 1991. Tratado de Las Enfermedades de Los Peces, Editorial Acribia, Zaragoza.
- Devriese, L.A., Hommez, J., Laevens, H., Banadme, P. ve Haesebrouck, F., 1999. Identification of Aesculinhydrolyzing *Streptococci* and *Enterococci* from Subclinical Intramammary Infections in Dairy Cows. Vet. Microbiol., 70, 87–94.
- Diler, O., Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A. ve Işıklı, B., 2002., First Occurrence of *Streptococcosis* Affecting Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 22, 21–25.
- Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., Yao, M. ve Schlenker, G., 2009. Source Identification of Airborne *Escherichia coli* of Swine House Surroundings Using ERIC-PCR and REP-PCR. Environmental Research, 109, 511–517.
- Eldar, A., Shapiro, O., Bejerano, Y. ve Bercovier, H., 1995. Vaccination with Whole-cell Vaccine and Bacterial Protein Extract Protects Tilapia against *Streptococcus Difficile* Meningoencephalitis. Vaccine, 13, 867–870.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bvozzetz, E. ve Gorla, M., 1996. *Enterococcus seriolicida* is a Junior Synonym of *L. garvieae*, a Causative Agent of Septicemia and Meningoencephalitis in Fish. Curr. Microbiol., 32, 85–88.
- Eldar, A., Horovitz, A. ve Bercovier, H., 1997. Development and Efficacy of a Vaccine against *Streptococcus iniae* Infection in Farmed Rainbow Trout. Vet. Immunol. Immunopathol., 56, 175–83.
- Eldar, A. ve Ghittino, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Similar but Different Diseases. Dis. Aquat. Org., 36, 227–231.

- Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C. ve Zlotkin, A., 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Fish in Europe, Asia, and Australia. Applied and Environmental Microbiology, 1005–1008.
- Eliot, J.A., Collins, M.D., Pigott, N.E. ve Facklam, R.R., 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from Humans by Comparison of Whole-cell Protein Patterns. J. Clin. Microbiol., 20, 2731–2734.
- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D.G. ve Chilmonczyk, S., 2004. Clonality and Diversity of the Fish Pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean Countries. Appl. Environ. Microbiol., 70, 5132–5137.
- Foschino, R., Nucera, D., Volponi, G., Picozzi, C., Ortoffi, M. ve Bottero, M.T., 2008. Comparison of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated in Northern Italy from Dairy Products and Fishes Through Molecular Typing. Journal of Applied Microbiology, ISSN 1364-5072.
- Fukuda, Y., Maita, M., Satoh, K., Yamamoto, H., Okamoto, N. ve Ikeda, Y., 1997. Effects of Dissolved Oxygen Concentration on Experimental Horizontal Transmission of Induced by Artificial Infection with *Enterococcus seriolicida* in Yellowtail. Fish Pathol., 32, 43–49.
- Fukuda, Y., Maita, M., Satoh, K. ve Okamoto, N., 1997. Influence of Dissolved Oxygen Concentration on The Mortality of Yellowtail Experimentally Infected with *Enterococcus seriolicida*. Fish Pathol., 32, 129–130.
- Ghittino, C. ve Muzquiz, J.L., 1998. La *Streptococcosis* de la Trucha Arco Iris en Espana. Reunion de Piscicultores. Zaragoza. Rev. Aquatic., 2.
- Ghittino, C., 1999. La *Streptococcosis* en Los Peces. Rev. Aquatic., 6.
- Grutcka, P., Van Belkum, A., Schouls, L.M., Hendrix, W.D.H., Reubsat F.G.H., Dokter, J., Boxma, H. ve Verbrugh, H.A., 1996. Outbreak of Group A *Streptococci* in Aburn Center. Use of Pheno and Genotypic Produces for Strain Tracking. J. Clin. Micro., 34, 114-118.
- Harisha, S., Biotechnology Procedures and Experiments Handbook. ISBN: 978-1-934015-11-17.
- Hurvitz, A., Bercovier, H. ve Van Rijn, J., 1997. Effect of Ammonia on The Survival and The Immune Response of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Vaccinated against *Streptococcus iniae*. Fish Shellfish Immunol., 7, 45–53.
- Kang, S., Shin, G., Shin, Y., Palaksha, K.J., Kim, Y. ve Yang, H., 2004. Experimental Evaluation of Pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in Black Rockfish (*Sebastes schlegeli*). J. Vet. Sci., 5,4, 387–390.
- Katao, H., 1982. Erythromycin: The Application to *Streptococcal* Infections in Yellowtails. Fish Pathol., 17, 77–82.

- Kawahara, E. ve Kusuda, R., 1987. Direct Fluorescent Antibody Technique for Diagnosis of Bacterial Diseases in Eel. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 395–399.
- Kaufmann, M., 1998. Molecular Bacteriology Protocols and Clinical Applications, N. Woodford and A.P. Johnson, Ed., Humana Press Inc., Totowa, N.J., Methods in Molecular Medicine, 15, 88-91.
- Kav, K. ve Erganiş, O., 2007. Konya Bölgesinde Bulunan Gökkuşığı Alabalığı (*Onchyrnus mykiss*) Çiftliklerinden *L. garvieae* İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi. Vet. Bil. Derg., 23,3, 7-17.
- Kawanishi, A., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M. ve Takahashi, T., 2005. 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.
- Kitao, T., Aoki, T. ve Iwata, K., 1979. 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.
- Kitao, T. 1982. The Methods for Detection of *Streptococcus sp.* Causative Bacteria of *Streptococcal* Disease of Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Fish Pathol., 17, 17–26.
- Kitao, T., 1983. Strain Variation Associated with Pathogenesis of *Streptococcus* in Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). In: Proceedings of the second North Pacific Aquaculture Symposium. Tokyo: Tokai University., 231–242.
- Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G.ve Diler, Ö., 2005. *Lactococcus garvieae* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1,1, 39-48.
- Kusuda, K. ve Hamaguchi, M., 1989. Determination of The Median Lethal Dose of Cell-Associated Toxins from *Streptococcus sp.* in The Yellowtail. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 9, 117–128.
- Kusuda, K., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. ve Fryer, J.L., 1991. *Enterococcus seriolicida sp. nov.*, a Fish Pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 406–409.
- Lee, D.C., Lee, J.I., Park, C.I. ve Park, S.I., 2001. The Study on The Causal Agent of *Streptococcosis* (*Lactococcus garvieae*), Isolated from Cultured Marine Fish. J. Fish Pathol., 14, 71–80.
- Lilley, J.H., Cerenius, L. ve Soderhall, K., 1997. RAPD Evidence for The Origin of Crayfish Plague Outbreaks in Britain. Aquaculture, 157, 181-185.
- Macedo, N.R., Oliveira, S.R., Lage, A.P., Santos, J.L., Araujo, M.R. ve Guedes, R.M.C., 2010. ERIC-PCR Genotyping of *Haemophilus parasuis* Isolates from Brazilian Pigs. The Veterinary Journal, 10, 1016-1022.

- Mata, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M., Dominguez, L. ve Fernandez-Garaizabal, J.F., 2004. Multiplex PCR Assay for Detection of Bacterial Pathogens Associated with Warm-Water Streptococcosis in Fish. Appl. Environ. Microbiol., 70, 3183–3187.
- Matsumoto, M., Suzuki, Y., Miyazaki, Y., Tanaka, D., Yasuoka, T., Mashiko, K., Ihikita, R. ve Baba, J., 2001. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-based PCR its Ability to Differentiate *Streptococcus pyogenes* Strains and Applicability to The Study of Outbreaks of *Streptococcal* Infection. Tohoku J. Exp. Med., 194, 205-212.
- Mazzolini, E., Vismara, D., Ceschia, G., Malvisi, J., Fabris, A., Passera, A., Danielis, L. ve Giorgetti, G., 2003. In vitro Activity of Several Chemiantibiotics against Clinical Isolates of Fresh and Marine Fish Pathogens. Appl. Environ. Microbiol., 77, 2185-2114.
- McPhearson, R.M., DePaola, A., Zywno, S.R., Motes, M.L. ve Guarino, A.M., 1991. Antibiotic Resistance in Gram-negative Bacteria from Cultured Catfish and Aquaculture Ponds. Aquaculture, 99, 203-211.
- Murray, B.B., 1990. The Life and Times of The *Enterococcus*. Clin. Microbiol., 3, 46–65.
- Murray, B.E., Singh, K.V., Heath, J.D., Sharma, B.R. ve Weinstock, G.M., 1990. Comparison of Genomic DNAs of Different *Enterococcal* Isolates Using Restriction Endonucleases with Infrequent Recognition Sites. J. Clin. Microbiol., 9, 2059-2063.
- Muzquiz, J.L., Royo, F.M., Ortega, C., de Blas, I., Ruiz, I. ve Alonso, J.L., 1999. Pathogenicity of Streptococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Dependence of Age of Diseased Fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 19, 114–119.
- Munday, B.L., 1994. 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.
- Maurer, J.J., Lee, M.D., Lobsinger, C., Brown, T., Maier, M., Thayer, S.G., 1998. Molecular Typing of Avian *Escherichia coli* Strains Isolated by Random Amplification of Polymorphic DNA. Avian Dis., 42, 431–451.
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K.H., Matsuoka, S., Mori, K. ve Nishioka, T., 1999. Protective Effects of Bacteriophage on Experimental *Lactococcus garvieae* Infection in Yellowtail. Dis. Aquat. Org., 37, 33–41.
- NCCLS. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, Second Edition, NCCLS document M31-A2 (ISBN 1-56238-461-9). NCCLS, Pennsylvania, USA.

- Niemann, S., Dammann, T., Anja Nagel, K., Pühler, A. ve Selbitschka, W., 1999. Genetic Basis of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR Fingerprint Pattern in *Sinorhizobium meliloti* and Identification of *S. meliloti* Employing PCR Primers Derived from an ERIC-PCR Fragment Arch. Microbiol., 172, 22–30.
- Palacios, M.A., Zamora, M.J., Vasquez, J., Zamora, E. ve Duran, A., 1993. Streptococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. Bull. Soc. It Patol Ittica., 13, 11–16.
- Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A.E. ve Romalde, J.L., 2004. *Lactococcus garvieae*, an Emerging Pathogen for The Portuguese Trout Culture. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 24, 274–279.
- Prieta, J., Domenech, A.M., Fernandez-Garaizabal, J.F., Collins, M.D., Rodrigues, U.M. ve Jones, D., 1993. Lactococcosis De la Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*). Med. Vet., 10, 367–373.
- Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P. ve Comi, G., 2005. Culture-dependent and Independent Methods to Investigate The Microbial Ecology of Italian Fermented Sausages. Appl. Environ. Microbiol., 71, 1977–1986.
- Ravelo, C., Magarinos, B., Romalde, J.L. ve Toranzo, A.E., 2001. Convencional versus Miniaturized Systems for The Phenotypic Characterization of *Lactococcus garvieae* Strains. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 21, 136–144.
- Ravelo, C., Magarinos, B., Lopez-Romalde, S., Toranzo, A.E. ve Romalde, J.L., 2003. Molecular Fingerprints of Fish-Pathogenic *Lactococcus garvieae* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. J. Clin. Microbiol., 41, 751–756.
- Ravelo, C., Magarinos, B., Herrero, M.C., Costa, L., Toranzo, A.E. ve Romalde, J.L., 2005. Use of Adjuvanted Vaccines to Lengthen The Protection against Lactococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 251, 153–8.
- Robinson, J.A. ve Meyer, F.P., 1996. Streptococcal Fish Pathogen. J. Bacteriol., 92, 512 s.
- Romalde, J.L., 2004. Present and Future of Aquaculture Vaccines against Fish Bacterial Diseases. In: Seminario Internacional Enfermedades Emergentes En la Acuicultura. Chile: Puerto Varas.
- Schwartz, D.C. ve Cantor, C.R., 1984. Separation of Yeast Chromosome-sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis Cell., 37, 67-75.
- Silveria, W., Ferreira, A., Lancellotti, M., Barbosa, I., Leite, D., Castro, A. ve Brocchi, M., 2002. Clonal Relationships Among Avian *Escherichia coli* Isolates Determined by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR. Veterinary Microbiology, 89, 323–328.

- Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, P., Riaza, A., Nunez, S. ve Barja, J.L., 1994. Streptococcosis in Cultured Turbot Caused by an *Enterococcus*-like Bacterium. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14, 19–23.
- Toranzo, A.E., Magarifios, B. ve Romalde, J.L., 2005. A Review of The Main Bacterial Fish Diseases in Mariculture System, Aquaculture, 246, 37-61.
- URL-1. [www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Starch\\_Agar.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/Starch_Agar.pdf). Erişim tarihi: 18.04.2010.
- Valsangiacomo, C., Baggi, F., Gaia, V., Balmelli, T., Peduzzi, R. ve Piffaretti, J., 1995. Use of Amplified Fragment Length Polymorphism in Molecular Typing of *Legionella pneumophila* and Application to Epidemiological Studies. J. Clin. Microbiol., 33, 1716-1719.
- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A. ve Liebana, P., 2000. Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from Lactococcosis Outbreaks in Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. J. Clin. Microbiol., 38, 3791–3795.
- Vendrell, D., Balcazar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Girones, O. ve Muzquiz, J.L., 2004. Evaluation in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) of Ichtiovac-Lg, a Vaccine against *Lactococcus garvieae*. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Fish Immunology.
- Vendrell, D., Balcazar, J.L., Zarzuela, I.R., Blas, I., Girones, O. ve Muzquiz, J.L., 2006. Laboratory of Fish Pathology, Department of Animal Pathology, University of Zaragoza, C/. Miguel Servet 50013, 177 s.
- Versalovic, J., Koeth, T. ve Lupski, J.R., 1991. Distribution of Repetitive DNA Sequences in Eubacteria and Application to Fingerprinting of Bacterial Genomes. Nucleic Acid Res., 19, 6823–6831.
- Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. ve Moschetti, G., 2001. 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.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. ve Zabeau, M., 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acids Res., 23, 4407-4414.
- Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J.T. ve Nicholson, B.L., 1999. Multiplex Reverse Transcriptase PCR Assay for Simultaneous Detection of Three Fish Viruses. J. Clin. Microbiol., 37, 4139–4141.
- Yağcı, A., 2004. Restriction Fragment Length Polymorphism ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tipleme Yöntemleri.



- Yasunaga, N., 1982. Occurrence of *Streptococcus sp.*, A Pathogen of Cultured Yellowtail, in Muscle of Sardine for Diets. Fish Pathol., 17, 195–198.
- Yingwang, Y., Qingping, W., Yanhong, Z., Xiaohui, D. ve Jumei, Z., 2008. Analysis of Major Band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and Development of A Species-specific PCR for Detection of *Ent. sakazakii* in Dry Food Samples. Journal of Microbiological Methods, 75, 392-397.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. ve Bercovier, H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J. Clin. Microbiol., 36, 983–985.

## ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimimi aynı ilde tamamladı. 1994 yılında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne kayıt oldu. 5 yıllık eğitimin ardından 1999 yılında İstanbul Üniversitesinden Veteriner Hekim olarak mezun oldu. 2000 yılı içerisinde askerlik hizmetimi tamamladı. 2001 ile 2006 yılları arasında özel sektörde çalıştı.

2006 yılında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı bünyesindeki Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğüne bağlı Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsünde göreve başladı. 2008-2009 eğitim-öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.

Halen Enstitü'de Su Ürünleri Sağlığı Bölümü'nde araştırmacı Veteriner Hekim olarak görev yapmaktadır.