

***LACTOCOCCUS GARVIÆAE*'nin FARKLI  
BALIK TÜRLERİNDE PATOJENİTESİNİN  
BELİRLENMESİ VE ANTİBİYOTİK  
DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Mustafa TÜRE**

**Doktora Tezi**  
**Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı**  
**Su Ürünleri Bilim Dalı**  
**Prof. Dr. H. İbrahim HALİLOĞLU**  
**2015**  
**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

*LACTOCOCCUS GARVIEAE*'nin FARKLI BALIK TÜRLERİNDE  
PATOJENİTESİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİBİYOTİK  
DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa TÜRE

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
Su Ürünleri Bilim Dalı

ERZURUM  
2015

Her hakkı saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**LACTOCOCCUS GARVİEAE'nin FARKLI BALIK TÜRLERİNDE  
PATOJENİTESİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. H. İbrahim HALİLOĞLU danışmanlığında, Mustafa TÜRE tarafından hazırlanan bu çalışma 23/03/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı – Su Ürünleri Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Halil İbrahim HALİLOĞLU

İmza:

Üye: Prof. Dr. İlhan ALTINOK

İmza:

Üye: Doç Dr. Hasan TÜRKEZ

İmza:

Üye: Doç Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

İmza:

Üye: Doç Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 02/04/2015 tarih ve 13/554 nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Ertan YILDIRIM**  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Doktora Tezi

### ***LACTOCOCCUS GARVIEAE*'nin FARKLI BALIK TÜRLERİNDE PATOJENİTESİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mustafa TÜRE

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı  
Su Ürünleri Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Halil İbrahim HALİLOĞLU

Bu tez çalışmasında ekonomik öneme sahip balık türlerinin, önemli balık patojeni olan *Lactococcus garvieae*'ye karşı duyarlılıkları, bakteri suşlarının antibiyotik direnci, direnç genleri ve plazmit profilleri araştırılmıştır. Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*), kalkan balığı (*Psetta maxima*) ve deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) 30 gün boyunca farklı sıcaklık aralığında (12-23°C) tutularak, alabalıklardan izole edilmiş *L. garvieae* (Lgper) ve ATCC 49156 suşları ile periton içi (i.p.) ve daldırma (imm.) metotları ile deneysel enfeksiyona tabi tutulmuştur. Deneylerin sonucunda, Lgper suşunun Gökkuşuğu alabalıklarında %98 ölüm oranı ile en yüksek virülansa sahip olduğu görülmüştür. Karadeniz alabalığının bu etkene karşı en az Gökkuşuğu alabalığı kadar duyarlı olduğu tespit edilmiştir (p>0,01). Kalkan ve deniz levreği *L. garvieae*'ye karşı dirençli bulunmuşsa da bu türlerin klinik belirti göstermeksizin etkeni taşıyabildikleri tespit edilmiştir. Antibiyogram test sonuçlarına göre, çalışmada kullanılan *Lactococcus* suşlarının penisilin, ampisilin, florfenikol, amoksisilin ve tetrasikline karşı duyarlı, gentamisin ve trimetoprim+sulfonamid antibiyotiklerine karşı ise dirençli olduğu tespit edilmiştir. Tedavide özellikle florfenikol ve β- laktam grubu antibiyotiklerden yararlanılabilir. Tüm bakteri suşlarının iki ya da daha fazla antibiyotik direnç genine (ADG) sahip oldukları PZR ile belirlenmiştir. *Lactococcus* suşlarında kloramfenikol, tetrasiklin ve eritromosin antibiyotiklerini kodlayan *cmlA*, *tetB* ve *ereB* direnç genleri yaygın olarak tespit edilmiştir. Ayrıca tüm *Lactococcus* suşlarında plazmit varlığı araştırılmış ancak 2 suştan izole edilebilmiştir.

**2015, 94 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Lactococcus garvieae*, balık, antibiyotik direnci, direnç geni

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### DETERMINATION OF PATHOGENICITY OF *LACTOCOCCUS GARVIEAE* ON DIFFERENT FISH SPECIES AND THEIR ANTIBIOTIC RESISTANCE

Mustafa TÜRE

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Fishery Sciences  
Fisheries Department

Supervisor: Prof. Dr. Halil İbrahim HALILOĞLU

Present study was designed to determine in susceptibilities of some important fish species to *L. garvieae*. Also, a current profiles of antimicrobial resistance and plasmid of bacterial strain were investigated. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Black Sea trout (*Salmo trutta labrax*), turbot (*Psetta maxima*), and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were kept at different temperature ranges (12-23°C) for 30 days and challenged by intraperitoneal (i.p.) injection and immersion (imm.) with *L. garvieae* (Lgper), isolated from rainbow trout and ATCC49156 strain. As a result of the experiments, Lgper strain had high virulence for rainbow trout, with 98%. Rainbow trout and Black Sea trout had similar susceptibilities to *L. garvieae* ( $P>0,01$ ). There was no mortality or any clinical signs when turbot and sea bass were challenged with *L. garvieae*. Viable *L. garvieae* cells were also recovered from surviving turbot and sea bass. All isolates were sensitive to penicillin G, ampicillin, florfenicol, amoxicillin, and tetracycline, and resistant to trimethoprim+sulfamethoxazole and gentamycin by disc diffusion method. It seems that florfenicol and  $\beta$ -lactam antibiotics are preferred in the treatment of *Lactococcosis*. All bacterial isolates had two or more resistance genes (RGs) determined by PCR. The most prevalent RGs were chloramphenicol (*cmlA*), tetracycline (*tetB*) and erythromycin (*ereB*). Bacterial strains were also screened for plasmid DNA by agarose gel electrophoresis and two strains harboured plasmids.

**2015, 94 pages**

**Keywords:** *Lactococcus garvieae*, fish, antibiotic resistance, resistance gene

## **TEŐEKKÖR**

Bu tez alıŐması Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Fakültesi doktora programı kapsamında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar, Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiş ve kurumca desteklenmiştir. Doktora eğitimim boyunca her türlü desteğini ve hoşgörüsünü esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Halil İbrahim HALİLOĞLU'na minnetlerimi sunarım.

Ayrıca değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhan ALTINOK'a, değerli mesai arkadaşlarıma, az çok desteği olan tüm enstitü personeline ve çalışma olanaklarını kolaylaŐtıran Enstitü yöneticilerine çalışma süresince yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca desteklerini hep üzerimde hissettiğim eŐim, çocuklarım ve aileme Őükranlarımı sunarım.

**Mustafa TÜRE**

**Mart, 2015**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Etken.....	1
1.2. Morfoloji ve Kültür .....	3
1.3. Antijenik Karakter .....	4
1.4. Patojenite ve Hastalığın Klinik Semptomları.....	5
1.5. Epidemiyoloji .....	6
1.6. Teşhis.....	7
1.7. Tedavi.....	8
1.8. Koruma ve Kontrol.....	9
1.9. Deneysel Enfeksiyonlar.....	10
1.10. Antimikrobiyal Maddeler ve Direnç .....	11
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>33</b>
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin kaynağı .....	33
3.1.2. Çalışmada kullanılan balıkların kaynağı .....	33
3.1.3. Deneme tanklarının hazırlanması .....	35
3.2. Metot .....	37
3.2.1. Deneysel enfeksiyonlar .....	37
3.2.1.a. Enfeksiyon protokolü .....	37
3.2.1.b. Gökkuşacağı alabalıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon .....	38
3.2.1.c. İki tür arasındaki direnç farklılığının belirlenmesi .....	39
3.2.1.d. Kalkan balıklarında enfeksiyon denemesi.....	39

3.2.1.e. Levreklerde enfeksiyon denemesi .....	39
3.2.1.f. Bakterinin geri izole edilmesi .....	40
3.2.1.g. İstatistik analizi.....	41
3.2.2. Antibiyotik direnci .....	41
3.2.2.a. Antibiyogram testi .....	41
3.2.2.b. Çoğul antibiyotik direnç (MAR) indeksi.....	42
3.2.2.c. Direnç genlerinin tespiti için DNA izolasyonu .....	42
3.2.2.d. Antibiyotik direnç genlerinin varlığının tespiti .....	43
3.2.3. Plazmit profili.....	47
3.2.3.a. Plazmit DNA izolasyonu ve görüntülenmesi .....	47
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>48</b>
4.1. Deneysel Enfeksiyonların Sonuçları .....	48
4.1.1. Gökkuşığı alabalıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon .....	49
4.1.2. İki balık türü arasındaki direnç farklılıkları .....	50
4.1.3. Kalkan balıklarında deneysel enfeksiyon denemesi.....	52
4.1.4. Levrekler ile yapılan deneysel enfeksiyon .....	52
4.1.5. Bakterilerin geri izolasyonu .....	53
4.2. Antibiyotik Direnci.....	54
4.2.1. Antibiyogram sonuçları.....	54
4.2.2. Çoğul antibiyotik direnç (MAR) indeksi sonuçları.....	54
4.2.3. Antibiyotik direnç genlerinin tespiti.....	56
4.3. Plazmit Sonuçları .....	60
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>61</b>
KAYNAKLAR .....	82
ÖZGEÇMİŞ .....	94



## SİMGELER DİZİNİ

ADB	Antibiyotik dirençli bakteri
ADG	Antibiyotik Direnç Geni
BHIA	Brain Heart İnfüzyon Agar
ELISA	Enzim-Linked Immunsorbent Assay
HİM	Hastalık ile ilişkili mortalite
JİKA	Japon Uluslararası İşbirliği Ajansı
MAR	Multiple Antibiotic Resistant
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Brot
PFGE	Pulse-Field Gel Elektroforesiz
PZR	Polimerize Zincir Reaksiyonu
SUMAE	Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü
TSA	Triptik Soy Agar
TSB	Triptik Soy Brot
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bakterilerin antibiyotiklere karşı savunma mekanizması.....	14
Şekil 3.1. Deneme ünitesinin görünümü.....	36
Şekil 3.2. Gökkuşığı alabalıkları ile yapılan denemenin tank dizaynı .....	38
Şekil 4.1. Gökkuşığı alabalıklarında otopsi bulguları .....	50
Şekil 4.2. Gökkuşığı alabalıklarında i.p. ve imm. yoluyla yapılan enfeksiyon denemesine ait kümülatif mortalite değerleri .....	50
Şekil 4.3. Karadeniz ve Gökkuşığı alabalıklarında <i>L. garvieae</i> suşu kullanılarak gerçekleştirilen enfeksiyon denemesi kümülatif ölüm oranları.....	51
Şekil 4.4. Gökkuşığı ve Karadeniz alabalığı otopsi bulguları.....	52
Şekil 4.5. Spesifik primerler ile yapılan PZR analizi sonucu oluşan ürünlerin agaroz jelde görünümü .....	53
Şekil 4.6. <i>L. garvieae</i> izolatlarında bazı farklı direnç geni belirleyicilerinin identifikasyonu .....	56
Şekil 4.7. Bazı <i>L. garvieae</i> suşlarında <i>cmlA</i> direnç geninin tespiti .....	57
Şekil 4.8. <i>L. garvieae</i> suşlarından elde edilen plazmid DNA'nın agaroz jel elektroforezi.....	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>L. garvieae</i> 'nin kültürel, biyokimyasal ve fizyolojik karakteri .....	4
Çizelge 3.1. <i>Lactococcus garvieae</i> suşları ve menşeleri. ....	34
Çizelge 3.2. Denemelerin yapıldığı tanklardaki su parametreleri.....	35
Çizelge 3.3. DNA'nın amplifikasyonu için belirlenen PZR bileşenleri ve miktarları.....	43
Çizelge 3.4. Direnç genlerinin tespitinde kullanılan primerler ve PZR şartları.....	45
Çizelge 4.1. Deney sonuçları .....	48
Çizelge 4.2. Disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları.....	54
Çizelge 4.3. <i>L. garvieae</i> suşlarında antibiyotik direnç genlerinin varlığı.....	58

## 1. GİRİŞ

*Lactococcus garvieae*, dünyada ilk defa bir balık patojeni olarak sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*) balığından izole edilmiş (Ksuda *et al.* 1991) ve neden olduğu hastalık Lactococcosis veya Streptococcosis olarak adlandırılmıştır (Austin and Austin 1999). Önceleri laktik-*Streptococcus* olarak bilinen etken laktik asit bakterileri grubundadır.

Etken Türkiye’de ilk defa 2001 yılında Ege Bölgesi’ndeki bir Gökkuşığı alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*) işletmesinde yüksek mortalite (%80) ile izole edilmiştir (Diler *et al.* 2002). Sonraları birçok bölgeye hızla yayılarak tatlı su ve deniz türlerinden izole edilmiştir (Çağırğan 2004; Altun *et al.* 2004; Kav and Erganis 2007; Tanrıkul and Gültepe 2011; Türe vd 2012).

### 1.1. Etken

Lactococcosise sebep olan etken ilk olarak Japonya’da yüksek mortalite ile seyreden salgınlar oluşturarak izole edilmiştir (Ksuda *et al.* 1991). Avrupa’da balık patojeni olarak ilk defa 1988’de İspanya’da Gökkuşığı alabalığı çiftliklerinde rastlanan bakteri (Palacios *et al.* 1993) sonraki zamanlarda birçok ülkede yaygınlaşmış ve sucul organizmalarda önemli ekonomik kayıplara yol açmıştır. Sonraları sırasıyla İtalya’da, Güney Afrika’da ve Avustralya’da Gökkuşığı alabalıklarındaki yüksek mortalitenin temel etkeni olarak tespit edilmiştir (Carson *et al.* 1993). *Lactococcus garvieae* daha sonraları Tayvan’daki dev tatlı su karidesleri (*Macrobrachium rosenbergii*), tekir balığı (*Mullus surmuletus*) ve Gökkuşığı alabalıklarında kayıplara neden olmuştur (Chen *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002; Chang *et al.* 2002). Etken Türkiye’de ilk kez 2001’de bir Gökkuşığı alabalığı işletmesinde yüksek mortalitenin sebebi olarak izole edilmiştir (Diler *et al.* 2002). Son 15 yılda *L. garvieae* Gökkuşığı alabalığı çiftliklerinde salgınlar şeklinde İngiltere’de (Bark and Mc Gregor 2001), Portekiz’de (Pereira *et al.* 2004), Fransa’da, Balkanlar’da ve İsrail’de (Eyngor *et al.* 2004), Kore’de (Baeck *et al.* 2006) ve Türkiye’de (Türe vd 2012) tatlı su ve deniz türlerinde izole edilmiştir.

*Lactococcus* genusuna ait 7 farklı tür olsa da *L. lactis* ve *L. garvieae* insan ve hayvanlarda klinik öneme sahip önemli türlerdir. Bunlardan yalnızca *L. garvieae* balıklarda hemorrajik septisemiye neden olduğu bildirilmiştir (Aguirre and Collins 1993). *Lactococcus* cinsi *Streptococceae* familyası içerisinde yer almaktadır. Etken 1985'ten sonra sığır sütünden ve süt ürünlerinden izole edilen laktik-Streptokok olarak isimlendirilmiştir (Schleifer *et al.* 1985). 1991'de, Japonya'daki sarıkuyruk balıklarında görülen streptokok salgınlarından izole edilen yeni bir tür (*Enterococcus seriolicida*) olarak adlandırılmıştır (Ksuda *et al.* 1991). İlerleyen yıllarda birkaç vakada daha hasta balıklardan izole edilen etken ile yapılan fenotipik ve moleküler çalışmalar sonucunda, etkenin *E. seriolicida* ile aynı olduğu doğrulanmış ve etken *L. garvieae*'nin sinonimi olarak isimlendirilmiştir (Domenec *et al.* 1993; Teixeira *et al.* 1996).

*L. garvieae*'nin sucül türler bakımından konakçı aralığı geniştir. Gerek deniz gerekse tatlı sularda yaşayan birçok balık türünde bildirilmiştir (Vendrell *et al.* 2006). Bu etken aynı zamanda mastitis (memeli hayvanlarda görülen meme dokusu iltihabı) enfeksiyonu geçiren sığır ve su buffalolarından (Aguirre and Collins 1993; Carvalho *et al.* 1997), kümes hayvanlarının etlerinden (Barakat *et al.* 2000), çiğ inek sütünden (Villani *et al.* 2001) ve kedi ve köpek tonsillerinden (Pot *et al.* 1996) de izole edilmiştir.

Bunlara ilaveten etkenin birkaç vakada insandan da izole edilmesi potansiyel zoonoz (hayvanlardan insanlara bulaşabilen hastalıklar) olabileceği görüşünü güçlendirmektedir. Bakteri insanlarda değişik vakalarda kan, deri ve üriner sistemden izole edilmiştir. Ayrıca sindirim sistemi problemi yaşayan bazı hastalardan etken izole edilmiş ve muhtemel sucül ortamlardaki salgınlar ile ilişkilendirilmiştir (Wang *et al.* 2007).

Farklı coğrafik alanlardan ve hayvan kaynaklarından izole edilen *L. garvieae* suşları arasında bazı karbonhidratların asidifikasyonu temelinde bazı biyokimyasal farklılıklar olsa da etken; gram pozitif, fakültatif anaerobik, hareketsiz, sporsuz, oksidaz ve katalaz negatif, oval kok, çift ya da kısa zincirler oluşturabilen kanlı agar da  $\alpha$ -hemolitik, uygun besi ortamında 4-45°C arasında ve %6,5 NaCl'de üreyebilen bir bakteri olarak bilinir

(Ksuda *et al.* 1991; Eldar *et al.* 1996). *L. garvieae*'nin tür içi sınıflandırılması amacıyla bazı karbonhidratlar ve enzimlerin kullanımı temelinde yapılan fenotipik denemelerde 13 biyotipinden söz edilmiş ve bunların 6'sı balıklardan izole edilmiştir (Vela *et al.* 2000). Ayrıca farklı coğrafik alanlardan ve kaynaklardan izole edilen *L. garvieae* suşları ile PZR temelinde epidemiyolojik amaçlı çalışmalar gerçekleştirilmiş ve suşların genel olarak coğrafik orijin ve konakçı tipine bağlı olarak fenotipik ve genetik olarak farklılaştığı görülmüştür (Vela *et al.* 2000; Ravelo *et al.* 2001; Türe *et al.* 2015). Geleneksel biyokimyasal test sonuçlarına göre *L. garvieae*'nin temel özellikleri Çizelge 1.1'de ki gibidir (Vendrell *et al.* 2006).

## **1.2. Morfoloji ve Kültür**

Bakteri, zor şartlar altında üreyebilsede, kanlı agar ilaveli genel besi yerleri, brain heart infüzyon agar ve brot (BHIA, BHIB), triptik soy agar ve brot (TSA, TSB), nutrient agar ve brot (NA, NB) ve bile eskulin agar (BEA) gibi zenginleştirilmiş besi yerlerinde hızlı bir şekilde üreyebilir (Cheng and Chen 1998). *L. garvieae*'nin optimum gelişmesi BHIB'da pH 7-8 ve 25-30°C de gerçekleşmektedir (Vendrell *et al.* 2006).

**Çizelge 1.1.** *L. garvieae*'nin kültürel, biyokimyasal ve fizyolojik karakteri

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

### 1.3. Antijenik Karakter

*L. garvieae* suşlarının patojenitesi onların aglütinasyon (antikor ile antijenin bağlandıktan sonra kompleksler oluşturarak kümelenmesi) yeteneği ile alakalıdır. Lam aglütinasyon tekniği ile yapılan *L. garvieae*'nin serolojik karakterizasyon çalışmalarında etkenin hücre duvarı kaynaklı kapsüllü (KG<sup>-</sup>) ve kapsülsüz (KG<sup>+</sup>) şeklinde iki antijenik tipi olduğu bildirilmiştir (Yoshida *et al.* 1997). Bakterinin kapsüllü ve kapsülsüz suşları arasında hücre yüzeyinde bulunan karbonhidrat yapıları arasında farklılıklar

bulunmuştur (Barnes *et al.* 2002). Kapsüllü tip suşu zarf benzeri bir substrata sahiptir. Bakterinin patojenitesini belirlemeye yönelik Gökkuşığı alabalıklarında yapılan birkaç çalışmada kapsüllü suşların kapsülsüz suşlara oranla hidrofilik olduğu ve fagositik dirençlerinin daha yüksek olduğu dolayısıyla daha patojen oldukları belirlenmiştir (Kawanishi *et al.* 2007; Miyauchi *et al.* 2012). Ayrıca hastalığın mortalitesi ve klinik bulguların şiddeti, bakterinin ekstra ve intrasellular toksinleri ile ilişkili bulunmuştur (Ksuda and Hamaguchi 1989).

#### **1.4. Patojenite ve Hastalığın Klinik Semptomları**

Hastalığın gelişimi her ne kadar su sıcaklığı, suyun mikrobiyal yükü ve balıkların bakım şartları gibi çevresel faktörlere bağlı olsa da Lactococcosis hiperakut ve hemorrajik sepsisemi olarak belirtilmiştir (Bercovier *et al.* 1997). Mortalitenin %50'nin üzerine çıkması, büyüme oranının azalması ve hasta görünümlü balıkların pazarlama sıkıntılarında dolayı hastalıkta ekonomik boyut önemlidir (Vendrell *et al.* 2006) Etkenin inkubasyon periyodu çok kısa ve virulansi çok yüksektir. Deneysel enfeksiyonlarda klinik belirtiler iki gün içinde kendini gösterip, mortalite oranı %100'e kadar çıkabilmektedir (Itami *et al.* 1996).

Hasta balıklarda, iştahsızlık, uyuşukluk, deride kararma ve düzensiz yüzme gibi genel hastalık bulguları hızlıca ortaya çıkar. Tipik dış bulgu çift ya da tek taraflı ekzoftalmus (göz fırlaması)'dur. Ağız ve göz çevresinde, yüzgeç kaidelerinde ve anal bölgede kanamalar görülür. Ayrıca karın bölgesinde şişlik ve anüste prolapsus sıklıkla gözlenir (Eldar and Ghittino 1999; Muzquiz *et al.* 1999; Diler *et al.* 2002). Etken damar endotelinde lezyonlar oluşturur ve sonucunda iç organların yüzeyinde nokta ve yaygın tarzda kanamalara sebep olur. Ağız ve anüs çevresi doku ve yüzgeçleri en çok etkilenen kısımlardır (Muzquiz *et al.* 1999). Nekropside periton üzerinde asidik karakterli irinli ya da kanlı olabilen sıvı birikmiştir. Etkilenen organlar daha ziyade karaciğer, dalak, kalp, beyin ve sindirim kanalıdır (Diler *et al.* 2002).



Histopatolojik incelemelerde göz ve çevresinde iltihaplı hücre birikimi söz konusudur. Ayrıca gözlerin ön ve arka bölümlerinde irinli alanlar ve göz içi kas ve yağ dokusunun kanamalı iltihabı gözlenebilir. Etkilenen balıkta genelde meningitis mevcuttur ve beyinde beyin zarlarına ait lezyonlar gözlenebilir. Kalp, böbrekler ve peritonda da lezyonlar diğer organlardaki gibidir ve bol fibroblast, makrofaj ve lenfosit hücre birikimi görülebilir (Eldar and Ghittino 1999; Chang *et al.* 2002).

### 1.5. Epidemiyoloji

*L. garvieae*, Gökkuşluğu alabalığı dışında, tilapya (*Tilapia spp.*), Japon yılan balığı (*Anguilla floridana*), sarıkuyruk (Kusuda *et al.* 1991), pisi balığı (*Platichthys flesus*) (Lee *et al.* 2001; Baeck *et al.* 2006), kefal (*Mugil cephalus*) (Chen *et al.* 2002), ve dev tatlı su karidesi (*Macrobrachium rosenbergii*) (Cheng *et al.* 2002) gibi geniş aralıktaki akuatik türlerden hastalık etkeni olarak izole edilmiştir. Gökkuşluğu alabalıkları, diğer balıklarla karşılaştırıldıklarında en duyarlı ve akut salgınlar ile karakterize mortalitenin en yüksek olduğu balık türüdür (Vendrell *et al.* 2006).

*L. garvieae* ile yapılan patojenite çalışmalarında genç balıklarda erişkin balıklara oranla akut formun daha uzun süre devam edip mortalitenin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Muzquiz *et al.* 1999). Ancak sonraları Gökkuşluğu alabalığı çiftliklerindeki doğal enfeksiyonlarda etkenin 5g'lık balıktan 1kg ve daha büyük balıklara kadar tümünü etkilediği görülmüştür (Diler *et al.* 2002; Pereira *et al.* 2004).

Su sıcaklığının hastalığın ortaya çıkmasındaki rolü büyüktür. Akut salgınlar su sıcaklıklarının 14-15°C'yi bulduğu durumlarda görülmekle beraber yüksek mortaliteye sebep olabilen çoğu salgınlar 18°C'den sonra görülmektedir (Vendrell *et al.* 2006). Olumsuz çevre koşulları, su kalitesi, bakım şartları, beslenme ve yetersiz oksijen etkenin yayılmasını ve virulansını artırmaktadır (Fukuda *et al.* 1997). Etkenin bilinen en dirençli balık patojenlerinden biri olduğu belirtilmiş olup, 60°C'de pH 4-12 arasında 1 hafta yaşayabildiği bildirilmiştir (Dixon *et al.* 2012).

Bakterinin bir işletmeye girişi ve orada hastalığı meydana getirmesi farklı yollarla ve farklı kaynaklarla gerçekleşmektedir. Enfekte balıkların çiftliğe transferi en sık görülen enfeksiyon kaynağıdır. Asemptomatik taşıyıcı balıklar bakteriyi dışkı yolu ile havuza yayarlar ve böylece sağlıklı balıklar enfekte edilmiş olur. Hastalığı geçirmiş balıklar da belirli aralıklarda etkeni yayabilirler. Ayrıca enfekte balık ya da gıdaların yem olarak kullanılması ile de etkenin işletmelere bulaşabileceği bildirilmiştir (Vendrell *et al.* 2006). Çiftliklerdeki asemptomatik balıkların varlığı PZR ile belirlenmiş ve çevre durumu bakteri lehine optimum olunca hastalığın ortaya çıktığı saptanmıştır (Cheng *et al.* 2002). Etken çiftliklerde balık dışında havuz suyundan, çamurdan, sedimentten ve alet ekipmandan izole edilmiştir. Ayrıca bazı canlı türlerinin bağırsak florasının bir parçası olarak kabul edilmiştir (Kitao *et al.* 1979; Kusuda *et al.* 1991). Hastalıkta bulaşma temelde horizontal (etken kaynağından yeni bir konağa yerleşmek) yolla olmaktadır. Özellikle aynı ortamı paylaşan balıklar arasında hasta ve yaralı balıkların birbirine teması ya da fekal-oral yol ile bulaşma olmaktadır (Vendrell *et al.* 2006). Suşlar arası genetik benzerliklerin araştırıldığı bir epidemiyolojik çalışmada, çiftlikler arası yavru balık hareketlerinin bilinçsizce yapıldığı durumlarda etkenin rahatlıkla bulaşabildiği görülmüştür (Türe vd 2012; Öztürk and Altınok 2014).

## 1.6. Teşhis

Hasta balıklarda görülen lezyonlar ve karakteristik semptomlar (artan su sıcaklığı ile beraber ölümlerin artması, uyuşukluk, yüzme bozukluğu, renkte kararma, göz çevresi anüs ve yüzgeçlerde kızarıklık, tek ya da çift taraflı ekzoftalmus vb.) hastalığı akla getirirse de, benzer diğer hastalıklarla (Streptococcosis) karışabileceğinden kesin teşhis için bakteriyel etkenin laboratuvar metotları ile tanımlanması gerekmektedir (Eldar and Ghittino 1999; Vendrell *et al.* 2006).

Hastalığın görüldüğü yerden henüz ölmüş ya da hasta görünümlü balıklar laboratuvara alındıktan sonra, iç organlardan etken izole edilebilir. Etken birçok organdan izole edilebilse de en uygun organlar böbrek, karaciğer ve beyindir (Diler *et al.* 2002; Kav ve Erganiş 2007). *L. garvieae*'yi izole etmek için BHIA, TSA ve NA gibi besiyerleri

kullanılmaktadır (Kusuda *et al.* 1991; Austin *et al.* 1999). 37°C'lik sıcaklık ve 24 saat *L. garvieae*'nin gelişmesi için uygun şartlar olduğu gibi balıklarda hastalık yapan diğer birçok bakterinin üremesi engelleneceği için teşhiste önemlidir (Prieta *et al.* 1993). Etkenin biyokimyasal karakterini ortaya çıkarmak amacıyla klasik biyokimyasal metotlar kullanılabilir. API 20 Strep, API Rapid ID32 ve API 50CH gibi minitarize sistemler identifikasyonun yanı sıra bakterinin fenotipik ve enzimatik karakterini ortaya çıkarmaktadır (Ravelo *et al.* 2001, Çağırğan 2004). API20 Strep testi ile etken *L. lactis* ile karıştırılabilmektedir (Türe vd 2012).

*L. garvieae*, *L. lactis* ile yakın ilişkili olup, bazı önemli fenotipik karakterler bakımından karıştırılabilirse de klindamisin duyarlılık testi ve PZR metodu ile bu iki tür birbirinden ayrılabilir (Elliot *et al.* 1991; Zlotkin *et al.* 1998). *Lactococcus garvieae*'nin teşhisinde serolojik olarak; lam aglütinasyon testi (Kitao 1982; Yoshida *et al.* 1997) en sık tercih edilen test tekniğidir. Ayrıca tanı hasta dokuların histopatolojik kesit incelemesi ile de desteklenebilir (Vendrell *et al.* 2006; Timur vd 2011).

Son yıllarda geliştirilen PZR protokolleri ile dizayn edilen primer setleri yardımıyla 16S rDNA sekans analizleri yapılarak *L. garvieae*'nin spesifik tür tayini kolayca yapılabilmektedir (Zlotkin *et al.* 1998; Altınok 2011). Yine son zamanlarda balıklarda bulunan birden fazla patojeni eş zamanlı olarak tespit için çoklu (multipleks)-PZR metodu geliştirilmiştir. Bu teknik hem saf kültürlerden hem de doğal enfekte balık dokusundan *L. garvieae*'nin dışında birden fazla etkeninde aynı anda tespitine kısa sürede olanak vermektedir (Mata *et al.* 2004; Altınok 2011).

## 1.7. Tedavi

Balıklarda, *L. garvieae*'den kaynaklanan salgınlarla mücadele edebilmek için, son yıllarda antibiyogram temelinde birçok çalışma yapılmıştır (Kawanishi *et al.* 2005; Kubilay vd 2005; Kav and Erganiş 2008; Raissy and Ansari 2011). Amaç uygun kimyasal kullanıp, antibiyotiklere olan direnç artışının önüne geçmek ve tedavi maliyetini düşürmektir. Belirtilen antibiyotiklerin uygun doz ve şekillerde kullanımı ile

salgınların önüne geçilebileceği ve mortalitenin azaltılabileceği bildirilmiştir. 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 *et al.* 1997). Farklı coğrafik orijinli *L. garvieae* suşları ile yapılan çalışmalarda suşların tümünün Enrofloksasin ve Nitrofurantoin'e duyarlı olduğu, Oksolinik asit ve Sulfametoksazol-trimetoprim'e ise dirençli olduğu gözlemlenirken Eritromisin, Kloramfenikol, Oksitetrasiklin ve Ampisilin'e karşı ise sonuçların orijine göre değişken olduğu görülmüştür (Ravelo *et al.* 2001). Kawanishi *et al.* (2005), *L. garvieae* suşlarının PFGE paterni ve ilaç direnci üzerine yaptıkları bir çalışmada, suşların yaklaşık yarısının eritromisin, oksitetrasiklin ve linkomisine karşı dirençli oldukları ve tüm dirençli suşların direnç genleri (*ermB* ve *tetS*) taşıdıklarını bildirmişlerdir.

Kültür ortamında *L. garvieae* ile mücadelede bakteriyofajlar da denenmiş fajların özellikle oral yolla alındıklarında mortaliteyi düşürmede yardımcı oldukları saptanmıştır (Nakai *et al.* 1999).

### **1.8. Koruma ve Kontrol**

Etkenin çiftliğe girişini engellemek amacıyla koruyucu önlemler almak gerekir. Balığa elle müdahalenin minimuma indirilmesi, ölü ya da hasta balıkların hemen uzaklaştırılması, erken teşhis ve tedavi, stok yoğunluğunun düşük tutulması, alet ve ekipmanda hijyene dikkat edilmesi ve kaliteli yem kullanımı alınması gereken en önemli tedbirlerdir. Çiftlikler arası kontrolsüz balık transferleri etkenin kısa sürede hızla yayılmasının en önemli nedenlerindedir (Vendrell *et al.* 2006; Türe vd 2012).

Ayrıca tankların periyodik temizliği alet ve ekipmanın formaldehit, kloramin-T, hidrojen peroksit ve potasyum permanganat gibi dezenfektanlar ile dezenfeksiyonu etkenin yayılmasının engellenmesi için faydalıdır. Ayrıca etkenin girişini engellemek amacıyla tesise yumurta ve yavru balık girişlerinin kontrol altına alınması ve hastalıktan arındırılmış sağlık sertifikalı yumurtaların alınması gereklidir (Vendrell *et al.* 2006).

Hastalık çıkışının engellenmesinde fizikokimyasal parametrelerin kontrolü çok önemlidir. Su sıcaklığının 15°C'nin üzerine çıkması, amonyak konsantrasyonunun artması ve beraberinde oksijen doygunluğunun azalması hastalığın ortaya çıkışını ve şiddetini arttırmaktadır (Fukuda *et al.* 1997).

Lactococcosizi kontrol altına almak için son yıllarda duyarlı popülasyonların aşılanaileceği bildirilmiştir. *L. garvieae* izolatlarının değişik kimyasallar yardımı ile hazırlanmış immobilize aşuları geliştirilmiştir (Eldar *et al.* 1997; Altun *et al.* 2010). Yapılan denemelerde aşılanmış balıklardaki mortalitenin aşılanmamış üstelik eritromisin ile tedavi edilen balıklarda ki mortalite oranına oranla üç kat daha düşük olduğu gözlenmiştir (Prieta *et al.* 1993). Son yıllarda farklı mineral yağlar ile adjuvantlı aşular geliştirilmiş olup bu aşuların aşılamaadan sonraki koruma süresi diğer aşulara göre daha uzun olduğu saptanmıştır. Günümüzde Lactococcosiz salgınlarının önlenmesinde intraperitoneal yol ile yağ adjuvantlı aşılamanın en etkili yöntem olduğu düşünülmektedir (Vendrell *et al.* 2006). Aşılamanın Lactococcosiz 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 *et al.* 2003).

### **1.9. Deneysel Enfeksiyonlar**

Moleküler biyoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak, balık hastalıklarının tespiti, etkenlerin hastalık yapabilme yetenekleri ve epidemiyolojisine yönelik çalışmalar son yıllarda hız kazanmış ve bu sayede balık hastalıklarının önlenmesi, antibiyotik direncinin azaltılması ve böylece düşük maliyette ürün hasadı gibi konularda önemli adımlar atılabilmektedir (Altınok and Kurt 2003). Hastalığa neden olan etkenlerin hastalık yapabilme yeteneklerinin (virülans) ve neden olduğu hastalığın şiddetinin (patojenite) tespitine yönelik spesifik ve non-spesifik çalışmalar yapılabilmektedir. Serum lizozim aktivitesi, fagositoz aktivitesi, alternatif komplement aktivitesi, ön böbrek lökositlerinin süperoksit anyon üretimi, ve immunoglobulin seviyelerinin tayini gibi çalışmalar non-

spesifik immun sistem göstergelerini tespit etmeye yönelik olup, etkenin direkt virulans ve patojenitesini belirlemeye yönelik yapılan deneysel enfeksiyonlar ise spesifik çalışmalardır (Aydın vd 2011).

Son 15 yılda bakteri ve virüslerden kaynaklanan balık hastalıklarının araştırılmalarına yönelik gerçekleştirilen deneysel enfeksiyonların sayıları hızla artmaktadır. Bu sayede etkenlerin virülansı ve üreticilerin kendilerini bekleyen muhtemel tehlikelere yönelik bakış açıları belirlenebilmiştir (King *et al.* 2001; Kang *et al.* 2004; Algöet *et al.* 2009; Işıdan and Bolat 2011; Öğüt and Altuntaş 2011; Avcı *et al.* 2013).

### **1.10. Antimikrobiyal Maddeler ve Direnç**

Antibiyotikler, 1920'li yıllarda penisilinin keşfi ile kullanılmaya başlanmıştır. Düşük miktarlarda mikroorganizmaları öldüren ya da üremelerini durduran bileşikler olup bir kısmı doğal mikroorganizmalardan bir kısmı ise sentezlenmek sureti ile üretilirler (Wright 2007).

Veterinerlik alanında kullanılan antibiyotikler genelde farklı olmayıp beşeri alanda kullanılanlar ile eşdeğerdir (muadil). Bu ilaçlar yoğun hayvan üretiminin yapıldığı alanlarda sadece tedavi amaçlı kullanılmayıp aynı zamanda koruyucu (profilaktik) ve büyümeyi hızlandırmak amacıyla da kullanılmaktadır (Anderson *et al.* 2003). Dünya su ürünleri sektöründe; amoksisilin, ampisilin, florfenikol, eritromisin, furazolidon, nitrofurantoin, sulfanamid, tetrasiklinler, enrofloksasin, oksolinik asit ve neomisin gibi geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılmaktadır (Van Dongen *et al.* 2008).

İnsan ve hayvanlarda genel boşaltımı takiben bakteriler ve antibiyotik kalıntıları çoğunlukla sucul ortamlara karışmaktadır. Yoğun yetiştiriciliğin yapıldığı alanlarda doğal ve suni gübrelerdeki ilaç kalıntıları toprağa oradan da yüzey ve yer altı sularına karışmaktadır. Hastane atıklarının yeterince dezenfekte edilmemesi, karasal kaynaklı bakteriler, nutrientler, antibiyotik üretim alanları ve ağır sanayi atıkları da dolaylı yollardan sucul alanları kirletebilmektedir (Campagnolo *et al.* 2002; Baquero *et al.*

2008). Tedavi ve koruyucu amaçlı yoğun antibiyotik kullanımı, antibiyotik dirençli bakterilerin (ADB) ve antibiyotik direnç genlerinin (ADG) sucul çevrede oluşmasına neden olmaktadır. Bu durumda özellikle sucul alanlar direnç genleri bakımından rezervuar konumuna gelebilir (Cabello *et al.* 2013).

Antibiyotiklerin kullanımına bağlı seçici baskı duyarlı mikroorganizmaları yok ederken, dirençli bakterileri ise daha dirençli hale getirmektedir. Duyarlı bakteriler yoğun ve bilinçsiz antibiyotik kullanımına bağlı olarak zamanla direnç kazanabilirler. Duyarlı bakterilerin direnç kazanmaları için mutlaka antibiyotiklerle karşılaşmaları gerekli olmayıp çevrede direnç geni taşıyan bakterilerden gen aktarımı ile de dirençli hale gelmektedirler (Kümmerer 2009; Wright 2010). Üç ve daha fazla antibiyotiğe direnç gösteren bakterilere Çoğul Dirençli Bakteriler (Multidrug Resistant Bacteria) denmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), çoğul dirençli tüberkülozdan dolayı her yıl 150 000 insanın öldüğünü bildirmiştir (WHO 2012).

ADG, bakteri jenerasyonları arasında vertikal (dikey) olarak yayılabildiği gibi horizontal (yatay) olarak da balık patojenleri arasında yayılabilmektedir. Böylece direnç genleri, balık hastalıklarının tedavisinde antibiyotik kullanımını etkisizleştirmektedir. Bu nedenle yetiştiricilik faaliyetlerinde kayıpları önlemek için ADG'nin oluşumunu ve yayılımını kontrol altına almak önemlidir (Muziasari *et al.* 2014).

ADG'nin sucul çevrede horizontal olarak yayılması, plazmit, transpozon ve integronlar gibi ekstra kromozomal genetik unsurlarla olmaktadır. Plazmitler kromozomal DNA'dan bağımsız olarak replike olabilen, antibiyotik ve ağır metal direnç genlerini bünyesinde taşıyabilen yapılardır. Taşıdıkları ADG'nin aynı ortamda bulunan bakteriler arasında horizontal olarak geçişine sebep olurlar (Actis *et al.* 1999). İntegronlar, plazmit ve transpozon gibi hareketli unsurlar tarafından taşınır ve onların bakteri popülasyonları arasında yayılmasına yardımcı olurlar. Ayrıca yapılarında birden fazla direnç geni içeren gen kasetlerini barındırırlar. Tüm bu ekstra kromozomal mobilize (hareketli) unsurlar direnç genlerinin duyarlı bakteriler arasında horizontal olarak transferine sebep olurlar (Hall and Collis 1995). Patojen bakterilerin direnç genlerini yaymaları genelde

hareketli genetik öğelerle olmakta iken çevresel bakterilerin antibiyotik direnç genleri kromozomlarda kodlanmıştır ve antibiyotiklere maruz kalındığında ekspresyonu başlamaktadır (Wright 2007).

Bakterilerin antibiyotik direncine sahip olmaları bir adaptasyon mekanizmasıdır. Böylece olumsuz çevre koşulları karşısında hayatlarını devam ettirebilirler. Antibiyotik direnci ve virülans genler bakterinin kromozom ve/veya plazmiti üzerinde gen kümesi olarak bulunurlar. Bu alanlara direnç ya da patojenite adası da denir (Izumiya *et al.* 2011).

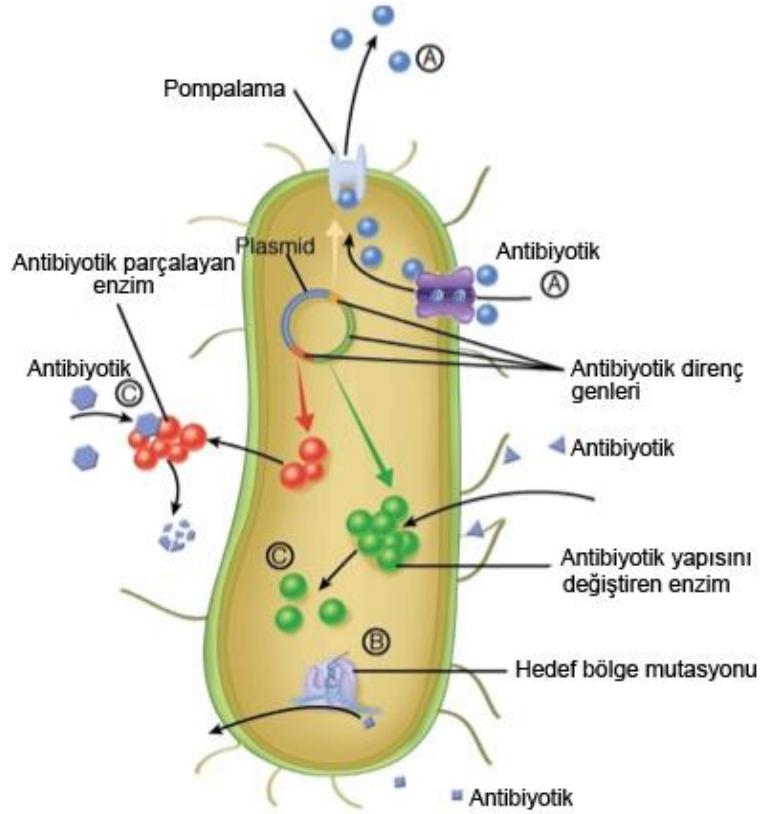
Enterekoklar dirençli hastane enfeksiyonlarına sebep olan gram (+) bakterilerdir. Bu bakteriler arasında direnç kazanımı ve yayılımı plazmit gibi hareketli genetik unsurların horizontal transferi vasıtası ile olmakta ve bu yayılım farklı taksonlardaki bakterilere de sıçrayabilmektedir. Bu plazmitler vankomisin ve metisilin gibi önemli antibiyotik gruplarına karşı dirençli gram (+) suşların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Plazmitler ayrıca bakteriler arasında geniş bir biçimde yayılım göstererek antibiyotik direnci, virulanslık ve adaptasyon gibi özelliklerin bakteriler arasında transferine aracılık etmektedirler (Palmer *et al.* 2010).

Bakteriler genel olarak 3 farklı mekanizma ile kendilerini antimikrobiyal ajanlara karşı savunurlar (Şekil 1.1);

- Antibiyotik aktivitesini engelleyici özellikte enzimler kullanmak (antibiyotikleri parçalayan veya yapısını değiştiren enzimler),
- Stoplazmadan antibiyotikleri atmaya yarayan iç zar proteinleri (pompalama sistemi)
- Hedef bölge mutasyonları.

Bu mekanizmalar genellikle plazmit kökenli olup direnç genleri tarafından kontrol edilirler (Anonim 2014a; Wright 2007).





**Şekil 1.1.** Bakterilerin antibiyotiklere karşı savunma mekanizması (Ryan and Ray 2004)

Ülkemizde bir balık patojeni olarak *L. garvieae* ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Fakat bunlar daha çok etkenin hızlı teşhisi, epidemiyolojisi, histopatolojisi, aşı uygulamaları ve hastalığın tedavisine yöneliktir (Diler *et al.* 2002; Çağırğan 2004; Kav and Erganiş 2008; Altun *et al.* 2010; Türe 2012; Avcı *et al.* 2013). Etkenin patojenitesi ve antibiyotik direncinin genetik anlamda araştırılması üzerine etkin bir çalışma yapılmamıştır. Özellikle Türkiye’den izole edilen saha suşlarının balıklar üzerinde hastalık oluşturma yeteneğinin belirlenmesi konusunda araştırmalar yetersizdir. Ayrıca Gökkuşluğu alabalığına alternatif olarak son yıllarda ülkemizde kültüre alınarak artan bir şekilde yetiştiriciliği yapılan Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*), yoğun üretimi ve ihracatı yapılan deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) ve ekonomik değeri yüksek kalkan balığı (*Psetta maxima*) gibi türler üzerinde etkenin virülansının deneysel yollarla ortaya koyulması gerekmektedir. Bu bağlamda ülkemizden izole edilen bir suş (*Lgper*) ve referans suş (*ATCC 49156*) kullanımı ile yapılan bu çalışma bu alanda ilk olması nedeniyle bu noktalardaki bilgi eksikliğini bir ölçüde kapatarak daha sonraki çalışmalar

için temel oluşturacaktır. Ayrıca olası Lactococcus salgınlarının tedavisinde uygun antibiyotik grubunun bilinip hastalık tedavisinde kullanılması gerekmektedir. Antibiyogram testi sonucuna göre dirençli bulunan suşlarda, ilgili antibiyotikleri kodlayan direnç genlerinin ve bu genlerin yayılmasında önemli rol oynayan R-plazmitlerinin varlığı ortaya konulmuştur. Böylece olası hastalık salgınlarında tereddütsüz uygun antibiyotik kullanımı sağlanacak, böylece hem zaman ve maddi kaybının hem de çevre kirliliğinin önüne geçilecektir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Türkiye’de balık yetiştiriciliği temel olarak; Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) gibi karnivor türler üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Gökkuşığı alabalığı ülkemizde; tatlı sular üzerine kurulu beton havuzlarda, göl gölet ve baraj göllerindeki kafeslerde, denizlerde ise ağ kafeslerde yetiştirilmektedir. Türün doğal olarak deniz ve derelerde bulunması, ancak işletmelerden kaçan miktarlar ile sınırlıdır. Bu türün yetiştiriciliğini yapan aile tipi küçük işletmeler ve büyük işletmeler, yumurta ve yavru ihtiyacını çoğunlukla kendi damızlık stoklarından sağlamakta, bir kısmı ise bölgesindeki diğer işletmelerden, Kayseri, Muğla gibi illerden ya da yurt dışından sağlamaktadır. Ülkemizde bu balık türünün yetiştiriciliğine 1970’li yılların başında amatör anlamda başlanmıştır. Balığın uygun sıcaklıklarda daha hızlı büyüdüğü denizel ortamda korunaklı sahalara ağ kafeslerinin inşası, dalgalara dayanıklı kıyı ötesi (off-shore) sistemlere geçiş, araştırma ve eğitim kurumlarının karlılığı arttıran konulardaki teknik destekleri ve devlet desteğinin de yardımı ile işletme sayısı giderek artmaktadır. 9-15 aylık dönemde 1-3g ağırlığından porsiyonluk ağırlığa (150-250g) ulaşabilen tür, ortalama 100 000 ton ile ülkemizde en yoğun yetiştiriciliği yapılan türdür (SUMAE 2012; TÜİK 2013).

Kültürü yapılan ve ekonomik öneme haiz bir diğer salmonid türü de Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*)’dır. Cinsiyet, yaş, yaşadığı ortam ve beslenme şekillerine bağlı olarak bireyler arasında bazı farklılıklar olmakla beraber genel olarak Gökkuşığı alabalığı ile benzerlik göstermekte hatta Türkiye’deki tüm alabalıkların tek bir tür altında (kahverengi alabalık, *Salmo trutta*) toplanabileceği düşünülmektedir (Geldiay ve Balık 1996). Kahverengi alabalığın bir alt türü olarak kabul edilen Karadeniz alabalığının Slastenenko (1956)’ya göre deniz, dere ve göl olmak üzere 3 ekotipi mevcuttur (Geldiay ve Balık 1996). Karadeniz alabalığı yetiştiriciliği, Gökkuşığı alabalığı ile aynı ya da benzer ortamlarda yapılmaktadır. Ülkemizin endemik balık türlerinden biri olan ve Karadeniz Bölgesi’ndeki derelerde doğal olarak yaşayan bu tür, büyüme hızı, kolay adaptasyon yeteneği ve market değeri gibi özelliklerinden dolayı

Gökkuşığı alabalığına alternatif olarak düşünülmekte ve üretimi hızla artmaktadır (Çakmak vd 2007).

Deniz kafeslerinde yaz aylarında ortalama 4 aylık dönem, su sıcaklıklarının artmasından dolayı alabalıklar açısından boş geçmektedir. Önceleri Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde ağ kafeslerde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan levrek son yıllarda Karadeniz Bölgesi'nde (Perşembe/Ordu ve Yomra/Trabzon) başarıyla sürdürülmektedir. Haziran başlarında 3-5g ağırlıkta kafeslere bırakılan deniz levrekleri Ege Bölgesi'nde 10, Karadeniz Bölgesinde ise 18 aylık sürede tüketim ağırlığına ulaşmaktadır (SUMAE 2012). Levrek ortalama 65 000 tonluk üretimi ile Türkiye'de en yoğun yetiştiriciliği yapılan deniz balığı türüdür (TÜİK 2013).

Son yıllarda stokları çökme seviyesine yaklaşan demersal balık türlerinden biri olan kalkan (*Psetta maxima*), düşük av verimine karşın ekonomik değeri oldukça yüksektir. Uzatma ağları ya da dip trolü ile yakalanan kalkan av baskısı nedeni ile gittikçe azalmaktadır (SUMAE 2012). İnsani tüketim açısından yüksek değere sahip olan kalkan balığı küçük morfolojik ve genetik farklılıklar ile tüm dünyaya yayılmış vaziyettedir (Zengin *et al.* 2006). Avrupa'da başlıca İngiltere, Fransa, İspanya ve Almanya gibi ülkeler yassı balık üretimi bakımından oldukça ileri seviyededirler. Ülkemizde ise şimdilik birkaç özel sektör kuruluşu kültür ortamında kalkan balıkları yetiştirmektedir (Işıdan 2010). Ülkemiz balıkçılığının günümüzdeki yapısı üreticiyi yeni tür arayışlarına itmekte ve gelecekte yassı balık üretiminin de oldukça ileri seviyelere gelebileceği düşünülmektedir. Kalkan balığının biyoekolojik özelliklerinin ve yetiştiriciliğe alınabilirliğinin araştırılması ile ilgili bir dizi projeler 2000 yılından buyana Japan International Cooperation Agency (JICA) ile Su Ürünleri Araştırma Enstitüleri (Trabzon, Antalya) arasında gerçekleştirilmektedir. Başarılı proje çıktıları şimdilerde ülkemiz ve komşu ülkelerdeki yatırımcıların ilgisini çekmekte ve teknik destek istenmektedir. Bu türünde yakında balıkçılık alanında ülkemizin önemli yetiştiricilik kalemi olması öngörülmektedir.

Çeşitli balık türlerinin farklı bakteri ve viral etkenlere karşı duyarlılıklarını tespit etmek amacı ile deneysel enfeksiyonlara (duyarlılık testleri) son yıllarda sıklıkla başvurulmaktadır. Bu testler; tür duyarlılıklarının yanı sıra yeni izole edilen bakteri ve virüs suşlarının patojen ya da apatojen olmaları, konakçıdaki direnç gelişimi, immunojenite ve yeni üretilen aşılardan denenmesi gibi daha birçok konularda bilime yardımcı olmaktadır.

Algöet *et al.* (2009) İngiltere’de yaptıkları bir çalışmada, tatlı su balığı türünün *L. garvieae*’ya karşı duyarlılıklarını tespit etmeye çalışmışlardır. İngiltere’de bir alabalık çiftliğinden izole edilen ve Pulse-field gel elektroforesiz (PFGE) metodu ile pulsotype A1 olarak karakterize edilen *L. garvieae* 00021 isimli suşu, farklı doz ve sıcaklık aralığında Gökkuşluğu alabalığı, çipura, kahverengi alabalık, Atlantik salmon (*Salmo salar*), grayling (*Thymallus thymallus*), tatlı su kefali (*Leuciscus cephalus*) ve sazan türleri (*Cyprinus carpio*, *Tinca tinca*, *Scardinius erythrophthalmus*, *Barbus barbus*, *Leuciscus leuciscus* ve *Rutilus rutilus*)’ne karşı denenmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. 12, 14, 16 ve 18°C’deki farklı sıcaklıklarda ve sabit dozda bakteri miktarı ile Gökkuşluğu alabalıklarının intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon yolu ile enfekte edildiği 1. Grup denemede, su sıcaklığı arttıkça ölüm oranının (mortalite) arttığı görülmüştür (maximum %67 ve minimum %3). Üç farklı dozda bakteriyle, 3 farklı alabalık türünün i.p. yolu ile hastalandırıldığı 2. Grup denemede ise bakteri dozu arttıkça balık ölümlerinin arttığı ( $2 \times 10^2$  dozda en az ve  $2 \times 10^7$  dozda en fazla) sonucuna varılmıştır. Son deneme grubunda ise Gökkuşluğu alabalığı, kefal ve sazan türleri i.p. ve kohabitasyon (enfekte edilen ve edilmeyen balıkların bir arada tutulduğu doğala yakın bulaşma şekli) yolu ile denemeye tabi tutulmuş ve en yüksek Gökkuşluğu alabalığında olmak üzere tüm balık türlerinde değişen oranlarda mortalite gerçekleşmiştir. Ayrıca son denemede sağ kalan balıkların bir kısmından bakterinin geri izole edilebilmesi, hastalık belirtisi göstermeyen balıkların taşıyıcı olabileceği sonucunu doğurmuştur.

*L. garvieae* Türkiye’de ilk defa 2001 yılında izole edilmiştir. Su sıcaklıklarının yükseldiği Mayıs ve Haziran aylarında Ege Bölgesi’ndeki bir Gökkuşluğu alabalığı işletmesinde mortalitenin yaklaşık %80’i bulunduğu durumda hastalık fark edilmiştir.

Ortalama 100-150 gramlık balıklarda çift taraflı ekzoftalmus ve yüzgeçlerde kanamalar dikkat çekmiştir. Etkenin hasta balıklardan izole edilmesini takiben biyokimyasal ve morfolojik karakterinin klasik ve ticari (Rapid ID 32 Strep) metotlarla ortaya konulması sayesinde isimlendirilmesi gerçekleştirilmiştir (Diler *et al.* 2012).

Evans *et al.* (2009) Brezilya'da kültür Nil tilapya (*Oreochromis niloticus*)'sı ve bir yayın balığı türü olan pintado (*Pseudoplathystoma corruscans*)'dan ilk kez *L. garvieae*'yi izole etmeyi başarmışlardır. Ayrıca Nil tilapyelerinin, izole edilen bu suşa maruz bırakılması şeklinde gerçekleştirilen deneysel enfeksiyon ile duyarlılıkları ortaya konmuştur. Bu çalışma etkenin hem Brezilya'dan hem de bu iki balık türünden ilk kez rapor edilmesi bakımından önemlidir. Bu bildiri ile *L. garvieae*'nin konakçı ve coğrafik aralığı genişlemiştir. Ayrıca etkenin izole edilmesinde kullanılan ticari sistem (Biolog Microlog) PZR'ye alternatif olarak düşünülmüştür.

Kang *et al.* (2004) siyah kaya balığı (*Sebastes schlegeli*) ve daha birçok isimle anılan ve Kore'nin en önemli deniz kültür balıklarından olan türün son yıllardaki üretiminin azalmasının nedenlerini araştırmışlardır. Kayıpların en önemli nedeni Streptokokozis'e neden olan *L. garvieae* bağlanmış ve etkenin patojenitesi anlaşılmaya çalışılmıştır. Ülkeden izole edilen, kapsüllü ve kapsülsüz 2'şer suş i.p. olarak balıklara enjekte edilmiş ve 25 gün ve 18°C'de gerçekleştirilen çalışmada özellikle kapsüllü suşların virülansının çok yüksek olduğu ve balık kayıplarının ana nedeni olduğu sonucuna varılmıştır.

Japonya'da yapılan bir diğer çalışmada, sarıkuyruk (*Seriola spp.*), alabalık, sığır, kedi, köpek, at ve domuz gibi karasal hayvanlardan izole edilen *L. garvieae* suşlarının bakteriyofaj duyarlılıkları ve suşlar arasındaki epidemiyolojik ilişki PFGE metodu ile araştırılmıştır. Aynı zamanda sarıkuyruk ve farelerin tüm bu suşlara maruz bırakılması (i.p.) şeklinde deneysel enfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Sarıkuyruk balıklarından izole edilen suşun aynı türde güçlü, alabalıklardan izole suşun ise sarıkuyruklarda zayıf patojeniteye sahip oldukları sonucuna varılmıştır. Karasal hayvanlardan elde edilen suşların ise balıklarda patojen olmadıkları anlaşılmıştır. Aynı çalışmada, sadece

sarıkuyruklardan izole edilen suş faj duyarlılığına sahipken, PFGE sonucuna göre; balıklardan izole suşlar epidemiyolojik olarak birbirleri ile benzer fakat karasal hayvanlardan izole suşlar ile ilgisiz bulunmuşlardır (Kawanishi *et al.* 2006).

Avcı *et al.* (2013) yaptıkları bir çalışmada, *L. garvieae* ile deneysel yolla enfekte ettikleri Gökkuşığı alabalıklarındaki histopatolojik ve immunohistokimyasal bulguları karşılaştırmışlardır. Genç ve erişkin olmak üzere 2 grup balığın kullanıldığı çalışmada balıklar i.p. ve i.m. yol ile enfekte edilmişler deney sonunda ölen balıklar mortalite, klinik bulgular ve patolojik olarak incelenmiştir. Tüm doku örnekleri immunohistokimyasal açıdan incelenmek üzere avidin-biotin-peroxidaz ile boyanmış ayrıca *L. garvieae* antijenlerini tespit etmek amacı ile poliklonal antikör ile immunoflorasan tekniğinden yararlanılmıştır. Çalışma sonucunda; tespit edilen *L. garvieae* antijenlerinin organ ve dokulardaki dağılımında ve lezyonların gelişiminde önemli korelasyon olduğu ortaya koyulmuştur.

Öğüt and Altuntaş (2011) ülkemizde yaptıkları bir çalışmada, 3 farklı alabalık türü olan Karadeniz, Gökkuşığı ve kahverengi alabalığının Viral hemorrajik septisemi virüsü (VHSV)'na karşı duyarlılık farkını ortaya koymuşlardır. Karadeniz'de doğal mezgitlerden (*Merlangius merlangus*) izole edilen genotip Ie virüs izolatının kullanıldığı çalışmada 0,1-0,2 g arasındaki alabalık larvaları immersiyon=daldırma (i.m.) yol ile enfekte edilmişlerdir. Gökkuşığı alabalıkları ile kahverengi alabalıklar arasındaki ölüm oranının eşit bulunduğu çalışmada, en duyarlı tür olarak Karadeniz alabalıkları tespit edilmiştir.

Doğal ve kültürü yapılan kalkan balıklarında pek çok bakteri (*Aeromonas salmonicidae*, *Vibrio anguillarum*), virüs (VHSV) ve paraziter (*Scuticociliate* spp.) hastalık bildirilmiştir (Munro *et al.* 1995; Iglesias *et al.* 2001; Ewart *et al.* 2008; Işıdan and Bolat 2011). Fakat *L. garvieae*'ya karşı duyarlılığı konusunda yurtiçi ve dışından literatür bilgisine rastlanılmamıştır.

Leiro *et al.* (1996), İspanya’da kalkanlarda (*Scophthalmus maximus*) ciddi mortaliteye sebep olan ve *L. garvieae* ile yakın özelliklere sahip olan gram(+) *Enterococcus spp.*’den söz etmiştir. Bu bakteri ve *L. garvieae*’nin i.p. yolla kalkan balıklarına verilmesi ile humoral immun yanıt (B hücrelerinin antijenle uyarılıp antikor üretimi) oluşturulmuş ve bu spesifik antikor düzeyini belirlemek için enzim-linked immunsorbent assay (ELISA) tekniği geliştirmişlerdir. İmmunizasyondan 60 gün sonra *Enterococcus spp.* ile enfekte kalkanlarda yüksek düzey antikor üretimi tespit edilirken *L. garvieae* ile enfekte balıklarda çok düşük antikor düzeyi bildirilmiştir.

Işidan (2010), Karadeniz sahili boyunca, içlerinde kalkan, levrek, Gökkuşığı ve Karadeniz alabalığı gibi türlerinde bulunduğu 12 doğal ve kültür balığı türlerinde VHSV’nin izolasyonu ve izole edilen virüslerin potojenitelerini araştırmaya yönelik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. VHSV’nin varlığının, tersine transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile belirlendiği çalışmada, sadece kalkan balıklarından virüs izole edilebilmiştir. Elde edilen virüs izolatları ile gerçekleştirilen patojenite çalışmalarında ise izolatların kalkanlar için patojen, alabalıklar için ise patojen olmadıkları tespit edilmiştir. Bu çalışmanın verileri, bu hastalığın Karadeniz’de son yıllarda kalkan balığı stoklarındaki azalmanın nedeni olabileceği fikrini akla getirmiştir.

Baeck *et al.* (2006), Kore’de bir başka yassı balık olan pisi balıklarında önemli ekonomik kayıplara yol açan streptokokal etkenleri araştırmışlardır. Hastalık belirtileri gösteren 22 balıktan yaptıkları örneklemelerin sonucunda, 18 balıktan *Streptococcus parauberis* izole ederken 3 balıktan *L. garvieae* bakterisini izole etmişlerdir.

Dünya genelinde deniz balıkçılığı üretiminde Atlantik salmon (*Salmo salar*)’u hakim olan türdür. Bunun dışında özellikle Avrupa ülkelerinde, çipura, levrek ve kalkan, Asya ülkelerinde sarıkuyruk, ayu (*Plecoglossus altivelis*) ve dil balığı (*Paralichthys olivaceus*) yaygın üretimi yapılan türlerdir (Toranzo *et al.* 2005). Aynı ekip araştırmalarında, deniz balığı sistemlerinde baskın olarak görülen ve ekonomik zarara yol açan temel bakteriyel balık hastalıklarından söz etmişlerdir. Araştırmaya göre; Vibriosis; salmon türleri, çipura, levrek, kalkan, kod (*Gadus morhua*) ve yılan balığında



(*Anguilla anguilla*), Photobacteriosis: çipura, levrek ve sarıkuyrukta, Furunculosis; kalkan ve salmon türlerinde, Lactococcosis; sarıkuyruk ve yılan balığında, Streptococcosis; sarıkuyruk, levrek, dil balığı, kalkan ve salmon türlerinde, Mycobacteriosis ise levrek, kalkan ve salmon türlerinden izole edilmiştir.

Akuakültür ülkemizde nispeten yeni sayılmaktadır. 1970'lerde Gökkuşığı alabalığı ile başlayan kültür balıkçılığı yaklaşık 10 yıl sonra levrek ve çipuranın da katılımı ile artarak devam etmektedir. İlk yıllarda doğal kaynaklardan yakalanarak üretime alınan levrekler, artık kuluçkahanelerde üretilerek yetiştirilmektedir (Çağırğan 2009).

Doğal ve kültürü yapılan levreklerde ülkemizden ya da yurt dışından Lactococcosis vakası bildirilmemiştir. Çağırğan ve Yüreklitürk (1996), Ege Bölgesi'nde kültürü yapılan çipura ve levreklerde görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisine yönelik çalışmalarında bazı temel hastalıklardan söz etmişlerdir. Vibriosis (*Vibrio anguillarum*) ve Pastörellosiz (*Pasteurella piscicida*)'in en sık rastlandığı araştırmada *Vibrio ordalii* ve *Photobacterium damsela* enfeksiyonları da nadiren görülmüştür. Diğer bir çalışmada ise aynı bölgede *Cryptobia* sp., *Trichodina* sp., *Cryptocaryon irritans*, *Diplectanum aequans*, *Meinertia oestroides* gibi parazitler levreklerden izole edilmiştir (Çağırğan ve Tokşen 1996).

Türkiye'de balık üretimi önemli derecede gelişmiştir. Ülkemiz akuakültür bakımından şimdiden Avrupa'nın ilk 5 ülkesi arasına girmiştir. Gökkuşığı alabalığı, levrek ve çipura üretimi en yoğun yapılan türler olup toplam balık üretiminin %95'ini kapsamaktadır (TUIK 2013). Artan üretim bazı sorunları da beraberinde getirmektedir. Balık hastalıkları, yoğun ilaç kullanımı ve bunlara bağlı ekonomik kayıplar en önemli yetiştiricilik sorunlarındanır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinin yapıldığı deniz, akarsu, göl ve gölet gibi alanların kirliliği, o alanlardaki bakteri yükü ve direnci ile genellikle doğru orantılıdır. Kıyılara yakın yerleşim alanlarında yoğun nüfus artışı, yoğun hayvancılık faaliyetlerinin yapıldığı alanlarda atıkların ve hastane atıklarının kanalizasyon aracılığı ile bu alanlara

bırakılması, dezenfeksiyon işlemlerinin yetersiz ya da hiç olmayışı sucul ortamların kirlenmesine neden olmaktadır. Bu durum insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Terzi 2013).

Bakteriyel etkenlere karşı bilinçsiz ve yoğun antibiyotik kullanımı, patojenlerin zamanla antibiyotiklere karşı direnç kazanmalarına neden olmakta ve antibiyotiklerle yapılan tedavi uygulamaları balık çiftliklerinde büyük ölçüde başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (Aoki 1992; Kayış *et al.* 2009). Karadeniz Bölgesi'ndeki balık çiftliklerinde, yakın zamanda kullanılmaya başlanan florfenikol dışında neredeyse hiçbir antibakteriyel ajandan istenilen verimin alınamaması konunun ciddiyetini gözler önüne sermektedir (kişisel gözlem). Bakterilerin kromozomal ve kromozom dışı yapılarında antibakteriyel dirençten sorumlu direnç genleri bulunmaktadır. Bu direnç genlerinin R-plazmiti, transpozon ve integronlar üzerinde bulunan gen kasetleri gibi hareketli (mobilize) unsurlar üzerinde bulunması, antibiyotik direncinin uygun koşullarda ve uygun taxonlar arasında rahatlıkla horizontal olarak nakline neden olmaktadır. Ayrıca kromozomal kaynaklı kodlanabilir yapıdaki direnç genleri jenerasyonlar arası (vertikal) nakledilebilmektedir. Sonuçta çevresel ve patojen bakteriler bir ya da daha fazla (çoklu bakteriyel direnç=multidrug resistant bakteri) antibiyotiğe dirençli olabilirler (Hall and Collis 1995; Carottoli 2001; Schwartz *et al.* 2003; Kubilay vd 2005).

Kawanishi *et al.* (2005) Japonya'da yaptıkları bir çalışmada, yoğun kültürü yapılan *Seriola* cinsine ait balıklardan izole ettikleri *L. garvieae* bakterisinin genetik çeşitliliğini ve mevcut antibakteriyel duyarlılığını araştırmışlardır. 170 suş için 14 farklı antibakteriyel ajanın minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Suşların yaklaşık yarısı eritromisin, linkomisin ve oksitetrasikline karşı dirençli bulunmuş ve bu dirençli suşların tamamının *erm(B)* ve *tet(S)* direnç genlerine sahip oldukları saptanmıştır. Çalışmada ayrıca *Seriola* cinsi balıklardan son 15 yılda yaygın olarak izole edilen *L. garvieae*'nin bu üç antibiyotiğe dirençli olduğu sonucuna varılmıştır.

Walther *et al.* (2008) yaptıkları bir çalışmada sığır sütünden izole ettikleri 31 *L. garvieae* ve 41 *L. lactis* suşunun 17 antibiyotiğe karşı antibiyotik duyarlılıklarını test etmişlerdir. Çalışmada ayrıca dirençli suşlardaki direnç genlerinin varlığı microarray tekniği ile ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Microarray sonucuna göre tespit edilen direnç genleri ayrıca PZR ile amplifiye edilmiş, nükleotit sekansları belirlenmiş ve sonuçlar aksesyon numaraları ile beraber genbank da depolanmıştır. Suşların çoğunluğu, tetrasiklin, klindamisin, eritromisin, streptomisin ve nitrofurantoin antibiyotiklerine karşı dirençli bulunmuşlardır. Tetrasiklin dirençli *Lactococcus* suşlarında *tet(M)* ve *tet(S)*, eritromisin ve klindamisin dirençli suşlarda ise *erm(B)* direnç genleri tespit edilmiştir. Ayrıca normalde *L. lactis* suşlarında bulunan multidrug transporter (*mdtA*) geni ilk defa *L. garvieae* suşlarında tespit edilmiştir.

Aquilanti *et al.* (2007) yaptıkları bir çalışmada tavuk ve domuz eti ürünlerinden izole ettikleri 123 antibiyotik dirençli laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve direnç genleri tespitini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma ile gıda zincirine bulaşan antibiyotik dirençli apatojen mikrofloranın antibiyotik direnç genlerinin oluşumunda ve yayılımında ki rolü araştırılmıştır. Baskın tür olarak *Lactococcus garvieae*'nin izole edildiği çiğ ve işlenmiş domuz ve tavuk eti ürünlerinden diğer izole edilen bakteriler *L. lactis ssp.*, *Lactobacillus plantarum*, *L. salivarius*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* ve *L. brevis* olmuştur. *Tet(M)*, *tet(O)*, *tet(K)*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *aac(6')* *Ie aph (2) Ia*, *mecA* ve *blaZ* direnç genlerinden bir ya da daha fazlasının PZR ile izole edildiği suşlarda *tet(M)* ve *erm(B)* genleri en sık tespit edilen direnç genlerindedir. Ayrıca 18 tet (+) suş ile çoklu antibakteriyel direncin değerlendirildiği çalışmada *tet(M) + erm(B)* ve *tet(K) + erm(B)* en sık tespit edilen direnç geni modeli olarak bulunmuştur.

Sucul ortam direnç genlerinin yayılımı için çok önemlidir. Antibiyotik dirençli bakteriler sucul çevreye insan ve hayvansal kaynaklardan bulaşır. Bu bakteriler beraberinde direnç genlerini sucul ortamda bulunan ve insan ve hayvanlar için patojen ya da apatojen olan mikroorganizmalar arasında yayarlar. Bunun dışında endüstriyel kaynaklı pek çok antibiyotik sucul çevrede bulunmak suretiyle bu ekosistemi değiştirebilir. Antibiyotik ve dirençli bakteri yükünün sucul ortamda azaltılması için

özellikle; hastane atıklarının ve yoğun yetiştiriciliğin yapıldığı çiftliklerde ki atık suların idaresi ve dezenfeksiyon işlemlerinin optimize edilmesi gibi konuların üzerinde durulmuştur (Baquero *et al.* 2008).

Tetrasiklin direnci, sucul ortamda antibiyotik direnç genlerinin tespitine yönelik çalışmalarda sıklıkla belirleyici olmuştur. Sandallı *et al.* (2010) Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki nehirlerden izole ettikleri *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde tetrasiklin direnç genlerinin (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* ve *tetE*) görülme sıklığını tespit etmeye çalışmışlardır. 52 tetrasiklin dirençli bakterinin 8'inde *tetA*, 10'unda *tetB* ve 1'inde ise her iki direnç genini tespit etmişlerdir. *tetC*, *tetD* ve *tetE* direnç genleri ise tespit edilememiştir. Araştırmacılar nehir sularının insan sağlığını risk altında tutan antibiyotik direnç genleri için bir rezervuar olabileceğini bildirmişlerdir.

Kim *et al.* (2004), Kore ve Japonya'da deniz suyu ve balıklardan izole edilen 151 tetrasiklin dirençli bakteri suşlarında, bakteri ribozomal koruma proteinlerini (RPP) kodlayan tetrasiklin direnç genlerinin varlığını araştırmışlardır. Çoğunluğu *Vibrio sp.*, *Lactococcus garvieae*, *Photobacterium damsela* ve isimlendirilmemiş gram (+) bakterilerden oluşan suşların önemli bir kısmında *tet(M)* ve *tet(S)* direnç genleri tespit edilebilmiştir. Çalışma sonunda balıklar ve deniz ortamının tetrasiklin direnç genlerinin yayılımında önemli bir rezervuar olduklarını bildirilmiştir.

*Escherichia coli* bakteriyolojik su kalitesinin belirlenmesinde indikatör olarak kullanılan koliform grubu bakteridir. *E. coli* suşları, antibiyotik direncinin fenotipik ve genotipik tespiti için yapılan çalışmalarda sıklıkla tercih edilmiştir. Saenz *et al.* (2004) yaptıkları bir çalışmada, hayvansal gıdalardan, hayvanlardan ve insanlardan izole edilen çoklu dirençli (multiple antibiyotik resistant) 17 *E. coli* suşunun antibiyotik direnç genlerini tespit etmeye çalışmışlardır. Fenotipik olarak; ampisilin, nalidiksik asit, kloramfenikol, streptomisin, tetrasiklin ve rifampine karşı dirençli bulunan suşlarda geniş antibiyotik direnç geni çeşitliliği tespit edilmiştir. PZR, PZR-RFLP ve sekans metotları ile tetrasiklin, aminoglikozit ve  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere ait direnç genleri tespit edilmiştir. Ayrıca suşların çoğunda 1. ve 2. Sınıf integronlar, amino asit

değişimleri ve nokta mutasyonlar tespit edilmiştir. Çalışmanın bulguları, “normal florada bulunabilen bu suşlarda tespit edilen geniş sayıdaki direnç genleri, antibiyotik direnç genlerinin farklı ekosistemlerdeki bakteriler arasında yayılması için anahtar rol oynayabilir” görüşünü geçerli kılmıştır.

Sutcliffe *et al.* (1996) yaptıkları bir çalışmada bakterilerde eritromisin direncine sebep olan 3 mekanizmadan söz etmişlerdir (efflux pump, eritromisin metilaz ve inaktive edici enzimler). *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* ve *Escherichia coli* klinik ve referans suşlarında eritromisin direncine yol açan direnç genlerini araştırmışlardır. Özel PZR primerleri ile farklı direnç mekanizmalarının çoklu (multiplex)-PZR tekniği ile ayırt edildiği çalışmada, bakteri suşlarının çoğunda birden fazla eritromisin direnç geni saptanmıştır. Ayrıca bu çalışma ile çoklu PZR tekniğinin direnç genlerinin saptanmasında kullanışlı bir metot olduğu, hibridizasyon ve sekans çalışmaları ile birleştirildiğinde daha güçlü olabileceği sonucuna varılmıştır.

Schmidt *et al.* (2001) gerçekleştirdikleri bir diğer çalışmada ise Kuzey Avrupa’dan izole ettikleri balık patojeni *Aeromonas salmonicida*’da bulunan direnç plazmiti (R- plazmiti) ile ilişkili 1. Sınıf integronları incelemişlerdir. Çalışmada antibiyotik dirençli 40 izolattan 26’sında integronlar, ayrıca 3 farklı *dhfrI* ve 1 *ant(3)* direnç geni izole etmişlerdir. Çalışmada; plazmidler ile ilişkili integronların kodladığı antibiyotik direnç genlerinin, antimikrobiyal direncin türler içerisinde horizontal olarak yayılmasına olanak sağladığı sonucuna ulaşılmıştır.

Tetrasiklinleri kodlayan direnç genleri bakteri türleri arasında oldukça yaygındır. Özellikle birden fazla antibiyotiğe direnç gösteren gram (-) ve (+) karakterli birçok bakteri türünde tespit edilmiştir (Levy *et al.* 1999). Ng *et al.* (2001) gerçekleştirdikleri bir çalışmada 14 farklı tetrasiklin direnç genini tespit etmeye çalışmışlardır. Kombine edilen spesifik primerler yardımı ile bakterilerde yaygın şekilde bulunan *tet(A)*, *tet®*, *tet(G)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tetA(P)*, *tet(Q)*, *tet(X)*, *tet(B)*, *tet(C)* ve *tet(D)* direnç genleri çoklu ve tekli (uniplex)-PZR metodu ile tespit edilmiştir. Metisilin

dirençli 19 *Staphylococcus aureus* ve 25 *Salmonella typhimurium* klinik suşlarının çalışıldığı denemede direnç genlerinin çoğunluğu tespit edilebilmiştir. İki metot karşılaştırıldığında çoklu-PZR'nin diğerine göre özellikle geniş sayıdaki suşların analizinde işgücü ve maliyet açısından daha avantajlı olduğu, salgın hastalıklarda yapılacak incelemelerde ilave bir genetik metotla çok daha kullanışlı olacağı vurgulanmıştır.

Boran *et al.* (2013) yaptıkları bir çalışmada, dünyada ilk kez kafes kültürüne alınan istavritlerin (*Trachurus mediterraneus*) periyodik muayeneleri esnasında izole ettikleri bakterilerin antibiyotik direnç profili analizlerini gerçekleştirmişlerdir. *Aeromonas hydrophila*, *Vibria spp.*, *Chryseobacterium indologenes*, *Bulkholderia cepacia* ve *Photobacterium damsela damsela* gibi gram (-) karakterli deniz bakterilerinin, disk difüzyon metoduna göre %50'den fazlasının streptomisin, sulfametoksazol, gentamisin, ve ampisilin antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları, florfenikol ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı ise çok duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca direnç genlerinin yayılımının anlaşılması için; tetrasiklin, sulfanamid,  $\beta$ -laktam, aminoglikozid ve kloramfenikol antibiyotiklerini kodlayan direnç genleri PZR metodu ile tespit edilmeye çalışılmıştır. B-laktam (*bla<sub>TEM-OT3-4</sub>*) ve tetrasiklin (*tetB*) direnç genleri çalışmada en yaygın tespit edilen genlerdir.

Van *et al.* (2008) yaptıkları bir çalışmada Vietnam'da marketlerde satılan çiğ et, kümes hayvanları, kabuklu deniz ürünleri ve tavuk dışkısından izole edilen *E. coli* suşlarının mevcut antibiyotik direnç ve virülans genlerini araştırmışlardır. Tüm örneklerden toplanan 99 *E. coli* suşlarının 15 antibiyotiğe karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. Suşların büyük çoğunluğu 1 ya da daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli, ayrıca çoklu dirençli suşların en az 3 farklı sınıf antibiyotiğe dirençli olduğu saptanmıştır. En yüksek oranda direnç tetrasiklin ve sulfafurazole karşı belirlenmiştir. Antibiyograma göre çoklu dirence sahip olarak belirlenen 38 *E. coli* suşunun ayrıca antibiyotik direnç ve virülans genleri PZR metodu ile araştırılmıştır. B-laktam (*TEM*) ve tetrasiklin (*tetA*, *tetB*) direnç genlerinin en yoğun tespit edildiği çalışmada ayrıca streptomisin (*aadA*), kloramfenikol (*cmlA*) ve sulfanamid (*sulI*) direnç genleri tespit edilmiştir. Ayrıca tüm suşlar adhezin,

toksin, kapsül sentez, invaziv ve siderofores grubu 58 farklı virülans gen ile test edilmişlerdir. Bu çalışma çiğ gıdalarda bulunan *E. coli* suşlarının direnç ve virülans genleri için önemli bir rezervuar olduklarını ispatlamıştır.

Kav and Erganiş (2008) yaptıkları çalışmada, Konya yöresindeki Gökkuşuğu alabalığı çiftliklerinden izole ettikleri *L. garvieae* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını tespit ederek hastalığa karşı en etkili antibiyotik tedavisini belirlemişlerdir. 2002 ve 2004 yılları arasında 6 çiftlikten örnekledikleri 180 hasta balıktan izole edilen suşlara disk difüzyon metodu ile antibiyogram testi uygulamışlardır. Tüm bakteri suşları, penisilin G, amoksisilin, ampisilin+sulbaktam, vankomisin, siprofloksasin, kloramfenikol, florfenikol, eritromisin, oksitetrasiklin, sefoperazon ve novobiosine karşı duyarlı bulunmuşlardır. Sonuç olarak  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin (penisilin G, ampisilin, amoksisilin) ve eritromisinin bu hastalığın tedavisinde en uygun bileşikler olduğunu bildirmişlerdir.

Elliott and Facklam (1996) yaptıkları bir çalışmada *L. garvieae*, *L. lactis* ve diğer *Lactococcus* türlerinin antibiyotik duyarlılıklarını ve MİK değerlerini araştırmışlardır. Suşların birçok antibiyotiğe karşı benzer hassasiyet gösterdikleri bu çalışmanın en önemli çıktısı, *L. garvieae*'nin klindamisin direnci olmuştur. Çalışma sonucuna göre; *L. garvieae* klindamisine dirençli ve MİK değeri yüksek bulunmuştur. Bu özellik, fenotipik olarak birbirine çok benzeyen ve ayırt edilemeyen bu 2 suşun ayırımında sonraki yıllarda pratik olarak kullanılabilmiştir.

Kubilay vd (2005) Türkiye'de yaptıkları bir çalışmada, 9 farklı *L. garvieae* suşunun antibiyotik duyarlılıklarını incelemişlerdir. Antibiyotik duyarlılığının disk difüzyon tekniği ve epsilometrik (E test) sistemi ile ortaya koyulduğu çalışmada ayrıca E testi ile de eritromisin antibiyotiğine ait MIC değerleri incelenmiştir. Disk difüzyon ve E testi sistemine göre suşlar amoksisilin, ampisilin, enrofloksasin, vankomisin, tetrasiklin, eritromisin, nitrofurantoin, sephalotin, sefoperazon, kloramfenikol ve spektinomisin antibiyotiklerine duyarlı, kanamisin sefuroksim, linkomisin, penisilin, siprofloksasin, klindamisin, sulfametoksazol+trimetoprim, gentamisin, kolistin ve okzolinik asit

antibiyotiklerine karşı ise dirençli bulunmuşlardır. Ayrıca E testine göre, *L. garvieae* suşlarının eritromisine karşı duyarlı oldukları tespit edilip MİK değerleri 0,032-0,125 µg/mL arasında tespit edilmiştir.

Bir diğer çalışmada İran'da bulunan Gökkuşığı alabalığı çiftliklerinden izole edilen *L. garvieae* suşlarının antibiyotik dirençleri fenotipik olarak incelenmiştir. 10 farklı çiftlikten ve 250 şüpheli balıktan izole edilen bakterilerin 52'si klasik biyokimyasal testler ve PZR yöntemi ile tanımlanmıştır. Genel olarak antibiyotik direncinin yüksek bulunduğu çalışmada suşlar; gentamisin, klindamisin, linkomisin, siprofloksasin, bazitrasin, penisilin, doksasiklin oksitetrasiklin ve sefotaksime karşı yüksek oranda dirençli, florfenikol ve eritromisine karşı ise duyarlı bulunmuştur. Ayrıca bölgede aşırı antibiyotik kullanıldığı ve çiftçilerin çoğunun *Lactococcus* salgınında kullandıkları antibiyotiklerin işe yaramadığı bilgisini verdikleri çalışmada, antibiyotik dirençli bakterilerin yayılımının engellenmesi için kullanımlarının kısıtlanması gerektiği vurgulanmaktadır (Raissy and Ansari 2011).

Durmaz vd (2012) Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Gökkuşığı alabalığı işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* etkeninin epidemiyolojisini araştırmışlardır. Çalışmada ayrıca izole ettikleri bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarını araştırmışlardır. Araştırma bulguları olarak bakterilerin neomisin, eritromisin, ampisilin ve kanamisin antibiyotiklerine karşı duyarlı, oksitetrasiklin ve enrofloksasine karşı ise duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Schmidt *et al.* (2000) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, Danimarka'da 4 farklı balık çiftliğinden, sediment ve sudan izole edilen önemli sucul patojenlerin antibiyotik duyarlılıklarını araştırmışlardır. Bir yıllık araştırma sonucu izole ettikleri *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri*, ve hareketli *Aeromonas* suşlarının ülkede en yoğun kullanılan 5 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıklarını tespit etmeye çalıştıkları çalışmada, *Flavobacterium psychrophilum* suşlarının duyarlılıklarında önemli derecede azalma tespit edilirken, *Yersinia ruckeri* suşlarının ise çoğu antibakteriyel ajana karşı duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.



Antibiyotik kullanımının tamamen engellenmesi durumunda antimikrobiyal direncin olup olmayacağı kesin olarak bilinmemektedir. Bununla beraber direnç plazmiti taşımak enerji gerektirdiği için bakteriler ortamda antibiyotik bulunmadığında ya da besin eksikliğinin görüldüğü ortamda plazmitini kaybedeceği bildirilmiştir (Griffits *et al.* 1990). Korun *et al.* (2013) Ege Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılan levreklerden izole edilen *Vibrio alginolyticus* suşlarının antibiyotik direnci ve plazmit profillerini araştırmışlardır. İki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen duyarlılık testlerinin sonuçları farklı olmakla beraber, suşlar genel olarak kanamisine duyarlı ampisilin, bazitrasin ve streptomisine karşı dirençli bulunmuştur. Ayrıca suşların her birinin 24-58kb büyüklüğünde 2 ve 3'er adet direnç plazmiti taşıdıkları tespit edilmiştir.

Maki *et al.* (2008), 1999-2006 yılları arasında Japonya'da balıklardan izole ettikleri 146 *L. garvieae* suşuna karşı 15 farklı antibiyotiğin MİK değerlerini belirlemişlerdir. Test edilen bakteri suşlarının 46'sı eritromisin, linkomisin ve tetrasikline karşı yüksek düzeyde dirençli bulunmuştur. Bu suşların 12'sinin transfer olabilir direnç plazmiti taşıdıkları konjugasyon denemeleri ve southern hibridizasyon metotları ile ortaya konmuştur. Bu çalışma ile araştırmacılar, eritromisin, linkomisin ve tetrasiklini kodlayan R-plazmitlerinin, bakterinin izolasyon yılına ve yerine bakılmaksızın geniş yayılım gösterdikleri ve korunduklarını ortaya çıkarmışlardır.

Guglielmetti *et al.* (2009) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, balık sindirim sisteminden elde edilen *L. lactis* bakterisinin barındırdığı tetrasiklin (*tetS*) direnç geninin balık patojeni *L. garvieae*'den bir gıda patojeni olan *Listeria monocytogenes*'e transferini araştırmışlardır. Çalışmada önce tetrasiklin direnç genini taşıyan plazmit elektroporasyon yolu ile *L. garvieae*'ye transfer edilmiş, sonrasında bu gen transformant bakteriden konjugasyon ile 3 farklı *L. monocytogenes* bakterisine aktarılmıştır. Balık patojeninde bulunan antibiyotik direnç plazmitinin gıda patojenine taşınabildiğini kanıtlayan bu ilk rapor, balık sindirim sistemi bakterisinde bulunan antibiyotik direnç genlerinin balık ve insan patojenlerine yayılımı açısından risk taşıdıklarını ispatlamıştır.

*Streptococcus* cinsine ait bakterilerde plazmit varlığı ilk defa 1972'de rapor edilmiştir (Courvalin *et al.* 1972). Bu grup bakterilerden plazmit izolasyonunun güçlüğünden, yüksek devirli santrifüj gereksinimi, zaman ve masraflı oluşundan söz edilmiştir. Ayrıca kromozomal DNA'nın yeterince uzaklaştırılmayışı, RNA kalıntısı ve yetersiz hücre lizizi önemli problemlerdendir. Leblanc and Lee (1979) geliştirdikleri protokol ile *Streptococcus* cinsi bakterilerden kısa sürede ve ekonomik plazmit izolasyonunu geliştirmişler ve bu yöntemi rutin hale getirmişlerdir. Günümüzde ise bu çalışma genelde ticari kitler aracılığı ile yapılmakta olup bazı patojenler için geleneksel metotlarla birleştirilmektedir.

Yu *et al.* (2012) yaptıkları bir çalışmada antibiyotik direnç plazmiti ile balıklardaki virulanslık arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya çalışmışlardır. Pisi balıklarından izole edilen *Edwardsiella tarda* bakteri suşunun antibiyotik direnci ve plazmit varlığını ortaya koydukları çalışmalarında 70 kb büyüklüğünde plazmite sahip bakteri suşu ile plazmit taşımayan bakteri suşunu i.p. yolla pisi balıklarına eşit miktarda vererek hayatta kalma oranlarını belirlemişlerdir. Çalışma sonunda plazmit taşıyan *E. tarda* suşu ile enfekte balıklardaki yaşam oranının diğerine göre çok daha düşük olduğu görülmüştür.

Terzi (2013) Rize ve Trabzon illerinde bulunan bazı alabalık işletmelerinde su, sediment ve balıklardan izole edilen bakterilerde antibiyotik direnci ve direnç genlerinin varlığını araştırmışlardır. Balıklardan izole edilen bakterilerde en yüksek direnç sulfametaksazol, imipenem ve aztreonema karşı bulunurken, *ampC*, *cmlA*, *bla<sub>TEM</sub>*, *tetD*, *bla<sub>CTX-M</sub>* en yoğun tespit edilen direnç genleri olmuştur. Ayrıca su ve sedimentten izole edilen bakterilerin %30, balık patojenlerinin ise %12'sinden 2-10kb molekül büyüklüğünde plazmit tespit edilmiştir.

Rhodes *et al.* (2000) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, hastane ve sucül ortamlardan izole edilen *Aeromonas* izolatları arasındaki oksitetrasiklin dirençli plazmitlerin dağılımını araştırmışlardır. *TetA*, *tetB* ve *tetG* direnç belirleyicilerinin tespit edilmeye çalışıldığı çalışmada sadece *tetA* direnç geni plazmitler üzerinde tespit edilebilmiştir.

Ayrıca *EcoRI* kesici enzimi ile muamele gören plazmitler 5,5kb boyutunda birbirlerine benzer fragment desenleri oluşturmuştur.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin kaynağı

Deneysel enfeksiyonlarda kullanılan bakteri suşlarından biri (Lgper) Gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliği yapılan kafes işletmelerinin birinden (Perşembe/Ordu) izole edilmiştir (Türe vd 2012). Diğeri ise 1974 yılında Japonya’da sarıkuyruk balıklarından izole edilen ATCC 49156 referans suşudur (Ksuda *et al.* 1991). ATCC 49156 suşu KTÜ, Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Tüm çalışmalarda kullanılan toplam 30 *L. garvieae* suşunun isim, kaynak ve orijinleri Çizelge 3.1’de belirtilmiştir. Tüm suşlar çalışma öncesi -80°C’de %15 gliserol içeren NB (Merck) içerisinde saklanmaktadır.

##### 3.1.2. Çalışmada kullanılan balıkların kaynağı

Enfeksiyon denemelerinde kullanılan 720 adet Gökkuşığı alabalığı ve 240 adet Karadeniz alabalığı iki farklı özel işletmeden (Trabzon) temin edilmiştir. Yine denemelerde kullanılan 240 adet kalkan balığı ve 360 adet deniz levreği, Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (SUMAE) kuluçkahanesinden temin edilmiştir. Alabalıkların tümü aynı döneme ait (ortalama 9 aylık) olup ortalama Gökkuşığı alabalıkları 8,64±0.073cm boy ve 7,39±0,231gr ağırlığında, Karadeniz alabalıkları ise 12,47±0,278cm boy ve 19,45±1,453gr ağırlığındadır (ortalama±standart hata). Karadeniz alabalıkları ile karşılaştırılması yapılan ikinci grup Gökkuşığı alabalıkları (G<sub>2</sub>) ise 12,45±0,195cm boy ve 24,17±1,162gr ağırlığındadır. Kalkan balıkları ise 220 günlük olup 10,55±0,09cm boy ve 17,21±0,49gr ağırlığındadır. Levrekler ile yapılan denemelerde ise iki farklı boy balık kullanılmış olup, 1. Grup; 10,88±0,109cm boy ve 13,14±0,364gr ağırlığında, 2. Grup ise; 8,49±0,143cm boy ve

6,63±0,316gr ağırlığındadır. Denemelerde kullanılan balıkların sağlık kontrolleri yapılmış olup, deney öncesinde balıklarda toplu ölüm, anomali veya Lactococcosis'e karşı aşılama gibi olumsuzluklar kaydedilmemiştir.

**Çizelge 3.1.** *Lactococcus garvieae* suşları ve menşeleri

	<b>İzolat</b>	<b>Kaynak</b>	<b>Orijin</b>	<b>Yıl</b>
<b>1</b>	673-5	Gökkuşığı	Gümüşhane	2008
<b>2</b>	K9	Gökkuşığı	Gümüşhane	2009
<b>3</b>	Ard 30	Gökkuşığı	Rize	2007
<b>4</b>	Sider17	Gökkuşığı	Rize	2008
<b>5</b>	İyi Şfk.	Gökkuşığı	Rize	2009
<b>6</b>	225-1	Gökkuşığı	Artvin	2008
<b>7</b>	Şer114	Gökkuşığı	Trabzon	2009
<b>8</b>	Trb.	Gökkuşığı	Trabzon	2011
<b>9</b>	235-16	Gökkuşığı	İzmir	2009
<b>10</b>	Muğ 1	Gökkuşığı	Muğla	2002
<b>11</b>	Muğ 2	Gökkuşığı	Muğla	2002
<b>12</b>	Lgper	Gökkuşığı	Ordu	2011
<b>13</b>	M 300	Keçi peyniri	İtalya	2001
<b>14</b>	G-27	Sığır sütü	İtalya	2003
<b>15</b>	PP6O	Gökkuşığı	İtalya	2004
<b>16</b>	2398	Gökkuşığı	Fransa	1998
<b>17</b>	1684	Gökkuşığı	İspanya	1997
<b>18</b>	164 A/03	Gökkuşığı	İspanya	2000
<b>19</b>	532	Gökkuşığı	İspanya	2001
<b>20</b>	ATCC 49156	Sarıkuyruk	Japonya	1974
<b>21</b>	Akoluk	Gökkuşığı	Trabzon	2012
<b>22</b>	399-18	Gökkuşığı	Artvin	2008
<b>23</b>	Ö. Eskit	Gökkuşığı	Rize	2008
<b>24</b>	671-14	Gökkuşığı	Gümüşhane	2008
<b>25</b>	Muğ 3	Gökkuşığı	Muğla	2003
<b>26</b>	A-58	Gökkuşığı	İtalya	2002
<b>27</b>	FTPI	Gökkuşığı	İspanya	2001
<b>28</b>	498	Gökkuşığı	İspanya	2001
<b>29</b>	8053	Gökkuşığı	İspanya	2000
<b>30</b>	L. lactis	Sığır sütü	Akdeniz	2005

### 3.1.3. Deneme tanklarının hazırlanması

Tüm deneysel enfeksiyonlar, SUMAE'ye ait kalkan üretim tesisinde, yetiştiricilik ünitelerinden izole edilmiş bir ortamda 120 litrelik (200 litre kapasiteli) 52 ayrı deneme tankında gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kullanılacak tüm balıklar 20 gün süreyle adaptasyona alınmıştır. Adaptasyon döneminde balıklarda hiç ölüm olmazken, bu dönemin sonunda yapılan bakteriyel ve parazit muayenede herhangi bir patojene rastlanılmamıştır. Tanklara gelen su ozon ünitesinden geçmekte ve çıkış suyuda hipoklorid ünitesinden geçtikten sonra denize verilmektedir. Rasgele seçilen balıklardan her tanka, her bir deneme için ilgili balık türünden 30'ar adet yerleştirilerek toplam 1560 adet balık kullanılmıştır (Şekil 3.1). Yapılan ölçümlerde su sıcaklığı, oksijen, pH, tankın günlük su değişimi ve tuzluluk (refraktometre ile) miktarları denemenin türüne göre Çizelge 3.2'de belirtilmiştir. Tanklara gelen su miktarı ortalama tüm denemeler için 1lt/dakikadır. Deneme süresince tüm balıklar, kendi türüne ait ticari yemler ile günde 2 kez yemlenmişlerdir.

**Çizelge 3.2.** Denemelerin yapıldığı tanklardaki su parametreleri

Balık türü	Sıcaklık ( $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ )	Oksijen mg/l	Ph	Su değişimi/gün	Tuzluluk /1000
Gökkuşığı alabalığı	16	7,3	8,2	12	18
Kalkan	14	7,9	8,1	12	18
Karadeniz alabalığı	12	8,4	8,2	12	18
Gökkuşığı alabalığı (G-2)	12	8,4	8,2	12	18
Deniz levreği	17 ve 24	8,1	8,2	12	18



**Şekil 3.1.** Deneme ünitesinin görünümü

A: Gökkuşuğu alabalığı, B: Karadeniz alabalığı, C: kalkan balığı, D: levrek, E ve F: denemelerin yapıldığı tanklar

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Deneysel enfeksiyonlar

#### 3.2.1.a. Enfeksiyon protokolü

Deneysel enfeksiyonların öncesinde, kullanılacak bakteri suşlarının (Lgper ve ATCC) ön kültürleri yapılarak saflıkları kontrol edilmiştir. Bu amaçla bakteriler; TSA (Merck) üzerine ekimleri yapılarak 30°C'de 48 saat inkubasyona bırakılarak kontrol edilmişlerdir. Ardından bu iki suşu enfeksiyon için aktif hale getirmek için, bir grup Gökkuşığı alabalığı bu bakteriler ile ayrı ayrı enfekte edilmiş ve bakteriler balıklardan geri izole edilmiştir.

Deneme öncesi, bakteri suşunun (Lgper) balık türlerindeki (Gökkuşığı alabalığı, kalkan ve levrek) letal doz 50 (LD50) değerleri Probit metodu ile hesaplanmıştır (Finney 1971). Bu amaçla her balık türü için üç ayrı tanka yerleştirilen 10'ar balığa üç farklı dozda (yaklaşık  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^5$  ve  $2 \times 10^6$ ) bakteri (Lgper suşu) intra peritoneal (i.p.) yolla verilerek yaklaşık değer bulunmuştur. Bu değer Gökkuşığı alabalıkları için 16°C'lik su sıcaklığında yaklaşık  $2 \times 10^5$  cfu balık<sup>-1</sup>/7 gün olarak belirlenmiştir. Kalkan ve levreklerde ölüm olmadığından LD50 değeri hesaplanamamıştır. Koloni oluşturan bakteri (kob=cfu); seri dilüsyonları yapılan bakterinin TSA üzerinde sayılması ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bakteri önce NB içerisinde 30°C'de 18 saat çalkalamalı inkubatörde (Sanyo) çoğaltılmıştır. Ardından santrifüj edilerek steril Posfat Buffer Saline (PBS) yardımı ile besi yerinden arındırılmıştır. PBS ile sulandırılan bakteri farklı dilüsyonlarda TSA üzerinde sayılarak cfu'su hesaplanmış ve enfeksiyon denemelerinde kullanılmıştır (Arda 1985; Altınok *et al.* 2001).

Tüm deneysel enfeksiyonlar, her birinde 30 balık olan 120 litrelik tanklarda, 2 enfeksiyon tipi (intra peritoneal ve immersiyon), 3 tekerrür ve birer kontrol olacak şekilde planlanmıştır. İ.p. enfeksiyon tipinde; balıklar anestezi ile (benzocain, 50ppm/1min) sakinleştirildikten sonra her bir balığın karın boşluğuna (anal yüzgecin ön

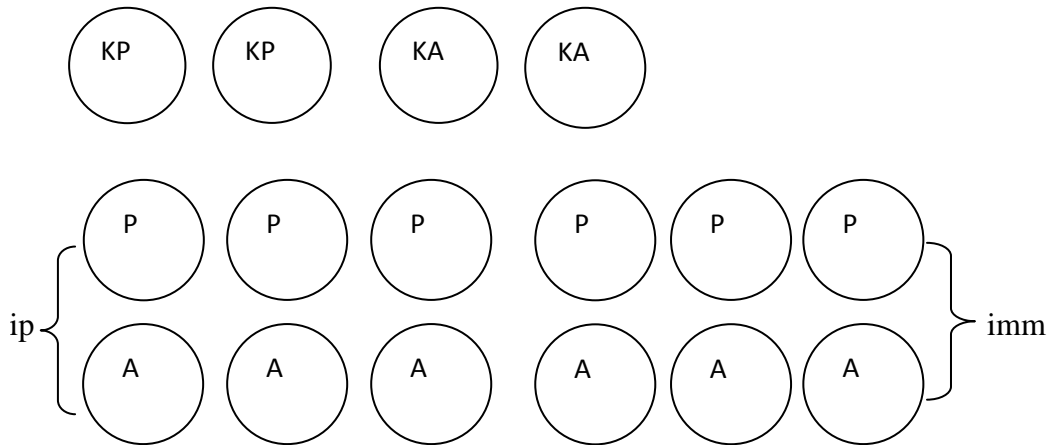


tarafından) 0,1 ml bakteri süspansiyonundan enjekte edilmiştir. Kontrol gruplarına aynı miktarda steril % 0,85 NaCl enjekte edilmiştir. İmmersiyon=daldırma (imm.) enfeksiyon tipinde ise; hava ile desteklenen tankların su akışı kesilip miktarı 50 litreye düşürüldükten sonra 100 ml'lik bakteri solüsyonu tanka boca edilmiş ve balıklar bu şekilde 5 saat bakteriye maruz bırakıldıktan sonra tekrar suları verilmiştir (King *et al.* 2001; Algöet *et al.* 2009; Işıdan 2010).

### 3.2.1.b. Gökkuşığı alabalıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon

Bu çalışma, bir Lactococcosis salgınından izole edilen LgPer isimli suşun virulanslığını belirlemek ve referans (ATCC 49156) suş ile aralarındaki patojenite farklılığını tespit etmek amacı ile yapılmıştır.

Deneysel enfeksiyon 30 gün süresince, 3x3x2 (2 bakteri suşu + kontrol x tekerrür x enfeksiyon tipi) şeklinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Deneyde balıklara, i.p. yol ile  $2 \times 10^7$  cfu/balık (0,1ml), imm. Yol ile ise  $4 \times 10^5$  cfu/ml su olacak şekilde *L. garvieae* ATCC 49156 ve yine aynı miktarda Lgper suşları verilmiştir.



**Şekil 3.2.** Gökkuşığı alabalıkları ile yapılan denemenin tank dizaynı  
K: kontrol, P: Lgper suşu, A: ATCC suşu, i.p: intra peritoneal, imm: immersiyon

### 3.2.1.c. İki tür arasındaki direnç farklılığının belirlenmesi

Bu çalışmanın amacı; son yıllarda yetiştiriciliği artan Karadeniz alabalıklarının Lactococcosis'e karşı duyarlılığını belirlemek ve Gökkuşuğu alabalıkları ile direnç farklılıklarını deneysel enfeksiyon düzeyinde ortaya koymaktır. Denemede smolt boy (salmon türü balıkların bazı fizyolojik değişimler geçirdiği, tatlı sulardan denize geçiş öncesi gelişim süreci dönemi) Karadeniz alası kullanılmıştır. Patojen olarak *L. garvieae* (ATCC 49156) referans suşu kullanılmıştır. Deneysel enfeksiyonlar, 2x3x2x2 (1 bakteri+kontrol x tekerrür x enfeksiyon tipi x balık türü) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel enfeksiyonda, i.p. enjeksiyon için  $5 \times 10^6$  cfu/balık (0,1ml), imm. Yoluyla enfeksiyon için ise  $4 \times 10^5$  cfu/ml su miktarında bakteri kullanılmıştır.

### 3.2.1.d. Kalkan balıklarında enfeksiyon denemesi

Bu çalışmanın amacı; daha önce bu türde izolasyonu bildirilmemiş olan *L. garvieae* enfeksiyonunun, kalkan balıklarındaki patojenite durumunu ortaya koymaktır. Bu amaçla *L. garvieae* (ATCC 49156) referans suşu ile deneysel enfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Deneysel enfeksiyon 30 gün boyunca ve 2x3x2 (1 bakteri+kontrol x tekerrür x enfeksiyon tipi) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel enfeksiyonda, i.p. enjeksiyon için  $2 \times 10^6$  cfu/balık (0,1ml), imm. Yoluyla enfeksiyon için ise  $8 \times 10^5$  cfu/ml su miktarında bakteri kullanılmıştır.

### 3.2.1.e. Levreklerde enfeksiyon denemesi

Bu deneme, alabalıklardan sonra ülkemizde en çok yetiştiriciliği yapılan deniz levreğinin *L. garvieae*'ye karşı duyarlılığının tespiti amacı ile yapılmıştır. Referans suşun kullanıldığı çalışma, iki farklı balık boyu ve iki farklı sıcaklıkta 30 gün süresince gerçekleştirilmiştir. Büyük boy balıkların i.p. ve imm., küçük boy balıkların ise sadece imm. Olarak enfekte edildiği çalışma, 15 gün  $17 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'de sürdürülürken sıcaklık  $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'ye çıkarılmış (ortalama günde  $1^\circ\text{C}$ ) ve 15 günde bu şekilde sürdürülmüştür. Deneysel enfeksiyonda, i.p. enjeksiyon için  $4,8 \times 10^6$  cfu/balık (0,1ml), imm. Yoluyla

gerçekleştirilen enfeksiyon denemesi için ise  $1,7 \times 10^5$  cfu/ml su miktarında bakteri kullanılmıştır.

### 3.2.1.f. Bakterinin geri izole edilmesi

Deneysel enfeksiyonların 2. gününden itibaren ölen balıklar tank numaralarına göre not edilmiş ve hastalıkla ilişkili mortalite (HİM)'yi hesaplamak için *L. garvieae* geri izole edilmeye çalışılmıştır. Balıkların ön böbrek ve karaciğerlerinden TSA'ya ekimleri yapılarak aerobik şartlarda 25-30°C'de 24-48 saat inkube edilmiştir. İnkubasyon sonunda üreme görülen besi yerlerindeki koloniler saflaştırılmış, saf kolonilerin gram boyama, hareket, oksidaz, katalaz, oksidasyon fermentasyon (O/F), glukoz, laktoz ve sukroz fermentasyonu ve Pyrrolidonyl Arylamidaz (PYR) enzim aktivitesi gibi temel özelliklerine bakılarak bakteri identifiye edilmeye çalışılmıştır. Oksidaz testi için (Microbiology Bactident Oxidase, Merck)'den yararlanılmıştır. TSA'da üreyen bakterilerden steril öze yardımı ile saf koloni alınarak serum fizyolojik ile ıslatılmış test kağıtlarına yayılmış ve 30 saniye içerisinde kağıt yüzeyinde renk değişimine bakılmıştır. Katalaz testi için 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 gerçekleştirilmiştir. Oksidasyon ve fermentasyon testleri O/F basal medyum (Becton Dickenson, BBG) talimatlarına uygun olarak hazırlanarak yapılmıştır. Sukroz, maltoz ve glukoz testleri TSI (Triple Sugar Iron Agar, Merck) üretici firma talimatına uygun olarak hazırlanmış ve gerçekleştirilmiştir. PYR aktivite testi ise kokların kendi aralarındaki ayrımı açısından önemli bir test olup hazır test kiti ile (Biochemical Identification System, oxoid) üretici firma talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır (Çağırğan 2004).

Kesin teşhis için ayrıca polimerize zincir reaksiyonu (PZR)'ndan yararlanılmıştır. Bu amaçla her tanktan ölen bir grup balık ile çalışıldı. Çalışmada *L. garvieae* için dizayn edilen 1100 baz çift (bp)'lik pLg-1 (5-CATAACAATGAGAATCGC-3) ve pLg-2 (5-GCACCTCGCGGGTTG-3) primerleri kullanılarak bakterilerin 16S rRNA gen bölgeleri Thermal Cycler (Biorad, PTC-200) yardımıyla çoğaltıldı. Primer seçimi ve

PZR şartları Zlotkin *et al.* (1998) esas alınarak gerçekleştirilmiştir. PZR işleminden sonra örnekler 1x TBE tampon sisteminde %1,2'lik agaroz jelde yürütülmüş, daha sonra etidium bromür (1mg/100µl) ile boyanarak jel görüntüleri jel görüntüleme sistemine (Kodak Gel Logic 200) aktarıldıktan sonra analiz edilmiştir.

### **3.2.1.g. İstatistik analizi**

Zamana göre enfeksiyon denemelerinin sonunda (1. ve 2. deneme), her bir deneme grubu içerisinde kümülatif mortalite farklılıklarını istatistiksel olarak izah edilmesi amacıyla Kaplan-Meier survival analiz yöntemi uygulandı (% 99 güven aralığında,  $p < 0,01$ ). Tüm istatistiksel testler SPSS (version 11,5) paket program kullanılarak değerlendirilmiştir. P değeri  $< 0,01$  ise iki grup arasındaki fark anlamlı kabul edilmiştir.

### **3.2.2. Antibiyotik direnci**

#### **3.2.2.a. Antibiyogram testi**

Farklı coğrafik alanlardan ve kaynaklardan izole edilmiş 29 *L. garvieae* ve 1 *L. lactis* suşuna, antimikrobiyal hassasiyetlerini belirlemek ve suşlar arasındaki antibiyotik direnç farklılıklarını tespit etmek amacıyla çeşitli antibiyotikler ile disk difüzyon testi (Kirby-Bauer yöntemi) uygulanmıştır. Bu amaçla ticari antibiyotik diskleri; ampisilin 5, florfenikol 30, enrofloksasin 5, eritromisin 15, amoksisilin 10, oksitetrasiklin 30, penisilin G 10U, gentamisin 10, trimetoprim+sulfametoksazol 25 ve tetrasiklin 30 (µg/disk, oxoid) kullanılmıştır.

Özetle; bakteri suşları ayrı ayrı TSA'da saf olarak üretilmiştir. Sonrasında herbirinden steril öze yardımı ile birkaç koloni alınarak, 300 µl serum fizyolojik içerisinde bakteri bulanıklığı aynı olacak şekilde (yaklaşık Mc Farland 0,5 bulanıklığı) ayrı ayrı bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu bakteri süspansiyonlarından 0,1 ml alınarak Mueller Hinton Agar (MHA, oxoid) üzerine steril eküvyon yardımıyla iyice yayılmış ve steril kabin içerisinde 5 dakika beklenerek petrilerin kuruması sağlanmıştır. Daha sonra agar

yüzeyine, 6 mm çapındaki ticari antibiyotik emdirilmiş diskler steril pens yardımı ile eşit mesafede yerleştirilerek 30°C’de 48 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon sonunda oluşan zon çapları hassas cetvel ile ölçülerek, sonuçlar suşlar için hassas (S), dirençli ve kararsız (I) şeklinde kaydedilmiştir (Kawanishi *et al.* 2005; Kubilay vd 2005; Kav and Erganiş 2008). Testin yapılışı ve sonuçların değerlendirilmesi Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu (CLSI 2011) verilerine göre gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2.b. Çoğul antibiyotik direnç (MAR) indeksi

Tüm *L. garvieae* suşlarının çoğul antibiyotik direnç (MAR) indeks değerleri hesaplanmıştır. Suşların tek tek MAR değerleri hesaplanırken;

**MAR**= Suşun dirençli olduğu antibiyotik sayısı / Test edilen toplam antibiyotik,

formülü kullanılmıştır. MAR indeks değeri 0,2’den büyük ise örneklerin izole edildiği ortamın kirliliğe maruz kaldığını ve yüksek risk içerdiğini gösterir. 0,2 değerine eşit yada küçük ise suşların izole edildiği ortamlar antibiyotik kullanımı açısından temiz yada az risklidir şeklinde yorumlanabilir (Krumperman 1983).

### 3.2.2.c. Direnç genlerinin tespiti için DNA izolasyonu

Direnç genlerinin tespiti için PZR işleminde kullanılmak üzere önce tüm suşların genomik DNA’ları elde edilmiştir. Bu amaçla, QIAamp DNA Mini Kit, (Qiagen) hazır ticari kiti kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi üretici firma talimatlarına uygun (gram + bakteriden DNA izolasyonu protokolü) gerçekleştirilmiştir. Toplam 30 adet bakteri DNA örneği 5µl miktarında %1 agaroz jele yüklenerek 1xTBE (Tris-Borik-Edta) bafir içerisinde 100 voltta 30 dakika yürütülmüş ve UV transimilatöründe (Biostep, DH 32/30) varlığı ve kalitesi değerlendirilmiştir. Ayrıca elde edilen DNA’ların 260 ve 280 nm’deki absorbanları ve A<sub>260/280</sub> oranları nanodrop cihazı ile ölçülerek DNA kalitesi ve kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilmiştir (Nükleik asid analizer, Osheng, China).

Bu değer ortalama 1,8 olup ortalama DNA miktarı 80 ng/μl olarak tespit edilmiştir. Elde edilen DNA'lar PZR işlemine geçilinceye kadar -20°C'de saklanmıştır.

### 3.2.2.d. Antibiyotik direnç genlerinin varlığının tespiti

Antibiyotik direnç genlerinin tespiti PZR işlemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla spesifik primerler yardımı ile bakteri suşlarının ilgili gen bölgeleri ayrı ayrı çoğaltılmıştır. Bu amaçla; eritromisin için (*ereA* ve *ereB*), tetrasiklin ve oksitetrasiklin için (*tetS*, *tetB*), sulfanamid için (*SulI*, *SulII*), beta-laktam grubu (penisilin, ampisilin ve amoksisilin) için (*blaTEM*, *blaPSE* ve *AmpC*), aminoglikozit (gentamisin) için (*aadA*), trimetoprim için (*dhfrI*) ve florfenikol için (*FloR*, *cmlA*) hedef gen bölgeleri spesifik primerler ile çoğaltılmıştır.

DNA'nın amplifikasyonu her bir örnek DNA'sı ile birlikte toplam 25 μl'lik PZR hacminde gerçekleştirilmiştir. Buz üzerinde hazırlanan bu karışım içeriği Çizelge 3.3'de özetlenmiştir. Antibiyotik direnç genlerinin tespiti için kullanılan primerlerin baz dizilimleri, antibiyotikleri kodlayan gen bölgeleri, ürün boyları ve bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3.4'de belirtilmiştir.

**Çizelge 3.3.** DNA'nın amplifikasyonu için belirlenen PZR bileşenleri ve miktarları

PZR Bileşenleri	Miktar
2X Master Mix (50U/ ml Taq DNA polymerase, 400μl dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1,5 Mm MgCl <sub>2</sub> , Qiagen )	12,5μl
İleri Primer	1μl (100 ng)
Geri Primer	1μl (100 ng)
DNA	1-2μl
Distile su	9,5μl
Toplam	25μl

Ön denemelerde kaliteli görüntü veren PZR ürünü, ilgili gen bölgesi ile yapılan sonraki çalışmalarda pozitif kontrol olarak, örnek DNA'sı içermeyen karışım ise negatif kontrol

olarak kullanılmıştır. Örneklerin ilgili gen bölgelerinin çoğaltılması Thermal Cycler (Sensquest, Germany) cihazı ile yapılmıştır. 94°C’de 3 dakikalık başlangıç denaturasyon işleminin ardından döngülere geçilmiştir. Döngü içerisinde 94°C’de 30 saniyelik denaturasyon, 38-60°C’de 30 saniye annealing (bağlanma) ve 72°C’de 45 saniye extension (uzama) işlemi uygulanmıştır. 35 döngü sonrasında 72°C’de 10 dakika final uzama ile işlem tamamlanmıştır. Optimum PZR şartları için, primerlerin dizayn edildiği literatürlerden yararlanılmış, ayrıca her biri ayrı ayrı optimize edilmeye çalışılmıştır. PZR sonrası, 10 µl ürün ve 2 µl yükleme tamponu (loading 6X, Invitrogen) karışımı, 10 µl/100 ml etidium bromide ilaveli %1,2’lik agaroz jele yüklenerek 1x TBE tampon sisteminde (100 Volt, 45 dk) yürütülmüştür. Ürün boyunu belirlemek amacı ile molekül ağırlık standardı olarak DNA 100 bp marker (Bio Basic, Kanada) kullanılmıştır. Daha sonra jel, görüntüleme sistemine aktarıldıktan sonra analiz edilmiş ve sonuçlar fotoğraflanarak kaydedilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Direnç genlerinin tespitinde kullanılan primerler ve PZR şartları

Primer	Sekans (5'-3')	Hedef Gen	Ürün Boyu	Kaynaklar	Bağlanma sıcaklığı
ereA-F ereA-R	AACACCCTGAACCCAAGGGACG CTTCACATCCGGATTCGCTCGA	<i>ereA</i>	420	Ounissi and Courvalin 1985	59
ereB-F ereB-R	AGAAATGGAGGTTCATACTTACCA CATATAATCATCACCAATGGCA	<i>ereB</i>	546	Arthur <i>et al.</i> 1986	52
tetS-F tetS-R	ATCAAGATATTAAGGAC TTCTCTATGTGGTAATC	<i>tetS</i>	590	Charpentier <i>et al.</i> 1993	38
TetB-F TetB-R	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG	<i>tetB</i>	659	Ng <i>et al.</i> 2001	53
SulI F SulI R	CGGCGTGGGCTACCTGAACG GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	<i>sulI</i>	433	Kern <i>et al.</i> 2002	60
SulII F SulII R	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT GCGTTTGATACCGGCACCCGT	<i>sulII</i>	293		59
TEM OT-F TEM OT-R	ATGAGTATTCAACATTTCCG CAATGCTTAATCAGTGAGG	<i>blaTEM</i>	859	Olesen <i>et al.</i> 2004	45
PSE1 F PSE1 R	CGCTTCCCGTTAACAAGTAC CTGGTTCATTTAGATAGCG	<i>blaPSE</i>	465	Boran <i>et al.</i> 2013	50
AmpC-F AmpC-R	TTCTATCAAMACTGGCARCC CCYTTTTATGTACCCAYGA	<i>ampC</i>	550	Schwartz <i>et al.</i> 2003	49
dhfr1-F dhfr1 R	CTGATATTCCATGGAGTGCCA CGTTGCTGCCACTTGTTAACC	<i>dhfr1</i>	433	Schmidt <i>et al.</i> 2001	57



**Çizelge 3.4.** (devam)

46lor-F	TATCTCCCTGTCGTTCCAG	<i>floR</i>	399	Van <i>et al.</i> 2008	50,5
46lor-R	AGAACTCGCCGATCAATG				
aadA-F	TGATTTGCTGGTTACGGTGAC	<i>aadA</i>	284		52
aadA-R	CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG				
cmlA-F	TGTCATTTACGGCATACTCG	<i>cmlA</i>	455	Saenz <i>et al.</i> 2004	53
cmlA-R	ATCAGGCATCCCATTCCCAT				

### 3.2.3. Plazmit profili

#### 3.2.3.a. Plazmit DNA izolasyonu ve görüntülenmesi

Bakterilerden plazmit DNA izolasyonu QIAprep Plasmid DNA Mini Kit (Qiagen) ile gerçekleştirilmiştir. Kitte bahsedilen protokol, geleneksel metot ile zenginleştirilmiştir (Anderson and Mc Kay 1983). Kısaca, stoktan alınan bakteriler %1 NaCl ilaveli NB'de 1 gece çoğaltılmış ardından santrifüj edilerek bakteri peleti elde edilmiştir. Pelet üzerine 200 µl lizozim (20 mg/ml) eklenerek 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Arkasından gelen işlemler üretici firma talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmit DNA'ların  $A_{260/280}$  oranları 1,7 ve DNA miktarı 40 ng/µl olarak nanodrop ile ölçülmüştür. Elde edilen DNA'lar yükleme tamponu ile birlikte etidium bromide ilaveli %0,7'lik agaroz jele yüklenerek 1x TBE tampon sisteminde (100Volt, 120dk) yürütülmüştür. Ürün boyunu belirlemek amacı ile molekül ağırlık standardı olarak Lambda DNA/ HindIII Marker (Promega) kullanılmıştır. Daha sonra jel, görüntüleme sistemine aktarıldıktan sonra analiz edilmiş ve sonuçlar fotoğraflanarak değerlendirilmiştir (Rhodes *et al.* 2000; Korun *et al.* 2013). Plazmit DNA'nın izolasyonu ve görüntülüne işleminde pozitif kontrol olarak *E. coli* dh5 alpha suşu KTÜ Deniz Bilimleri Enstitüsü'nden tedarik edilmiş ve kullanılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Deneysel Enfeksiyonların Sonuçları

Enfeksiyon denemelerinin hiçbirinde, kontrol gruplarında Lactococcosis ile ilişkili ölüme rastlanılmamıştır. İ.p. ve imm. Yolu ile etkene maruz kalarak ölen tüm balıklar, hayatta kalanlar ve etkeni taşıyanlar, her bir tür için ayrı ayrı Çizelge 4.1’de detaylandırılmıştır.

**Çizelge 4.1.** Deney sonuçları. Bakteri dozları ve deneme sonunda ölen, sağ kalan ve etkeni taşıyan balık sayıları.

Deney	Enfek. Tipi	Doz (cfu fish <sup>-1</sup> )	Tür	Balık s. at start	(*)	(**)	(***)	(****)	(*****)
1	i.p.	$2 \times 10^7$ ATCC	Gökkuşaağı alabalığı	90	8	2	80	8	30
		$2 \times 10^7$ Lgper		90	2	0	88	2	30
	i.m.	$4 \times 10^5$ ATCC		90	77	2	11	2	30
		$4 \times 10^5$ Lgper		90	37	5	48	4	30
2	i.p.	$5 \times 10^6$ ATCC	Gökkuşaağı	90	72	3	15	72	30
			Karadeniz	90	80	2	8	64	30
	i.m.	$4 \times 10^5$ ATCC	Gökkuşaağı	90	87	2	1	69	30
			Karadeniz	90	82	2	5	48	30
3	i.p.	$2 \times 10^6$ ATCC	Kalkan	90	90	0	0	80	30
	i.m.	$8 \times 10^5$ ATCC	Kalkan	90	90	0	0	44	30
4	i.p.	$4.8 \times 10^6$ Lgper	Levrek <sub>1</sub>	90	90	0	0	57	30
	i.m.	$1.7 \times 10^5$ Lgper	Levrek <sub>1</sub>	90	90	0	0	24	30
	i.m.		Levrek <sub>2</sub>	90	90	0	0	42	30

(\*) Deneme sonunda hayatta kalan balıkların sayısı

(\*\*) Doğal yol ile ölenlerin sayısı

(\*\*\*) Hastalıkla ilişkili ölenlerin sayısı

(\*\*\*\*) Deneme sonunda hayatta kalan ve etkeni taşıyan balıkların sayısı

(\*\*\*\*\*) Kontrol amacıyla kullanılan balıkların sayısı

#### 4.1.1. Gökkuşığı alabalıkları ile yapılan deneysel enfeksiyon

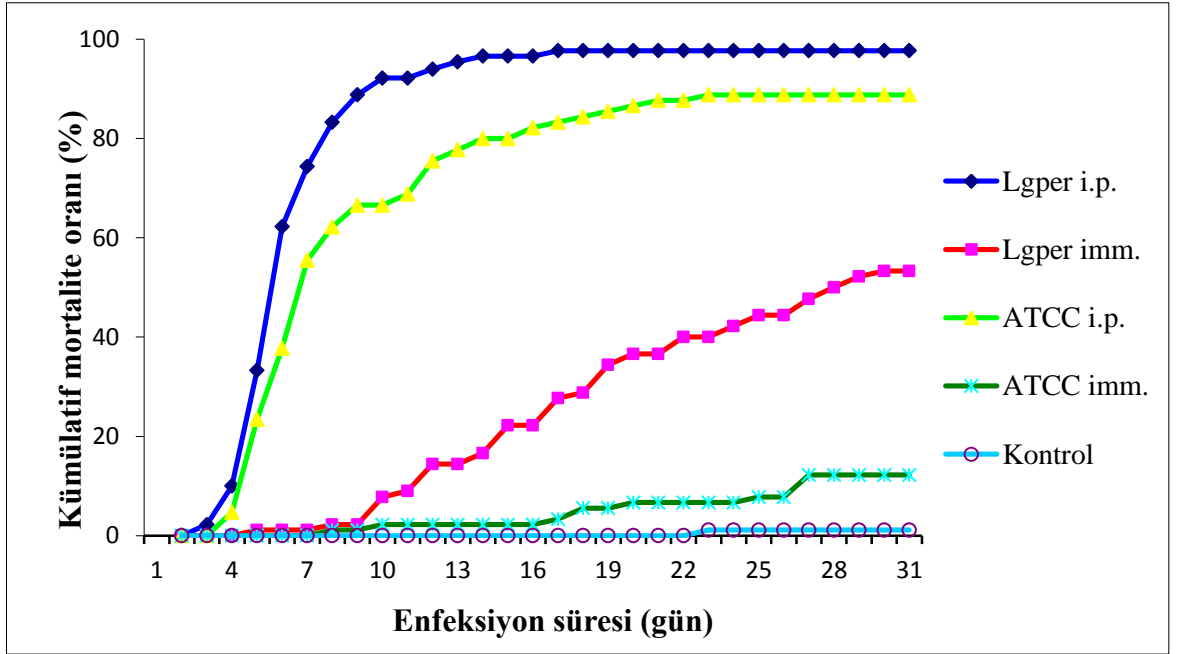
30 gün boyunca ortalama 16°C deniz suyu sıcaklığında gerçekleştirilen deneysel enfeksiyonda balıkların günlük bakımları yapılırken (yemleme, su parametre ölçümleri ve sifon) bakteriye maruz kalan balıkların, tüm klinik durumları kaydedilmiştir.

İki farklı bakteri suşuna maruz kalarak ölen balıkların morfolojik muayenelerinde semptomlar benzer olarak bulunmuştur. İmm. yol ile yapılan enfeksiyon denemesinde ölümler 4. günde başlamış ve 29. gün son bulmuştur. İ.p. enjeksiyon yolu ile bakteri verilen balıklarda ise ölüm 2. gün ile 22. günler arasında olmuştur. Deneyin ikinci gününde ölen balıklarda herhangi bir bulguya rastlanılmamıştır. Hastalığın önemli dış belirtilerinden olan ekzoftalmus ve deride kararma, dördüncü günden itibaren belirginleşmiş olup hemen hemen ölen tüm balıklarda mevcuttur. Bazı balıklarda buna ilaveten çift ya da tek taraflı göz fırlaması da görülmüştür (Şekil 4.1. B, C). Ölen balıkların otopsilerinde; karaciğer, dalak ve böbreklerde büyüme ile beraber yaygın kanamalar (hemoraji) ve bazılarında noktasal (peteşi) kanamalar görülmüştür (Şekil 4.1. A). Az sayıda balıkta bunlara ilaveten ülser, karın boşluğunda sıvı birikmesi (asides) ve kaslarda kızarıklıklar izlenmiştir. Ölen bazı balıklarda ise (%5) herhangi bir morfolojik bulguya rastlanılmamıştır.

Deneme boyunca ölümler günlük olarak kaydedilerek lezyonlu dokulardan (karaciğer, böbrek) yapılan bakteriyel incelemede *L. garvieae* tek başına izole edilmiştir. İntraperitoneal enjeksiyon ile yapılan denemede iki suş (Lgper, ATCC) arasında mortalite bakımından anlamlı bir fark gözlenmezken (%98, %89, P>0,05), immersiyon yolu ile yapılan uygulamada Lgper suşunun patojenitesi bariz olarak ortaya çıkmıştır (%53, %12, P<0,01, Şekil 4.2).



**Şekil 4.1.** Gökkuşığı alabalıklarında otopsi bulguları  
A: Karaciğer ve dalakta hemorrajiler, B: gözlerde ekzoftalmus, C: göz fırlaması,

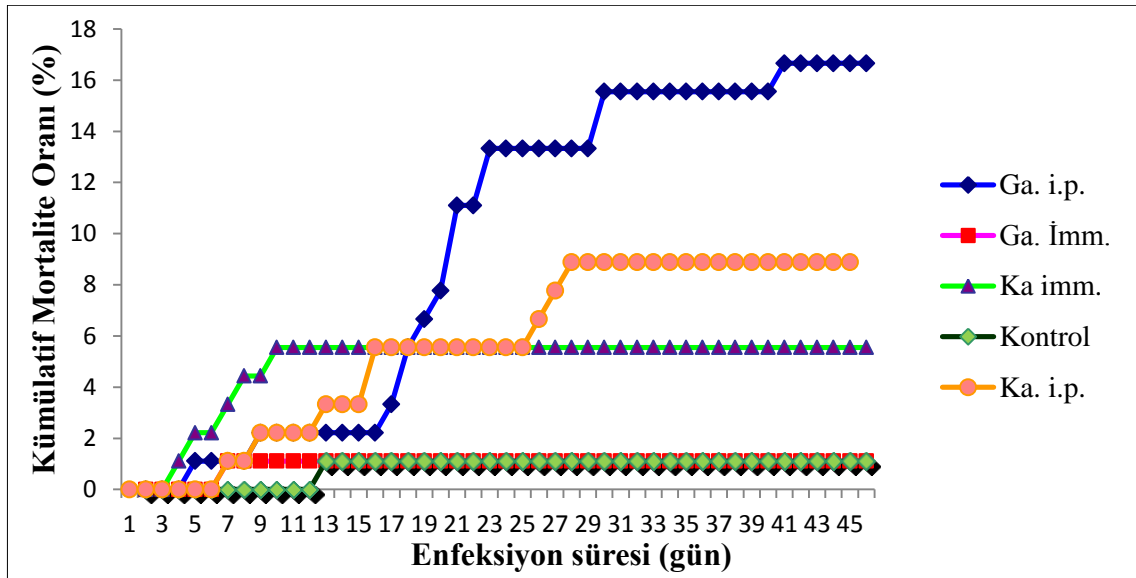


**Şekil 4.2.** Gökkuşığı alabalıklarında i.p. ve imm. yoluyla yapılan enfeksiyon denemesine ait kümülatif mortalite değerleri

#### 4.1.2. İki balık türü arasındaki direnç farklılıkları

Kırk beş gün boyunca ortalama 12°C deniz suyu sıcaklığında gerçekleştirilen deneysel enfeksiyonda balıkların günlük bakımları önceki çalışmalarda olduğu gibi yapılırken bakteriye maruz kalan balıkların, tüm klinik durumları günlük kaydedilmiştir. Önceki çalışmalara nispeten daha düşük deniz suyu sıcaklığında gerçekleştirmek zorunda kalınan bu çalışmada, mortalite oranları düşük çıkmıştır. *L. garvieae* verilerek oluşturulan deneysel enfeksiyonlarda, ölümler 3. günde başlamış ve 40. günde son

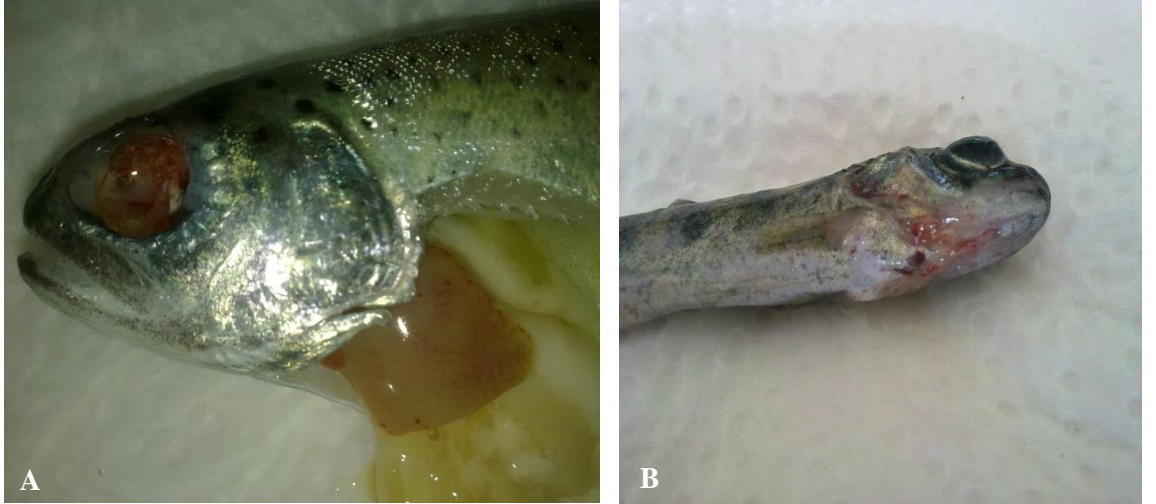
bulmuştur. Daldırma yolu ile gerçekleştirilen enfeksiyonlarda gözlenen toplam ölüm oranları, Karadeniz alabalıkları için %5,5 ve Gökkuşığı alabalıkları için %1,1 olarak gerçekleşmiştir. İntraperitoneal enjeksiyon yolu ile oluşturulan deneysel enfeksiyonlarda ise gözlenen toplam ölüm oranları, Karadeniz alabalıkları için %8,8 ve Gökkuşığı alabalıkları için %16,6 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.3). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde iki balık türü arasında imm. yol ile yapılan deneyde az bir farklılık olup ( $P<0,01$ ), i.p. yol ile yapılan hastalık denemesinde farklılık görülmemiştir ( $P>0,01$ ).



**Şekil 4.3.** Karadeniz ve Gökkuşığı alabalıklarında *L. garvieae* suşu kullanılarak gerçekleştirilen enfeksiyon denemesi kümülatif ölüm oranları  
Ka: Karadeniz alabalığı, Ga: Gökkuşığı alabalığı

Deneyde ölen tüm balıkların bakteriyolojik muayeneleri yapılarak hastalıkla ilişkili ölüm değerleri hesaplanmıştır. Bakteriye maruz kalarak ölen her iki türün morfolojik muayenelerinde bulgular benzer olarak bulunmuştur. En önemli bulgular; düzensiz yüzme, gözlerde kanama ile beraber ekzoftalmus, deride kararma ve yer yer dökülmelerdir. Otopside; karaciğer, dalak ve böbreklerde büyüme ve yer yer kanamalar görülmüştür. Az sayıda balıkta asides gözlenmiştir. Özetle, gerçekleştirilen enfeksiyon denemelerinde bakteri tarafından oluşturulan klinik bulguların, enfeksiyonun tipik

karakterini yansıttığı görülmüştür. İki balık türü arasındaki en dikkat çekici fark; Gökkuşluğu alabalıklarında gözlerde kanama ile beraber tek ya da çift taraflı ekzoftalmus gözlenirken, Karadeniz alabalıklarında kaşeksiye yakın zayıflık ve ağız ve göz çevresinde kızarıklar mevcuttur (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Gökkuşluğu ve Karadeniz alabalığı otopsi bulguları

A: göz fırlaması ve karaciğerde peteşiler (Gökkuşluğu), B: ağız çevresinde hemoraji ve kaşektik görünüm Karadeniz alası

#### 4.1.3. Kalkan balıklarında deneysel enfeksiyon denemesi

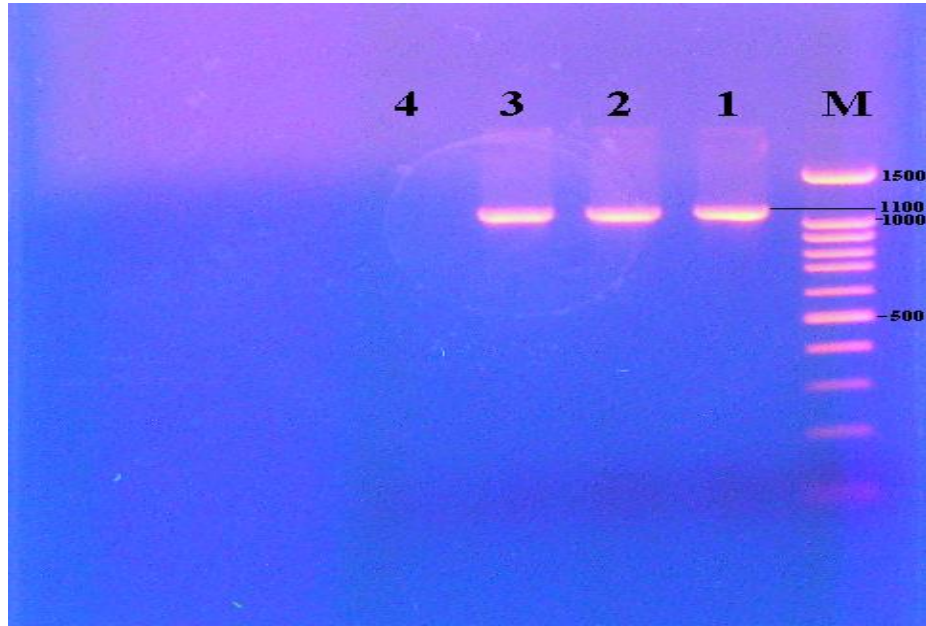
Kırkbeş gün boyunca gerçekleştirilen deneysel enfeksiyonun sonunda kalkan balıklarının hiçbirinde ölüm kaydedilmemiştir. 10. günden itibaren her 5 günde bir gerçekleştirilen morfolojik muayenelerde balıklarda herhangi bir patolojik duruma rastlanmamıştır. Aynı süreçte balıkların böbrek ve karaciğer dokularından yapılan ekimler sonucunda, çoğu balıkta *L. garvieae* bakterisi izole edilebilmiştir (Çizelge 4.1).

#### 4.1.4. Levrekler ile yapılan deneysel enfeksiyon

Otuz gün boyunca iki farklı sıcaklıkta ve iki farklı boy levrekler ile yapılan denemede balıkların hiçbirinde ölüm ya da klinik hastalık işaretine rastlanılmamıştır. Hayatta kalan balıklardaki *L. garvieae* bakterisinin varlığı Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

#### 4.1.5. Bakterilerin geri izolasyonu

Tüm enfeksiyon denemelerinde, ölen ve hayatta kalan balıklardan *L. garvieae* izole edilmeye çalışılmıştır. Karaciğer ve böbreklerden ekim yapıldıktan sonra üreyen bakteriler TSA'da saflaştırılmıştır. Saf koloni halinde bakterinin, toplu iğne başı büyüklüğünde, parlak düzgün kenarlı olduğu gözlenmiştir. Yapılan klasik biyokimyasal test sonuçlarına göre bakteri genel özellikleri ile; gram (+), Oksidasyon/Fermentasyon, PYR aktivitesi, glikoz, sukroz ve maltoz (+), hareketsiz, oksidaz ve katalaz (-) bulunmuştur. Ayrıca DNA'sı izole edilen bakterinin 16S rRNA spesifik gen bölgesinin çoğaltılması ile yapılan PZR ile kesin teşhisi yapılmıştır. Her iki suşa ait PZR ürünleri jelde yürütülerek ürün büyüklüğü marker ile ölçülmüş ve 1100 bp'lik ürün boylarına sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** Spesifik primerler ile yapılan PZR analizi sonucu oluşan ürünlerin agaroz jelde görünümü

M: 100 bp moleküler ağırlık standardı=markır), 1: ATCC, 2: Lgper, 3: pozitif kontrol (ATCC 49156) ve 4: negatif kontrol (örnek DNA'sı içermez).



## 4.2. Antibiyotik Direnci

### 4.2.1. Antibiyogram sonuçları

*Lactococcus garvieae* suşlarının yapılan disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları her bir suş için ayrı ayrı Çizelge 4.2’de verilmiştir. Sonuçlar *L. garvieae* izolatların fenotipik antibiyotik dirençlerinin ortaya çıkarılması ve arkasından yapılan direnç genleri tespiti için önemlidir.

*L. garvieae* suşlarının % 40’ı (12 suş) 3 ya da daha fazla antibiyotiğe dirençli bulunmuştur. Çoğul antibiyotik dirençli (multidrug resistant) bakteri suşları en az 2 farklı sınıf antibiyotiğe karşı dirençli tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre antibiyogram testi uygulanan suşların; penisilin, oksitetrasiklin, ampisilin ve tetrasikline %10, amoksisilin ve eritromisine %16, enrofloksasine %36, gentamisine %50 ve sulfametoksazol+trimethoprim’e karşı ise %90’ının dirençli olduğu saptanmıştır. Suşların florfenikole karşı direnci tespit edilememiştir.

### 4.2.2. Çoğul antibiyotik direnç (MAR) indeksi sonuçları

Çoğul antibiyotik direnç indeksi, 2 *L. garvieae* suşunda (235-16 ve FTPI) test edildikleri 10 antibiyotikten hiçbirine direnç göstermediklerinden dolayı en düşük (0) çıkmıştır. En yüksek MAR değeri ise 6 antibiyotiğe direnç gösteren 2 suшта (G-27 ve 1684) tespit edilmiştir (0,6). MAR indeks değerine göre 13 bakteri suşu kritik değerin üzerinde iken, diğer 17 suş risk sınırında ya da altında bulunmuştur. Tüm suşlar için ortalama MAR değeri ise 0.267 ile risk sınırının hemen üzerindedir.

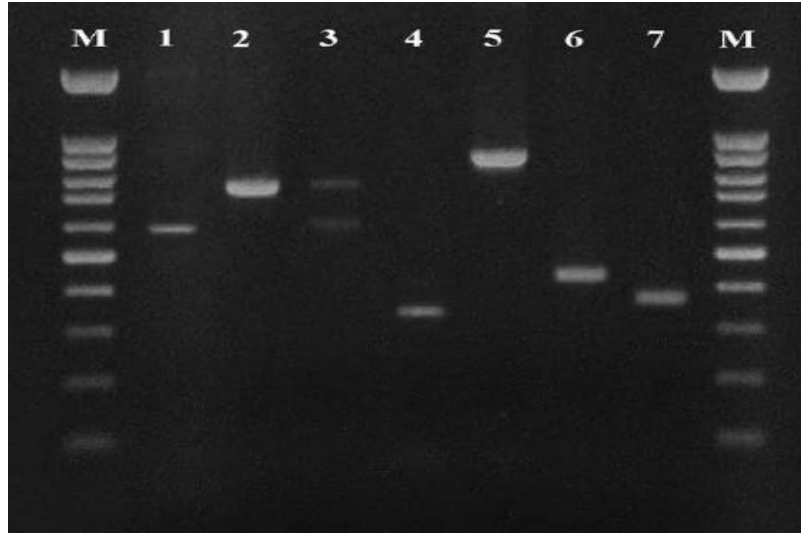
Çizelge 4.2. Disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları

Suşlar/ Antib.	OT30	AML10	E15	AM5	TE30	P10	FFC30	CN10	SXT25	ENR5
<b>637-5</b>	S(30)	S(19)	I(16)	S(24)	S(25)	S(21)	S(24)	R(12)	R(0)	S(22)
<b>K9</b>	I(17)	S(19)	S(30)	S(22)	I(17)	S(16)	S(21)	R(8)	R(0)	I(16)
<b>Ard 30</b>	I(18)	S(23)	R(10)	S(26)	S(20)	S(21)	S(21)	I(14)	R(0)	S(20)
<b>Sider17</b>	S(19)	S(19)	R(13)	S(18)	S(24)	S(20)	S(20)	R(11)	R(0)	R(0)
<b>İyi. Şfk.</b>	S(21)	S(21)	I(21)	S(21)	S(24)	S(22)	S(21)	I(13)	R(0)	S(22)
<b>225-1</b>	R(0)	S(27)	I(21)	S(34)	R(0)	S(22)	S(30)	S(17)	R(0)	S(33)
<b>Şer114</b>	S(31)	R(12)	S(23)	R(15)	S(30)	R(14)	S(25)	S(16)	S(22)	S(22)
<b>Trb.</b>	S(21)	S(23)	S(22)	S(23)	S(20)	S(21)	S(17)	I(14)	R(0)	S(27)
<b>235-16</b>	S(31)	S(18)	S(25)	S(31)	S(24)	S(18)	S(29)	S(18)	S(23)	S(21)
<b>Muğ 1</b>	I(16)	S(20)	S(25)	S(20)	S(30)	S(23)	S(18)	R(11)	R(0)	S(24)
<b>Muğ 2</b>	I(16)	S(19)	S(29)	S(20)	I(18)	S(17)	I(16)	R(8)	R(0)	R(0)
<b>Lgper</b>	S(24)	S(21)	R(15)	S(18)	S(24)	S(21)	S(24)	R(11)	R(0)	R(15)
<b>M 300</b>	I(15)	S(20)	S(23)	S(21)	S(21)	S(20)	S(20)	R(9)	R(0)	I(19)
<b>G-27</b>	R(8)	S(18)	R(0)	S(22)	R(8)	S(16)	S(17)	R(10)	R(0)	R(14)
<b>PP60</b>	S(23)	S(19)	S(23)	S(17)	S(23)	S(15)	S(19)	I(14)	R(0)	I(19)
<b>2398</b>	I(18)	S(17)	S(22)	S(19)	I(18)	S(19)	I(15)	R(10)	R(0)	R(15)
<b>1684</b>	I(18)	R(12)	I(17)	R(14)	I(15)	R(14)	S(17)	R(8)	R(0)	R(14)
<b>164 A/03</b>	R(11)	I(16)	I(17)	S(20)	R(9)	S(15)	I(16)	R(10)	R(0)	R(12)
<b>532</b>	I(17)	R(14)	S(23)	R(10)	S(24)	S(15)	S(25)	R(12)	R(0)	R(15)
<b>ATCC</b>	I(15)	S(18)	I(21)	S(18)	I(15)	S(16)	S(24)	S(15)	R(0)	I(18)
<b>Akoluk</b>	S(26)	S(24)	S(23)	S(23)	S(25)	S(17)	S(23)	I(14)	R(0)	R(0)
<b>399-18</b>	S(23)	S(19)	I(20)	S(20)	S(20)	S(21)	S(19)	I(13)	R(0)	S(21)
<b>Ö. Eskin</b>	S(23)	S(18)	S(22)	S(17)	S(19)	S(17)	S(18)	I(13)	R(0)	R(14)
<b>671-14</b>	S(21)	S(20)	I(19)	S(21)	S(20)	S(22)	I(16)	I(13)	R(0)	I(17)
<b>Muğ 3</b>	S(22)	S(21)	S(24)	S(21)	S(21)	S(18)	I(16)	R(10)	R(0)	R(14)
<b>A-58</b>	S(28)	S(29)	S(24)	S(23)	S(29)	S(24)	S(19)	S(18)	R(0)	I(18)
<b>FTPI</b>	S(23)	S(28)	I(20)	S(26)	S(27)	S(24)	S(27)	S(15)	I(14)	S(21)
<b>498</b>	S(30)	S(30)	S(30)	S(36)	S(30)	S(20)	S(23)	S(26)	R(0)	S(26)
<b>8053</b>	S(33)	S(27)	S(26)	S(37)	S(31)	S(27)	S(30)	S(17)	R(0)	S(27)
<b>L. lactis</b>	S(20)	R(14)	R(11)	S(19)	S(20)	R(14)	S(18)	R(10)	R(0)	S(20)

OT: Oksitetrasiklin, AML: Amoksisilin, E: Eritromisin, AM: Ampisilin, TE: Tetrasiklin, P: Penisilin G, FFC: Florfenikol, CN: Gentamisin, SXT: Sulfamethoksazol+Trimetoprim, ENR: Enrofloksasin, Duyarlılık; R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Kararsız, Zon çapı (mm)

### 4.2.3. Antibiyotik direnç genlerinin tespiti

Antibiyotik direnç genlerinin varlığının arzu edilen şekilde tespit edilebilmesi için PZR reaksiyon durumu (annealing sıcaklığı, MgCl<sub>2</sub> ve primer konsantrasyonu) her bir gen bölgesi için optimize edilmiştir. 30 farklı *Lactococcus* suşunda, 10 farklı antibiyotiği kodlayan toplam 13 direnç geninin varlığı tespit edilmeye çalışılmış ve toplam 10 gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilebilmiştir. Kalan 3 gen bölgesinin ise varlığı tespit edilememiştir. 293 (*SulII*) ve 859 (*bla<sub>TEM</sub>*) bp aralığındaki bu 10 direnç geninin bir kısmı için ferdi PZR sonucu Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

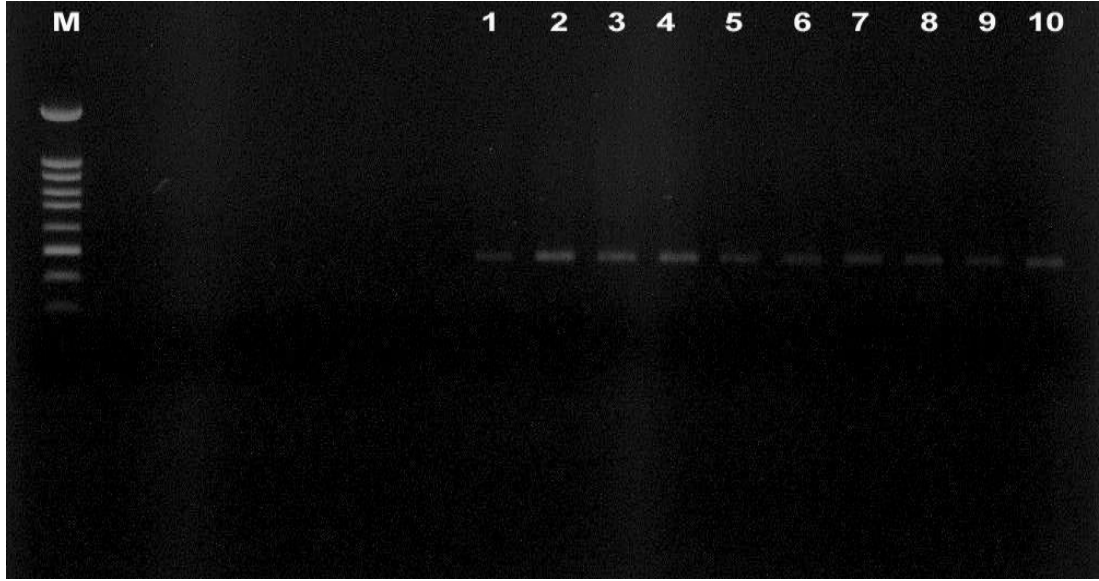


**Şekil 4.6.** *L. garvieae* izolatlarında bazı farklı direnç geni belirleyicilerinin identifikasyonu

M: 100-bp markır, 1-7: *ereB*, *tetB*, *tetS*, *dhfr1*, *bla<sub>TEM</sub>*, *cmlA*, *aadA*

Çalışmada direnç geni taşımayan suş tespit edilmemiştir. Bakteri suşlarının tümünde 2 ya da daha fazla direnç genine rastlanmıştır (çoğul=multiresistant bakteri). En fazla direnç geni taşıyan suş 7 farklı direnç geni saptanan PP6O (İtalya menşeli) isimli suş olmuştur. En çok tespit edilen direnç genleri ise; kloramfenikol, tetrasiklinler ve eritromisin antibiyotiklerini kodlayan sırasıyla *cmlA*, *tetB* ve *ereB* direnç genleridir. Sırasıyla 21, 20 ve 19 suşta tespit edilen bu direnç genlerine 16 suşta üçüne aynı anda rastlanılmıştır. Tetrasiklin ve oksitetrasiklin antibiyotiklerini kodlayan 2 direnç geninden biri (*tetS*) sadece 2 suşta tespit edilirken diğeri (*tetB*) suşların çoğundan izole

edilebilmiştir. 30 *Lactococcus* suşunun 21'inde ve biri hariç (şer114) tüm yurt içi suşlarında tespit edilen *cmlA* direnç geni en çok tespit edilen direnç geni olmuştur (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** Bazı *L. garvieae* suşlarında *cmlA* direnç geninin tespiti  
M: markır, 1-10: *L. garvieae* suşları

Toplam 13 direnç geninin varlığı 29 *L. garvieae* ve 1 *L. lactis* suşunda tek tek tespit edilmeye çalışılmış ve sonuçları Çizelge 4.3'de ifade edilmiştir.

Çizelge 4.3. *L. garvieae* suşlarında antibiyotik direnç genlerinin varlığı

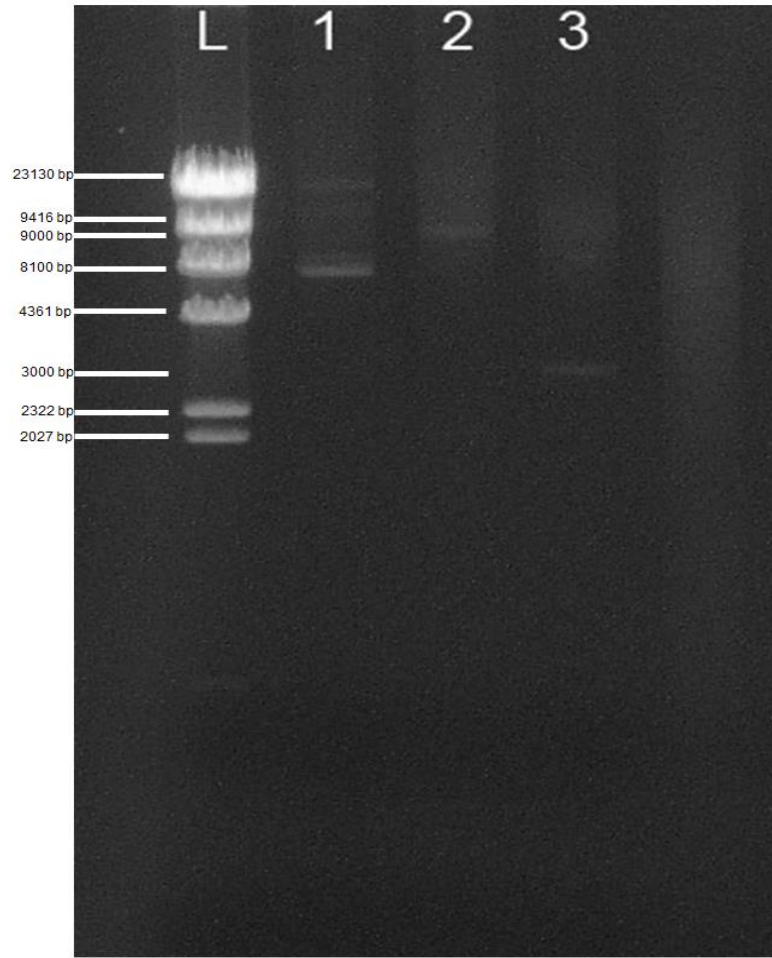
	tetB	tetS	ereA	ereB	SulI	Sul2	ampC	cmlA	FloR	DhfrI	bla <sub>TEM</sub>	bla <sub>PSE</sub>	aada
<b>637-5</b>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>K9</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>Ard 30</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<b>Sider-17</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>İyi. Şfk.</b>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>225-1</b>	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>Şer114</b>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<b>Trb</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>235-16</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>Muğ 1</b>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>Muğ 2</b>	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<b>Lgper</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<b>M 300</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>G-27</b>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>PP60</b>	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<b>2398</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>1684</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<b>164 A/03</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<b>532</b>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<b>ATCC</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-

Çizelge 4.3. (devam)

<b>Akoluk</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<b>399-18</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<b>Ö. Eskin</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<b>671-14</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
<b>Muğ 3</b>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<b>A-58</b>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<b>FTPI</b>	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
<b>498</b>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
<b>8053</b>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<b>L. lactis</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+

### 4.3. Plazmit Sonuçları

Çalışmada 30 *Lactococcus* suşunun plazmit barındırma durumları araştırılmıştır. Plazmit izolasyonunun ardından gerçekleştirilen görüntüleme işlemi sonucunda 2 *L. garvieae* suşunun (164 A/03 ve 8053) yaklaşık 3 ve 9kb büyüklüğünde plazmit taşıdıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** *L. garvieae* suşlarından elde edilen plazmid DNA'nın agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü

L: Lambda *HindIII* markır, 1: *E. coli dh5*, 2 ve 3: *L. garvieae* suşları

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Su ürünleri son yıllara kadar ülkemizin ihraç ettiği tek hayvansal ürünlerdendir. Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan Gökkuşığı alabalığı, deniz levreği, orkinos ve çipura gibi türlerin bir kısmı tüketilmek üzere iç piyasaya sürülürken, önemli bir kısmı da yurt dışına ihraç edilmektedir. Gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliği 1970’li yıllarda amatör anlamda başlamış olup son yıllarda akarsular üzerine kurulu beton havuzlarda, göl, gölet, baraj göllerini ve denizlerdeki ağ kafeslerde daha bilinçli ve yoğun kapasite ile yapılmaktadır. Bugün itibari ile yaklaşık yıllık 110 000 ton ile ülkemizde en yoğun yetiştiriciliği yapılan türdür (SUMAE 2012; TÜİK 2013).

Balık üretimindeki hızlı gelişim, hastalıklar ve ilaç kullanımına bağlı ekonomik kayıpları da beraberinde getirmiştir. Yetiştiricilik alanındaki başarı, ancak etkili balık sağlığı yönetimi ile mümkün olmaktadır. Gelişen ilaç sanayi ve yetiştiricilik tekniklerine rağmen bakteriyel hastalıklara bağlı balık ölümleri halen en önemli yetiştiricilik problemlerindendir (Kusuda ve Kawai, 1998).

Bu çalışmada Ordu/Perşembe’de bulunan bir ağ kafes işletmesinden hastalık salgını esnasında daha önce izole edilen ve LgPer ismi verilen suşun virülanslığını belirlemek ve referans suş (ATCC 49156) ile aralarındaki patojenite farklılığını tespit etmek amacı ile bir çalışma yapılmıştır (1. deneysel enfeksiyon). Tüm deneysel enfeksiyonlar immersiyon ve intraperitoneal olmak üzere 2 yöntemle yapılmıştır. İki farklı bakteri suşuna maruz kalarak ölen balıkların morfolojik muayenelerinde bulgular benzer fakat ölüm oranları farklı bulunmuştur. Ölen balıkların otopsilerinde iç ve dış bulgular *L. garvieae* enfeksiyonunun genel karakterini yansıtmaktadır. İ.p. enjeksiyon yolu ile yapılan denemede iki suş arasında ölüm oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken (%98, %89,  $P>0,05$ ), imm. yolu ile yapılan uygulamada Lgper suşunun virülansı daha yüksek olarak bulunmuştur (%53, %12,  $P<0,01$ , Şekil, 4.2). Doğal ortamda hastalıkların immersiyona benzer yol ile meydana geldiği düşünüldüğünde %50’nin üzerindeki ölüm oranı işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olabilecek boyuttadır. Ayrıca işletmelerdeki ticari kaygılardan ötürü



balıkların, kurulan deney düzeneğine kıyasla çok daha yüksek yoğunlukta stoklanmaları, fiziki şartların daha kötü olması ve özellikle ağ kafeslerde farklı işletmelere ait balıkların birbirlerine yakın tutulmaları gibi nedenlerden dolayı ölüm oranı daha yüksek olabilir.

Kawanishi *et al.* (2006) sarıkuyruk balıkları üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada ATCC 49156 ve kendi izole ettikleri saha suşlarını kullanmışlardır. Saha suşlarının güçlü virulent oldukları, %100 mortaliteye sebep oldukları ve LD50 değerinin  $10^2$  cfu/balık değerinin altında kaldığı ifade edilmiştir. Diğer taraftan, referans suşun ise izolasyonunun üzerinden yıllar geçtiği için fizyolojik değişime uğradığını bu nedenle sarıkuyruklarda mortaliteye sebep olmadığını, LD50 değerinin  $10^8$  cfu/balık değerinin üzerinde olduğunu rapor etmişlerdir. Oysa bu çalışmada aynı referans suş ile Gökkuşluğu alabalıkları üzerinde gerçekleştirilen çalışmada ortalama  $10^6$  cfu/balık miktarında bakteri kullanılmış (i.p) ve %89 oranında mortalite tespit edilmiştir. Ayrıca i.p. uygulamada saha suşu ile aralarında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. Aynı bakteri suşunun iki farklı balık türünde çok farklı oranlarda mortaliteye sebep olması bakteri konakçı ilişkisi ile açıklanabilir.

Kore'nin en önemli deniz kültür balıklarından olan kaya balığının son yıllardaki üretiminin azalmasının nedenlerinin araştırıldığı bir çalışmada, nedenin *L. garvieae* enfeksiyonları olduğunu düşünülmüş ve etkenin patojenitesi araştırılmıştır. Ülkeden izole edilen suşlar balıklara enjekte edilmiş ve 25 gün  $18^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilen çalışmada özellikle bazı suşların virülansının çok yüksek olduğu ve balık kayıplarının ana nedeni olduğu sonucuna varılmıştır Kang *et al.* 2004. Ülkemizde son yıllarda özellikle bahar ve yaz aylarında su sıcaklıklarının artmasıyla beraber çiftliklerdeki balık ölümleri artmaktadır. Özellikle Karadeniz Bölgesi'nde bulunan birçok işletmede bakteri, tek ya da mix enfeksiyonlar şeklinde izole edilebilmiştir (Türe vd 2012). Bu çalışmadaki yüksek mortalite bulguları dikkate alındığında, lactococcosizin ülkemizde Kore'de olduğu gibi son yıllarda alabalık çiftliklerinde ki artan balık kayıplarının en önemli nedenlerinden biri olduğu söylenebilir.

Hastalığın çıkışı ve gelişimi su sıcaklığına ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişse de lactococcusiz hiperakut olarak gelişir ve balıklarda hemorrajik septisemiye neden olur. Etkenin inkubasyon periyodu çok kısa ve virülansı çok yüksek olduğundan deneysel enfeksiyonlarda klinik belirtiler iki gün içinde kendini gösterip, mortalite oranı %100'e kadar çıkabileceği rapor edilmiştir (Itami *et al.* 1996; Bercovier *et al.* 1997). Bu çalışmada, ölümler 2. gün başlamış ve 5. günün sonunda balıkların ortalama %50'si ölmüştür (i.p). Hasta balıklardaki en önemli dış belirtiler ekzoftalmus ve deride kararmalardır. Ayrıca ağız ve göz çevresinde, anüs ve kuyruk yüzgeci kaidelerinde kızarıklıklar mevcuttur. Otopside, dalak, karaciğer ve bağırsaklarda büyüme ve kanlanmalar görülmüştür. Ölen ve ölmek üzere olan balıklardaki lezyonlar lactococcusizin tipik karakterini yansıtmaktadır (Eldar and Ghittino 1999; Avcı *et al.* 2010; Timur vd 2011).

Çağırğan ve Tanrıku (1995), Türkiye'de ilk defa alabalık çiftliklerinde yeni bir sorun olan gram (+) karakterli *Enterococcus* benzeri bir bakteriden söz etmişlerdir. Diler vd (2002) ise 2001 yılında Ege Bölgesi'ndeki bir Gökkuşuğu alabalığı işletmesinde izole ettikleri bakterinin biyokimyasal ve morfolojik karakterini belirlemek suretiyle *L. garvieae* olduğunu rapor etmişlerdir. Sonraları etken hızla diğer bölgelere yayılarak ülkemiz Gökkuşuğu alabalığı çiftliklerinin en önemli sorunu haline almıştır (Çağırğan 2004; Kav ve Erganiş 2007; Avcı *et al.* 2010; Tanrıku and Gültepe 2011). Yapılan epidemiyolojik ve bazı modelleme çalışmaları sonucunda, genel olarak bakteriyel etkenlerin hızlı yayılımında çiftlikler arası kontrolsüz balık hareketlerinin rolünün büyük olduğu bildirilmiştir (Werkman *et al.* 2014). Ülkemizde alabalık çiftlikleri arasında yumurta, yavru, anaç ve porsiyonluk balık nakilleri kontrolsüz olarak yapılmaktadır. Bu durum diğer bakteriyel ve viral hastalıklarda olduğu gibi lactococcusizin yayılmasına neden olabilmektedir (Öztürk and Altınok 2014).

Akuakültürün başlangıcı ülkemizde 1970'li yıllara dayanmakta olup karasal hayvan yetiştiriciliği ile karşılaştırıldığında nispeten yenidir. Gökkuşuğu alabalığı ile başlayan kültür çalışmaları, levrek, çipura, Karadeniz alabalığı ve diğer türlerin de katılımı ile bugün itibari ile Akdeniz ülkeleri arasında önemli bir konumdadır (Çağırğan 2009). Son

yıllarda Karadeniz alabalığı üretimi, bu türün hızlı büyüme, adaptasyon yeteneği ve yüksek market değeri gibi özelliklerinden dolayı hızla artmaktadır (Çakmak vd 2007). Bu türün çevreye uyumu ve özellikle hastalık direnci konusunda yetiştiricileri yakından ilgilendiren çalışmalar bilgilerimize göre yoktur. Bu çalışmada gerçekleştirilen 2. deney düzeneğinde; bu alabalık türünün lactococcusize karşı hassasiyeti Gökkuşığı alabalıkları ile karşılaştırılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

Kırk beş gün boyunca, önceki çalışmalara nispeten daha düşük deniz suyu sıcaklığında (12°C) gerçekleştirilen bu çalışmada, mortalite oranları düşük bulunmuştur. Daldırma yolu ile gerçekleştirilen enfeksiyonlarda gözlenen toplam ölüm oranları, Karadeniz ve Gökkuşığı alabalıkları için sırasıyla %5,5 ve %1,1, i.p. enjeksiyon yolu ile oluşturulan deneysel enfeksiyonlarda ise %8,8 ve %16,6 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.3). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde iki balık türü arasında imm. yol ile yapılan deneyde az bir farklılık olup ( $P < 0,01$ ), i.p. yol ile yapılan hastalık denemesinde farklılık görülmemiştir ( $P > 0,01$ ). Mortalite oranlarının düşük bulunması ve iki farklı yöntem ile gerçekleştirilen denemede birbiri ile çelişkili sonuçların oluşmasından dolayı iki alabalık türünün *L. garvieae*'ye karşı hassasiyeti mukayese edilememiştir. Ne var ki mevcut şartlarda ölüm oranının Karadeniz alabalıklarında daha yüksek (imm.) çıkması bu türün bakteriye karşı en az Gökkuşığı alabalıkları kadar duyarlı olduğunu ortaya koymuştur.

Karadeniz Bölgesi'ndeki alabalık işletmecileri Karadeniz alabalığının Gökkuşığı ile karşılaştırıldığında, hastalıklara bağlı kayıpların bu türde daha az yaşandığını savunmaktadırlar. Özellikle smoltifikasyondan sonra balık ölümlerinin çok az yaşandığı belirtilmektedir. Yapılan bu çalışmada 2 balık türü arasında *L. garvieae*'ye duyarlılık bakımından anlamlı fark bulunamamıştır. Ayrıca bu sorulara daha sağlıklı cevap verebilmek için çalışmanın farklı balık boyları ve farklı patojenler ile yapılması gerekmektedir.

Öğüt and Altuntaş (2011) gerçekleştirdikleri bir çalışmada, Karadeniz, Gökkuşığı ve kahverengi alabalığının Viral hemorrajik septisemi virüsü (VHSV)'na karşı duyarlılık

farkını ortaya koymuşlardır. 0,1-0,2g arasındaki alabalık larvalarının imm. yol ile enfekte edildikleri çalışmada Gökkuşığı alabalıkları ile kahverengi alabalıklar arasındaki ölüm oranının eşit olup, en duyarlı tür ise Karadeniz alabalıkları olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmadan da anlaşılacağı üzere alabalıkların duyarlılıkları yaşlarına ve test edildikleri etkene göre farklılık göstermektedir.

Algöet *et al.* (2009) İngiltere’de yaptıkları bir çalışmada, Gökkuşığı alabalığı, kahverengi alabalık, çipura, Atlantik salmonu, tatlı su kefali ve sazan türlerinin *L. garvieae*’ye karşı duyarlılıklarını araştırmışlardır. Farklı sıcaklıklarda ve sabit dozda bakteri miktarı ile Gökkuşığı alabalıklarının enfekte edildiği denemede, su sıcaklığı arttıkça ölüm oranının arttığı görülmüştür. Bakteri dozu arttırıldıkça balık ölümlerinin arttığına görüldüğü bir başka denemede ayrıca Gökkuşığı alabalığı en duyarlı tür olarak bulunmuştur. Kahverengi alabalığın Karadeniz alabalığı ile yakın ilişkili türler olduğu söylenmektedir (Öğüt and Altuntaş 2011). Bu açıdan bakıldığında 2. denemenin sonucu bu çalışmayla çelişmektedir. Ayrıca düşük sıcaklıkta gerçekleştirilen 2. denemede mortalitenin 1. denemeye kıyasla çok düşük çıkması *L. garvieae*’nin artan su sıcaklığı ile beraber patojenitesinde arttığı gerçeğini bir kez daha teyit etmiştir.

Japonya’da sarıkuyruk, alabalık ve bazı karasal hayvanlardan izole edilen *L. garvieae* suşlarının aralarındaki epidemiyolojik ilişkinin irdelendiği bir diğer çalışmada, aynı konakçıdan elde edilen suşların kendi aralarında epidemiyolojik olarak ilişkili oldukları anlaşılmıştır. Ayrıca balıklardan izole edilen suşların yine balıklarda patojen, karasal hayvanlardan izole edilen suşların ise balıklarda apatojen oldukları deneysel yollarla ortaya koyulmuştur. *Lactococcus garvieae*’nin bazı vakalarda insanlardan izole edilmesi etkenin zoonoz olduğunu ve balık çiftliklerinde gelişen salgınlara ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wang *et al.* 2007). Ülkemizde, etken yaygın olarak balık çiftliklerinden izole edilmesine rağmen insanlardaki varlığı henüz rapor edilmemiştir. Özellikle Uzak Doğu kaynaklı bu endişenin yetiştiricilikten ziyade çiğ balık ve balık ürünlerinin tüketiminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Ülkemizin önemli demersal balık türlerinden olan kalkan, az av veren fakat ekonomik olarak değerli bir balık türüdür. 2006 yılından buyana av gücü gittikçe azalmakta ve stokların sınırlı olmasından endişe edilmektedir. 2012 yılı itibari ile yıllık av miktarı 200 ton civarındadır (TÜİK 2013). Uzak Doğu'da Japonya, Avrupa'da ise İngiltere, Fransa, İspanya gibi ülkeler yassı balık üretimi bakımından oldukça ileri seviyededirler. Avcılık yolu ile elde edilen kalkan balığı ise tüm dünyaya yayılmış vaziyettedir (Zengin *et al.* 2006). Ülkemizde kalkan balığının kültüre alınması ve biyoekolojik özellikleri Tarım Bakanlığı'na bağlı araştırma enstitüleri ve üniversiteler tarafından halen araştırılmakta olup, birkaç özel teşebbüs üretim için hazırlığa başlamıştır. Azalan av gücü, stok miktarları ve tüketici talepleri değerlendirildiğinde, gelecekte yassı balık üretiminin oldukça ileri seviyelere gelebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada kalkan balıkları, 30 gün boyunca  $15\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  su sıcaklığında ortalama  $10^6$ cfu/balık miktarında bakteri ile i.p. ve imm. yöntemler ile enfekte edilmiştir. Deneysel enfeksiyonun sonunda balıkların hiçbirinde ölüm ve hastalığa ait klinik belirtiler görülmemiştir. Deney sonunda balıklar ile yapılan bakteriyolojik muayenede balıkların bir kısmının hastalık belirtisi göstermeksizin etkeni taşıdığı saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Literatürler incelendiğinde, kalkan balıklarından birçok, bakteri virüs ve parazitin izole edilebildiği görülmüş ancak *L. garvieae*'den söz edilmemiştir. Baeck *et al.* (2006) bir başka yassı balık olan pisi balığında, yoğun kültürü yapılan alanlarda benzer hastalık bulgularına rastlanıldığını bildirmiştir. Yapılan incelemede çoğunluğu *Streptococcus parauberis* olmak üzere az sayıda balıktan *Lactococcus garvieae* izole edebilmişlerdir.

Ramilo *et al.* (2011), kalkan balıklarının *Aeromonas salmonicida* bakterisine karşı duyarlılığını tespit ettikleri bir çalışmada, bazı balık soylarının enfeksiyona dirençli olduklarını ayrıca in-vitro koşullarda yapılan sürekli pasajların bakterinin patojenitesi üzerine olumsuz etki gösterebileceğini bildirmektedir. Ewart *et al.* (2008) yaptıkları bir çalışmada in-vivo ve in-vitro koşullarda üretilen *Aeromonas salmonicida*'nın bazı gen açıklanma düzeylerinin farklılık gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca denemede

kullandığımız ortalama 7 aylık balıkların enfeksiyonlara karşı daha duyarlı oldukları larval aşamayı geçmiş olmaları ve dolayısıyla enfeksiyonlara genel olarak dirençli olabilecekleri düşünülebilir. Ancak denemede kullanılan aynı bakteri suşunun alabalıklarda yüksek mortaliteye sebep olması (1. deney) ve denemede kullanılan balıkların deneme dışında, tesisteki kardeşlerinde zaman zaman bakteriyel hastalıklara bağlı ölümlerin görülmesi bu tezleri çürütmektedir. Balıkların çoğunlukla bakteriyel etkeni böbrek ve karaciğer gibi dokularında taşınmaları fakat ölüm ya da hastalığa bağlı işaretlerin görülmemesi kalkan balıklarının *L. garvieae*'ye karşı dirençli olduğunun kanıtıdır.

Nishizawa *et al.* (2006) Türkiye'de yaptıkları bir çalışmada, Trabzon kıyılarından yakalanan anaç ve anaç olmayan kalkan balıklarından ve kültürü yapılan kalkanlardan *Viral haemorrhagic septicemia virüs* (VHSV) tespit etmişlerdir. Elde edilen suş ile yavru alabalıklarda ve kalkan larvalarında patojenite denemeleri yapılmış fakat balıklarda ölüm olmamıştır. Işidan (2010), benzer çalışmada 12 doğal ve kültürü yapılan balık türlerinde VHSV'nin izolasyonu ve izole edilen virüslerin potojenitelerini araştırmaya yönelik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. VHSV'nin varlığı, sadece kalkan balıklarında tespit edilebilmiştir. Elde edilen virüs ile kalkanlara yönelik gerçekleştirilen patojenite çalışmalarında etkenin kalkanlar için patojen olduğu ve son yıllarda kalkan balığı stoklarındaki azalmanın nedeni olabileceğini düşündürmüştür.

Deniz levreği Türkiye'de en yoğun yetiştiriciliği yapılan deniz balığı türüdür. Son 10 yılda üretimi sürekli artış halinde olup 2012 yılı itibarıyla ortalama 65 000 ton üretilmiştir (TÜİK 2013). Avrupa'da yaygın olarak yapılan levrek yetiştiriciliği ülkemizde Ege, Akdeniz ve Karadeniz Bölgesi'nde denizlerdeki ağ kafeslerde sürdürülmektedir. Toranzo *et al.* (2005), Vibriosis, Photobacteriosis, Streptococcosis ve Mycobacteriosis'i levreklerde sıklıkla görülen bakteriyel hastalıklar olarak bildirmişlerdir. Ege Bölgesi'nde kültürü yapılan çipura ve levreklerde görülen bakteriyel ve paraziter hastalıkların teşhis ve tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda; *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Photobacterium damsela* ve *Pasteurella piscicida* gibi bakteriyel etkenlerden söz edilirken, *Cryptobia sp.*, *Trichodina sp.*, *Cryptocaryon*

*irritans*, *Diplectanum aequans* ve *Meinertia oestroides* gibi paraziter etkenlerin varlığı bildirilmiştir (Çağırğan ve Yüreklitürk 1996; Çağırğan ve Tokşen 1996).

Doğal ya da kültürü yapılan levreklerde ülkemizden ya da yurt dışından *Lactococcus* vakası bildirilmemiştir. Bu çalışmada iki farklı boydaki levrekler (6,5 ve 13g) iki farklı sıcaklıkta 15'er gün süresince *L. garvieae* ATCC suşu ve her iki enfeksiyon tipi ile enfekte edilmişlerdir. Deneysel çalışma, 15 gün  $17\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de sürdürülürken sıcaklık  $23\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'ye çıkarılmış (ortalama günde  $1^{\circ}\text{C}$ ) ve 15 günde o şekilde sürdürülmüştür.  $16-17^{\circ}\text{C}$  levreklerin ortalama denize indirilme sıcaklıkları olup,  $23^{\circ}\text{C}$  ise Karadeniz'in ortalama yaz suyu sıcaklığıdır. Ortalama  $10^6$  cfu/balık dozunda bakterinin kullanıldığı çalışmada hiçbir grup balıkta ölüm gözlenmemiştir. Deney sonunda incelenen balıkların bir kısmının etkeni taşıdıkları görülmüştür (Çizelge 4.1).

Yapılan enfeksiyon denemelerinin sonucunda kalkan ve levrekler *L. garvieae* bakterisine karşı dirençli türler olarak tespit edilmişlerdir. Karadeniz alabalıkları en az Gökkuşluğu alabalıkları kadar duyarlı türler olup, 2 alabalık türü arasındaki direnç farklılıklarının tam olarak tespiti için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca ülkemizden izole edilen bir suş alabalıklar üzerinde yüksek patojenik etkiye sahip olup, bakterinin izole edildiği her ortam riskli kabul edilip eradikasyon (etkeni yoketme) çalışmaları yapılmalıdır.

Akuakültürde bakteriyel hastalıklardan korunmak için, uygun çevre ve gerekli önlemler alındıktan sonra en iyi yöntem uygun antimikrobiyal maddelerin kullanılmasıdır (Kubilay vd 2005). Balıklarda, *Streptococcus* cinsine ait bakterilerden kaynaklanan hastalıkların tedavisinde antibiyotikler eskiden beri kullanılmaktadır. Fakat bu maddelerin bilinçsizce kullanımı sucul çevrede antibiyotik direnç gelişimine sebep olmuştur (Kitao 1982; Vendrell *et al.* 2006).

Bu çalışmada farklı coğrafik alanlardan, çoğu Gökkuşluğu alabalıklarından izole edilmiş 29 adet *L. garvieae* ve 1 *L. lactis* suşunun antibiyotik direnci fenotipik ve genetik olarak araştırılmıştır. Antibiyotik direncinin antibiyogram testi ile fenotipik olarak araştırıldığı

çalışmanın sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Toplam 13 antibiyotik direnç geni bölgesinin tespitine yönelik çalışma ise PZR (Uni-plex) aracılığı ile gerçekleştirilmiş ve sonuçları Çizelge 4.3’de izaha çalışılmıştır.

10 farklı antibiyotiğe karşı antibiyogram testi uygulanan suşların; penisilin, oksitetrasiklin ve tetrasikline %10, ampisilin, amoksisilin ve eritromisine %16, enrofloksasine %27, gentamisine %50 ve sulfametoksazol+trimethoprim’e karşı ise %86’sının dirençli olduğu saptanmıştır. 28 *L. garvieae* suşu (%93) 1 ya da daha fazla antibiyotiğe dirençli bulunurken (çoğul antibiyotik direnci) 2 suş antibiyotiklerin hiçbirine direnç göstermemiştir.

Tetrasiklinler 1950’li yıllardan buyana insan, hayvan, gıda ürünleri ve bitkiler üzerinde tedavi edici ya da büyümeyi hızlandırıcı etkilerinden dolayı kullanılmaktadır (Chopra and Roberts 2001). Tetrasikline karşı direnç, ortamda tetrasiklinin kullanılmasıyla başlamış olup şu ana kadar yaklaşık 40 adet tetrasiklin (*tet*) ve 3 adet oksitetrasiklin (*otr*) direnç geninin varlığı tespit edilmiştir (Dancer *et al.* 1997; Kim *et al.* 2004; Robert 2005). Bu genlerin çoğunluğu aktif pompa mekanizmasını (efflux) bir kısmı ise ribozomal koruma proteinlerini aktifleştirerek bakterilerin antibiyotiğe direnç göstermesini sağlarlar (Robert 2005). *TetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* ve *tetE* direnç genleri çeşitli sucül ortamlarda, balık üretim çiftliklerinde ve yetiştiricilik yapılan deniz kafeslerinde çoğunlukla tespit edilen direnç genleridir (Schmidt *et al.* 2001; Balta *et al.* 2010; Boran *et al.* 2013).

Bu çalışmada aynı 3 suş tetrasiklin ve oksitetrasikline fenotipik olarak direnç göstermiştir. Ayrıca tetrasiklin direnç genlerinin tespitine yönelik *tetB* ve *tetS* genleri araştırılmış ve *tetB* geni 20, *tetS* geni ise 2 suşta tespit edilmiştir. *tetB* direnç geni en fazla tespit edilen (%66) direnç genlerinden biri olmuştur. Tetrasiklin direnç belirleyicilerin bakteri popülasyonları arasında hızlı yayılması bu genlerin plazmit, tranzpozon ve gen kasetleri gibi mobilize unsurlar üzerinde konuşlanmasından kaynaklanır (Sunde and Nordstrom, 2006). Bu çalışmada *tetB* geninin yaygın tespiti bu bilgiyi doğrular niteliktedir.



Kawanishi *et al.* (2005) Japonya'da *Seriola* cinsi balıklardan izole ettikleri *L. garvieae* suşlarının yarısının *tetS* ve *ermB* direnç genlerini taşıdıklarını rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmada ise *tetS* geni bu ölçüde olmasa da aynı antibiyotiği kodlayan bir diğer direnç geni (*tetB*) suşların çoğunda tespit edilmiştir.

Kav and Erganiş (2008) alabalık çiftliklerinden izole ettikleri *L. garvieae* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını tespit ederek etkili antibiyotik tedavisini belirledikleri çalışmada, tüm bakteri suşlarını penisilin G, amoksisilin, ampisilin+sulbaktam, ve sefoperazon gibi  $\beta$ - laktam grubu antibiyotiklere karşı duyarlı bulunmuşlardır. Sonuç olarak  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin bu hastalığın tedavisinde kullanılabilir uygun bileşikler olduğu rapor etmişlerdir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmanın bulguları bu literatür bilgisini doğrular niteliktedir.

İran'da çiftçilerin, Lactococcosis salgınlarında kullandıkları antibiyotiklerin işe yaramadığından şikayet etmeleri üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada; Gökkuşluğu alabalığı çiftliklerinden izole edilen *L. garvieae* suşlarının antibiyotik dirençleri fenotipik olarak incelenmiş ve suşlar genel olarak; oksitetrasiklin, penisilin, gentamisin, klindamisin, siprofloksasin, ve sefotaksime karşı yüksek oranda dirençli bulunmuştur. Ayrıca çalışmada, dirençli gelişiminin engellenmesi için antibiyotik kullanımlarının kısıtlanması gerektiği vurgulanmaktadır (Raissy and Ansari 2011). Mevcut araştırmada bakteri suşlarının fenotipik olarak tetrasiklinlere karşı duyarlı olmalarına rağmen, ilişkili direnç geninin (*tetB*) yaygın olarak tespit edilmesi ve bu grup antibiyotiklerin sahada pek işe yaramadığını bilmesi benzer tedbirlerin ülkemizde de alınmasını gerekli kılmıştır.

Tetrasiklin direnç genleri birçok ortamda yaygındır. Özellikle çoğul antibiyotik direncine sahip birçok mikroorganizmada tespit edilmiştir (Levy *et al.* 1999). Ng *et al.* (2001) gerçekleştirdikleri bir çalışmada insanlardan izole ettikleri metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhimurium* klinik suşlarında 14 farklı tetrasiklin direnç genlerini tespit etmeye çalışmışlardır. Bakterilerde yaygın şekilde bulunan *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS*, *tetA(P)*, *tetQ* ve *tetX*, direnç

genlerinin çoğu tespit edilebilmiştir. Mevcut çalışmada da görüldüğü üzere tetrasiklin direnç genleri hem karasal hem de sucül ortamda yaygınlığından dolayı, beşeri olduğu kadar su ürünleri alanını da ilgilendirmektedir.

Makrolit, linkosamid ve streptogramin yapı olarak ilişkili olmamalarına rağmen çok sayıda makrolit direnç geni bu bileşiklerin üçüne birden dirençli olabilir (Robert 2008). *Erm* genleri plazmit ve transpozon gibi mobil elementlerle ilişkili olduklarından bakteriler arasında kolaylıkla transfer olabilirler (Liu *et al.* 2007). Bu çalışmada, *L. garvieae* suşlarının 4 tanesi (%16) eritromisine fenotipik olarak dirençli olup, *ereA* ve *ereB* genlerinin tespit edilmeye çalışıldığı genetik çalışmada ise *ereA* geni tespit edilemezken, *ereB* direnç geninin varlığı 19 suшта ortaya koyulabilmiştir. Tetrasiklin direncinde olduğu gibi eritromisin direncinde de fenotipik ve genetik çalışmalar arasında zayıf korelasyon vardır.

Austin and Austin (1999) yaptıkları bir denemede hasta sarıkuyruklara günde 25mg/kg canlı ağırlığı dozunda verilen eritromisinin, oksitetrasiklin ve ampisiline göre daha etkili olduğunu belirtmiştir. Oysa bu çalışmada oksitetrasiklin ve ampisilin fenotipik olarak eritromisinden daha etkili bulunmuştur.

Bakterilerdeki eritromisin direnci, çoğunlukla aktif pompa mekanizması, eritromisin metilaz ve diğer inaktive edici enzimleri vasıtası ile gerçekleşir. Mevcut çalışmada eritromisin direnç genlerinin tespiti için kullanılan primerler ilaç inaktivasyonunun tespitine yöneliktir (Sutcliffe *et al.* 1996). Kawanishi *et al.* (2005) Japonya’da tetrasiklin ve eritromisin dirençli tüm *L. garvieae* suşlarının *tetS* ve *ermB* direnç genlerini taşıdıklarını rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmada da aynı antibiyotiklere karşı direnç genleri (*tetB* ve *ereB*) hemen hemen eşit oranda bulunmuştur.

Sutcliffe *et al.* (1996) yaptıkları bir çalışmada farklı konakçı gruplarından izole ettikleri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* ve *Escherichia coli* klinik suşlarında eritromisin direncine yol açan direnç genlerini araştırmışlar ve birden fazla direnç geni tespit etmişlerdir. Ayrıca

çalışmalarında PZR tekniğinin direnç genlerinin saptanmasında kullanışlı bir metot olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ise eritromisin ile ilgili 2 direnç geninin varlığı (*ereA* ve *ereB*) araştırılmış ve 1 direnç geni bakterilerde yoğun olarak izole edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada alınan sonuçlar eşliğinde, spesifik primerler ile gerçekleştirilen PZR tekniğinin direnç genlerinin saptanmasında kullanışlı, hızlı ve ekonomik bir metot olduğu görülmüştür.

Dünyada ve ülkemizde *L. garvieae*, *Y. ruckeri*, *A. salmonicida*, *F. psychrophilum* ve *V. anguillarum* gibi balık patojenlerinin antibiyotik duyarlılıklarının ve direnç genlerinin tespiti üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmında bakterilerin eritromisine karşı dirençli oldukları tespit edilirken (Sutcliffe *et al.* 1996; Kayış 2009; Boran vd) bir kısmı ise aynı tür bakterilerin bu antibiyotiğe duyarlı olduklarını rapor etmişlerdir (Kubilay vd 2005; Kav *et al.* Erganiş 2008; Raissy and Ansari 2011; Durmaz vd 2012). Bu sonuçlardan anlaşılacağı üzere; bir bakteri türünün antibakteriyel direnci sabit olmayıp suşların izole edildikleri alanlar, bu alanların bakteri ve antibakteriyel açıdan kirliliği, antibakteriyelin konsantrasyonu, izolasyon zamanı, ve konakçının türü gibi kriterlere bağlı olarak değişmektedir. Bilinen genel kanı, eritromisin ve türevi antibiyotikler gram (+) bakterilere karşı etkilidirler. Bu çalışmada ve *L. garvieae* ile yapılan çalışmaların çoğunda bu kanı doğrulanmıştır.

Beta-laktamaz inhibitörü antibiyotikler ( $\beta$ - laktamlar) moleküler yapılarında  $\beta$ - laktam halkası içeren geniş bir gruba sahip antibiyotiklerdir. Penisilin ve türevleri, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenem bu grubun önemli öğelerinden olup uzun yıllardır insan ve hayvan sağlığında kullanılmaktadırlar (Holten and Onusko 2000). Bakterilerin hücre duvarı sentezini sekteye uğratmak suretiyle etki gösteren bu grup antibiyotikler son yıllarda tüm ticari antibiyotiklerin yarısından fazla tüketilmiştir.  $\beta$ - laktamlara karşı direnç kazanılması;

1. Bakteriler tarafından salınan  $\beta$ -laktamaz enzimleri tarafından  $\beta$ -laktam halkalarının açılması ve inaktivasyonu,

2. Bakteri çeperindeki penisilin bağlayan proteinlerin ilaca karşı afinitesinin (ilgi) azalması,
3. Bakteri hücre çeperinin geçirgenliğinin azalması sonucu ilacın bakteri çeperindeki periplazmik aralığa girmesinin zorlaşması, mekanizmaları ile olmaktadır (Li *et al.* 2007).

Bu direncin üstesinden gelmek amacıyla  $\beta$ - laktamlar genellikle klavulanik asitle kombine edilmişlerdir. Son yıllarda 2 antibiyotiğin kombinasyonu beşeri ve veteriner hekimlikte gram (-) ve (+) birçok etkenden kaynaklanan hastalıklara karşı tedavi edici ve profilaktik olarak artan şekilde kullanılmaktadır (Elander 2003). Literatürde çok sayıda  $\beta$ - laktamaz enzimi ve antibiyotik direnç geni (*bla*) bildirilmiştir.

Bu çalışmada  $\beta$ - laktam grubu antibiyotiklerden penisilin G, ampisilin ve amoksisilin tercih edilmiş ve *L. garvieae* suşlarının sırasıyla %10, %16, %16'sı bu antibiyotiklere direnç göstermiştir. Çalışmada bu grup antibiyotiklere duyarlı ve dirençli bulunan bakteri suşları genellikle aynı bulunmuştur (Çizelge 4.2).  $\beta$ - laktam direnç genlerinin tespitine yönelik yapılan çalışmada *ampC*, *blaTEM* ve *blaPSE* direnç genlerinin varlığı araştırılmış ve sadece *blaTEM* direnç geni 12 suшта (%40) tespit edilmiştir. PZR metodu ile tespit edilen bu gen bölgesi boyu en uzun (859bp) gen bölgesi olarak bulunmuştur.

Terzi (2013) Doğu Karadeniz Bölgesi'nde çiftliklerde üretimi yapılan alabalıklardan izole edilen bakterilerin antibiyotik direncini incelemiş ve suşların tamamına yakınının ampisiline dirençli olduğunu ve dirençli suşların çoğunun *ampC*, *blaTEM* ve *blaPSE* direnç genlerini taşıdıklarını tespit etmiştir. Mevcut çalışmada ise *L. garvieae* suşlarına karşı ampisilin direnci düşük bulunmuş ve *ampC* direnç geni tespit edilememiştir.

Boran *et al.* (2013), dünyada ilk kez kafes kültürüne alınan istavritlerin periyodik muayeneleri esnasında izole ettikleri gram (-) bakterilerin antibiyotik dirençlerini belirlemişler ve suşların yarısından fazlasının ampisiline dirençli olduğu tespit etmişlerdir. Ayrıca  $\beta$ -laktam (*bla<sub>TEM-OT3-4</sub>*) ve tetrasiklin (*tetB*) direnç genleri çalışmada en yaygın tespit edilen direnç genleri olarak bulmuşlardır.

Van *et al.* (2008) Vietnam’da yaptıkları bir çalışmada marketlerde satılan çiğ et ve deniz ürünlerinden izole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç ve virülans genlerini araştırmışlar ve çoklu dirence sahip olarak belirlenen 38 *E. coli* suşunda  $\beta$ -laktam (TEM) ve tetrasiklin (*tetA*, *tetB*) direnç genlerini yoğun bir şekilde tespit etmişlerdir. Görüldüğü üzere balık ve diğer canlılardan izole edilen bakterilerde  $\beta$ -laktam direnci ve direnç genleri yoğun olarak tespit edilebilmektedir. Çalışmamızda literatür bilgisinin aksine suşların büyük bir kısmı  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere duyarlı bulunmuş ve az sayıdaki suşta ilgili direnç genlerinden sadece biri (*bla*TEM) tespit edilebilmiştir. Bu sonuçlara göre bakterilerin izole edildiği ortamların  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere fazla maruz kalmadığı söylenebilir. Ancak direnç gelişiminin sadece antibiyotik kullanımına bağlı olmayıp genlerin uygun taksonomik yapıya sahip bakteriler arasında yatay olarak da transfer olabileceği unutulmamalıdır.

Sülfonamidler sistemik kullanıma ilk giren antibiyotiklerden olup duyarlı mikroorganizmalarda folik asit sentezini sekteye uğratmak suretiyle etki gösterirler. Geniş etki spektrumuna sahip olup gram (+) ve (-) bakterilere etki ederler. Bakterilerde sulfanamid antibiyotiğine karşı direnç; sülfonamidlerden etkilenmeyen enzim salınımı ve hücre zarının sülfonamid geçirgenliğini azaltması şeklinde olmaktadır. Bakteriostatik (bakteri üremesini durduran) etkili sülfonamidler genellikle bakterisit (bakteriyi direkt öldüren) etki yapan trimetoprim ile beraber (sinerjistik etki) kullanılırlar (Sköld 2001; Anonim 2014b). Sucul ortamlarla ilişkili bakterilerle yapılan araştırmalarda genellikle *sul1*, *sul2* ve *sul3* direnç genlerinden söz edilmiştir (Boran *et al.* 2013).

Bu çalışmada *L. garvieae* suşlarının %90 kadarının sulfametoksazol+trimetoprim (SXT)’e karşı dirençli olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, fenotipik olarak tespit edilen en yüksek orandır. Antibiyotik direnç genlerinin tespitine yönelik yapılan çalışmada ise *sul2* direnç geninin varlığı 13 bakteri suşunda tespit edilirken, *sul1* direnç genine sadece 3 suşta rastlanmıştır.

Terzi (2013) yetiştiriciliği yapılan alabalıklardan izole edilen bakterilerin büyük çoğunluğunun SXT bileşiğine karşı dirençli olduğunu rapor etse de *sul1* ve *sul2* direnç

genlerinin varlığını %20 oranında tespit etmiştir. *Sul3* direnç genine ise rastlamamıştır. Her iki çalışmada ki fenotipik ve genetik sonuçlar arasındaki bu uyumsuzluk: Sulfonamidlere karşı gelişen antibiyotik direnci ortamda bu bileşiklerin yoğun kullanımına bağlı olarak gelişmekte olup henüz genler üzerinde kodlanmamıştır, şeklinde açıklanabilir.

Literatürler incelendiğinde, *L. garvieae* ve diğer balık patojenlerinin %50'den fazlasının SXT bileşiğine karşı dirençli olduğu görülmüştür (Kawanishi *et al.* 2005; Kubilay vd 2005; Kav *et al.* Erganiş 2008; Raissy and Ansari 2011; Boran *et al.* 2013). Mevcut çalışmada da benzer sonucun görülmesi, sucul ortamların sulfonamid antibiyotiğine geçmişten günümüze aşırı maruz kaldığını ve lactococcusiz salgınlarında bu bileşiğin kesinlikle kullanılmayacağını göstermektedir.

Amfenikoller, bakteri ribozomlarının 50S ribozomal alt birimine bağlanarak peptidil transferaz enzimini bloke etmek suretiyle etki gösteren bakteriostatik bileşiklerdir. Florfenikol ve kloramfenikol bu grubun değerli üyeleridir. Bu grup antibiyotiklere karşı direnç, R- plazmidin taşıdığı genler tarafından salınan asetil transferaz enzimi ile olmaktadır (Tenover 2006).

Kloramfenikol uzun yıllardır insan ve hayvan sağlığını tehdit eden bakterilere karşı yoğun bir biçimde kullanılmıştır. Son yıllarda ise gerek yan etkileri gerekse kalıntı sorunundan dolayı kullanımı sekteye uğramıştır (Angulo *et al.* 2004). Florfenikol ise nispeten yeni bir antibiyotik olup ülkemiz akuakültür endüstrisine yeni girmiş ve balık hastalıklarının tedavisinde başarılı bir biçimde kullanılmaktadır (Kayış *et al.* 2009). Florfenikol ayrıca, farklı patojenik bakterilerin neden olduğu balık hastalıklarına karşı etkisi iyi bilinen antibiyotiklerdendir (Di Salvo *et al.* 2013).

Bu çalışmada bakteri suşlarının büyük çoğunluğu (%83,3) florfenikole karşı duyarlı bulunurken, dirençli suş tespit edilmemiştir. Fakat direnç genlerinin tespitine yönelik çalışmada, kloramfenikol ve florfenikol direnç genleri (*cmlA* ve *FloR*) sırasıyla 21 ve 14 suшта tespit edilmiştir. Özellikle kloramfenikolu kodlayan *cmlA* direnç geni en yaygın

(%70) tespit edilen direnç geni olmuştur. Fenotipik olarak florfenikole karşı henüz direnç gelişmemiş olması fakat direnç genlerinin %50 civarında tespit edilmesi bu antibiyotiklerin sucul ortamlarda yaygın olarak kullanıldığını ve yakın gelecekte kullanımının riskli olacağını akıllara getirmektedir.

Terzi (2013), alabalık işletmelerinden izole ettikleri bakterilerin genel olarak kloramfenikole karşı sergilemiş oldukları direnci düşük bulurken, su ve sedimentten izole edilen bakterilerde *cmlA* direnç geni %5, balıklardan izole edilen bakterilerde ise aynı geni %33 oranında tespit etmiştir. Van *et al.* (2008), çiğ et ve kabuklu deniz ürünlerinden izole ettikleri *E. coli* suşlarının antibakteriyel direncini araştırdıkları çalışmada suşların %45'inin kloramfenikole dirençli olduğunu ve suşların aynı oranda *cmlA* direnç geni taşıdıklarını rapor etmişlerdir.

Bazı ülkeler antibiyotiklerin etkinliklerinden uzun süre faydalanmak için kullanımlarını kısıtlamışlardır. Bazı Avrupa Birliği ülkeleri ise hayvancılıkta antibiyotiklerin tedavi dışında kullanımına yasak getirmiştir. Bu şekilde seçici baskı azaltılarak direnç gelişiminin önlenilebileceği düşünülmektedir. Büyüme hızlandırmak ve benzeri amaçla antibiyotiklerin kullanımı direnç gelişiminin yanı sıra çevreyi kirletme ve tüketici konumundaki insan sağlığını tehdit etme gibi sonuçlarda doğurmaktadır.

Aminoglikozidler, bakteri ribozomlarının 30S ribozomal alt ünitelerine bağlanmak suretiyle bakterisit olarak etki yaparlar. Dar spektrumlu antibiyotikler olup sadece gram (-) aerobik basillere etkilidirler. Bu nedenle kombinasyonlar halinde tercih edilirler. Ancak bazı spesifik hastalıklara karşı tek başlarına kullanılabilirler (Ronald *et al.* 1999). Aminoglikozidlere karşı direnç; bakterilerin asetiltransferaz (*aac-aadA*), fosfotransferaz (*aph*) ve nükleotidiltransferaz (*ant*) enzimleri ile asetillenmek, fosforillenmek ve adenillenmek suretiyle antibiyotikleri enzimatik modifikasyona uğratmasıyla gelişir (Shakil *et al.* 2008).

Bu çalışmada antibiyogram testi uygulanan suşların gentamisine karşı %47'sinin dirençli, %27'sinin ise duyarlı olduğu saptanmıştır. Gentamisin direnç genlerinin

varlığını saptamaya yönelik çalışmada ise tespit etmeye çalışılan *aadA* direnç geni yalnızca 3 suşta tespit edilebilmiştir. Gentamisine karşı oluşan yüksek direncin direnç genlerinden kaynaklı olmadığı, aminoglikosidlerin dar etki spektrumundan kaynaklandığı söylenebilir. Literatüre bakıldığında *L. garvieae*'nin antibiyotik dirençliliği ile ilgili hemen tüm çalışmalarda bakterin aminoglikozid grubu antibiyotiklere (gentamisin, neomisin, spektinomisin, netilmisin) karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir (Kawanishi *et al.* 2005; Kubilay vd 2005; Kav *et al.* Erganiş 2008).

Enrofloksasin, kinolon grubu bir antibiyotik olup duyarlı mikroorganizmaların DNA-giraz enzimini inhibe ederek bakterisid etki gösterir. Sentetik olan bu grubun diğer önemli üyeleri nalidiksik asit, ciprofloksasin, ofloksasin, norfloksasin, enoksasin ve levofloksasindir. Daha ziyade gram (-) bakteriler olmak üzere gram (+) bakterilere de etkilidirler (Anonim 2014b). Bu çalışmada bakteri suşlarının %36'sı enrofloksasine karşı dirençli bulunmuştur. Uygun nükleotit primer dizaynı yapılamadığından bu antibiyotiğe karşı direnç gelişimi genetik düzeyde tespit edilememiştir.

Kinolonlar, veterinerlik alanında ülkemizde yıllardır kullanılmaktadır. Son dönem enrofloksasin etken maddeli su ürünleri sektörünün kullanımına uygun hazırlanmış preparatlar olup alabalık işletmelerinde özellikle yavru balıklara karşı oral yolla kullanılmaktadırlar.

Çoğul antibiyotik direnç (MAR) indeksi, ortamın antibiyotiklere maruz kalmaları sonucunda ortamdaki bakterilerin bu antibiyotiklere geliştirdikleri direnç düzeyini ifade eder. Başka bir deyişle dirençli bakteri suşlarının ortamdaki varlığının yol açtığı sağlık riskinin değerlendirilmesidir. Bu değer 0,2'den yüksek olması ortamdaki dirençli bakterilerin fazla olduğu anlamına gelir (Krumperman 1983; Baeck *et al.* 2006). Bu çalışmada bakteri suşlarının ferdi MAR indeksleri 0-0,6 arasında değişirken ortalama MAR değeri ise 0,26 olarak hesaplanmıştır. Bu değer 0,2 sınır değerinin hemen üzerinde olması *L. garvieae* suşlarının izole edildikleri ortamların dirençli suşların yol açtığı kirliliğe aşırı maruz kalmadıklarını ama yine de risk içerdiğini göstermektedir.



Su *et al.* (2011), Çin'in güneyinde bulunan balık çiftliklerinden izole ettikleri *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde bu değeri 0,56 olarak rapor etmişlerdir. Baeck *et al.* (2006) yer altı ve çevre sularından izole ettikleri aynı grup bakterilerde MAR değerini 0,27 bulmuşlardır. Terzi (2013) Karadeniz Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılan alabalıklardan izole ettikleri koliform bakterilerin MAR değerlerini 0,42-0,83 arasında tespit etmiştir. Çalışmamızdaki *L. garvieae* suşlarını yerli ve Avrupa suşları olarak iki kısımda incelediğimizde MAR indeksinin yerli suşlarda eşik değerin altında kaldığı görülmektedir. Diğer çalışmalara oranla bu çalışmada MAR indeksinin düşük çıkması *L. garvieae* bakterisi ve ona karşı gelişen direnç açısından, bakterinin izole edildiği alanların şimdilik çok riskli olmadığı söylenebilir.

Plazmitler, gram (-) ve (+) bakterilerde, bazen de ökaryotlarda bulunabilen ekstra kromozomal DNA parçalarıdır. Tipik olarak dairesel ve çift sarmallı olabilen plazmitlerin boyları 1 ila 400kb arasında değişmektedir. Plazmitlerin hücrede küçük ya da büyük olmaları ile ilişkili olarak 1 ya da çok sayıda kopyaları bulunabilmektedir. Bakteri hücresinde kromozomal DNA'dan bağımsız olarak replike olabilen, antibiyotik ve ağır metal direnç genlerini bünyesinde taşıyabilen yapılardır. Hareketli elementler olduklarından taşıdıkları direnç genlerinin aynı ortamda bulunan bakteriler arasında horizontal olarak geçişine sebep olurlar (Actis *et al.* 1999). Plazmit varlığı;

- Bu ekstra kromozomal elementin çalışılan bakteri suşları arasında ne yaygınlıkta bulunduğu tespit
- İleri aşamalarda yapılabilecek PZR, restriksiyon analizi ve transformasyon denemeleri için alt yapı oluşturmak amacıyla araştırılmıştır.

Yapılan bu çalışmada 30 *Lactococcus* suşunun 2 adedinde (%6,6) plazmit tespit edilebilmiştir. Bakteriyel direnç genellikle plazmitlerin varlığı ve konjugasyon (aktarım) yeteneği ile alakalıdır. Yüksek molekül ağırlığına sahip plazmitlerin kolay konjuge olabildikleri bildirilmiştir (Lie *et al.* 1999). Mevcut çalışmada 164A/03 ve 8053 isimli suşlardan sırasıyla 9 ve 3kb'lik plazmit tespit edilmiştir. Literatürde verilen bilgi ile

doğru orantılı olarak 9kb'lik plazmit taşıyan bakteri suşu antibiyogram testi uygulanan antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençli bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Urda *et al.* (2012), insanlardan izole edilen *L. garvieae* 21881 suşunun plazmit varlığını ve moleküler yapısını araştırdıkları çalışmalarında, bu suşun yaklaşık 4,5 ile 68,7kb arası moleküler büyüklüğe sahip 5 plazmit barındırdığını tespit etmişlerdir. Detaylı sekans verileri ışığında bu plazmidlerin bazılarının bakteriyosin (bakterilerin diğer bakterileri öldürmek için ürettikleri zehirli protein) sentezi ve salınımında görevli proteinleri bazılarının ise virülans genleri (txn, orf5 ve orf25) barındırdıkları tespit edilmiştir.

Yu *et al.* (2012) yaptıkları bir çalışmada, büyük moleküler boyutta plazmite sahip bakteri suşlarının plazmit taşımayan aynı türün suşlarına göre daha patojen olduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise; enfeksiyon denemelerinde kullanılan 2 suş plazmit taşımadığı için ve plazmit barındırdığı tespit edilen 2 suşla ise enfeksiyon denemesi yapılmadığı için bu görüş teyit edilememiştir.

Literatürler incelendiğinde, sucul ortamlardan (deniz, dere suları ve balık) izole edilen *Vibrio*, *Aeromonas*, *Lactococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella* gibi bakteri türlerinin belirli sayıda ve değişik moleküler boyutlarda plazmit içerdikleri ve bunların bir kısmının aktarılabildiği bildirilmiştir (Rhodes *et al.* 2000; Schmidt *et al.* 2001; Maki *et al.* 2008; Korun *et al.* 2013; Terzi 2013). Mevcut çalışma bulgularımız diğer araştırmalar ile ters düşmektedir. Mevcut araştırmada, *L. garvieae* suşlarının çok düşük oranda plazmit taşıdıkları, dolayısı ile direnç geni aktarımının çoğunlukla kromozom vasıtası ile olabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca MAR indeks değerinin özellikle Türkiye'den izole edilen suşlarda eşik değerin altında bulunması *L. garvieae* suşlarında gen aktarımının çoğunlukla vertikal yol ile yapılabileceğini düşündürmektedir.

Gram (-) bakterilerde gen alışverişinin S pili ile, gram (+) bakterilerde ise direk temas ile gerçekleştiği bilinmektedir (Lederberg and Tatum 1946). Ayrıca plazmit

izolasyonunun Laktik Streptokoklar gibi gram (+) bakterilerde gram (-) bakterilere göre daha zor olduğu bilinmektedir (Anderson and McKay 1983).

Ülkemiz alabalık üretiminde Avrupa'nın en büyük üreticilerinden biri konumundadır. Deniz balıklarından ise özellikle çipura ve levrek üretim seviyesi oldukça yüksektir. Bazı Avrupa ülkeleri yassı balık üretimi bakımından oldukça ileri seviyede iken ülkemizde ise halen özel sektör kuruluşları bu alana yeterli ilgiyi göstermemişlerdir. Bununla beraber artan üretim, beraberinde gelen problemler ve düşen kar payları yetiştiricileri yeni tür arayışlarına itmektir. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler, önümüzdeki yıllarda balık yetiştiriciliğinde karşılaşılabilecek önemli hastalık problemlerin başında gelen lactococcosis hakkındaki bilgi boşluğunu doldurmaya yöneliktir. Buna ilaveten yapılan tez çalışması, bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için önemli bir kaynak niteliğindedir. Bu tez çalışması sonucunda, levrek ve kalkan balıklarının *L. garvieae*'ya karşı dirençli bulunması balık yetiştiriciliği açısından sevindirici bulunmuştur. Bu tez çalışmasında;

1. Ekonomik öneme sahip balık türlerinin, önemli balık patojeni olan *L. garvieae*'ye karşı duyarlılıkları,
2. Bakteri suşlarının antibiyotik direnci,
3. Direnç genleri ve plazmit profilleri araştırılmıştır. Araştırmadan çıkarılabilecek sonuçlar ve öneriler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. Bir salgından elde edilen *L. garvieae* (Lgper) suşunun yavru Gökkuşığı alabalıkları üzerindeki virülansı referans suş ile karşılaştırıldığında yüksek bulunmuştur. Çiftlik şartları göz önüne alındığında bu bakterinin tek başına çok önemli ekonomik kayıplara yol açabileceği düşünülmeli ve önlemler alınmalıdır.
2. Karadeniz alabalığı bu etkene karşı en az Gökkuşığı alabalıkları kadar duyarlıdır. Üretimi yapılan alanlarda bu husus dikkate alınmalıdır.
3. Kalkan ve deniz levreği *L. garvieae*'ye karşı dirençli bulunmuştur. Yalnız bu balık türleri klinik belirti göstermeksizin etkeni taşıyabilmektedirler. Asemptomatik taşıyıcıların hastalık bulaştırmada önemli bir vektör oldukları unutulmamalıdır.

4. *L. garvieae* suşları penisilin, ampisilin, florfenikol, amoksisilin ve tetrasikline karşı duyarlı, gentamisin ve trimethoprim+sulfonamid antibiyotiklerine karşı ise dirençli bulunmuşlardır. Tedavide özellikle florfenikol ve  $\beta$ - laktam grubu antibiyotiklerden yararlanılmalıdır.
5. *L. garvieae* suşlarında kloramfenikol, tetrasiklin ve eritromosin antibiyotiklerini kodlayan sırasıyla *cmlA*, *tetB* ve *ereB* direnç genleri yaygın olarak tespit edilmiştir. Bu antibiyotiklerin geçmişten bugüne yoğun ve bilinçsiz olarak kullanılmasının suçlu çevrede oluşturduğu tahribat dikkate alınarak en azından şimdilerde kullanıma yeni başlanan antibiyotiklerin seçimi ve kullanımı konusunda bilinçli olunmalıdır.
6. Tüm *Lactococcus* suşlarında plazmit varlığı titizlikle araştırılmış ancak 2 suşta izole edilebilmiştir. Antibiyotik direnç genlerinin mikroorganizmalar arası geçişi çoğunlukla kromozom vasıtası ile gerçekleştiği düşünülmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Actis, L.A., Tolmasky, M.E and Crosa, J.E., 1999. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds, *Frontiers in Bioscience*, 4, 43-62.
- Afonso, A., Silva, J. and Gomes, S., 2003. *Lactococcus garvieae* trout infections in Portugal: a new challenge on fish vaccinology. *IBMC News*, p. 4–6.
- Aguirre, M. and Collins, M.D., 1993. Lactic Acid Bacteria and Human Clinical Infection. *Jornal of Applied Bacteriology*, 75, 95–107.
- Algöet M., Bayley A.E., Roberts E.G., Feist S.W., Wheeler R.W. and Verner-Jeffreys, D.W., 2009. Susceptibility of selected freshwater fish species to a UK *Lactococcus garvieae* isolate. *Journal of Fish Diseases*, 32, 825-834.
- Altınok, İ. and Kurt, I., 2003. Molecular diagnosis of fish diseases: a Review *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3: 131-138.
- Altınok, I., 2011. Multiplex PCR Assay for Detection of Four Major Bacterial Pathogens Causing Rainbow Trout Disease. *Diseases Aquatic Organism*, 93, 199–206.
- Altınok, I., Grizzle, J.M. and Liu, Z., 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Diseases Aquatic Organism*, 44: 29–34.
- Altun, S., Diler, O. and Adiloğlu, A.K., 2004. Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16S rDNA sequencing. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 24,119-125.
- Altun, S., Kubilay, A., Ekici, S., Didinen, B. and Diler, Ö. 2010. Oral Vaccination Against Lactococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using Sodium Alginate and Poly (lactide-co-glycolide) Carrier. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16: 211-217.
- Anderson, A.D., Nelson.J.M., Rossiter, J. and Angulo, F.J., 2003. Public Health Consequences of Use of Antimicrobial Agent in Food Animals in the United States. *Microbiol Drug Resistance*, 9, 373-379.
- Anderson, D.G. and McKay, L.L., 1983. Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic *Streptococci*, *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 3, 549-552.
- Anderson, D.G. and McKay, L.L., 1983. Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 3, 549-552.
- Angulo, F.J., Nargund, V.N. and Chiller, T.C., 2004. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *Journal of Veterinary Medicine*, 51, 374-379.
- Anonim 2014a. [www.metafizikbilgiler.com](http://www.metafizikbilgiler.com). Erişim tarihi: 10.06.2014
- Anonim 2014b. [kbb.uludağ.edu.tr/antibiyotikler](http://kbb.uludağ.edu.tr/antibiyotikler). Erişim tarihi: 13.02.2014.
- Aoki, T., 1992. Present and future-problems concerning the development of resistance in aquaculture: From Theory to Reality, *Chemotherapy in Aquaculture*, p. 254–262.

- Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., Silvestri, G., Vignaroli, C. and Clementi, F., 2007. Isolation and molecular characterization of antibiotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine meat products. *Journal of Food Protection*, 70 (3) 557–565.
- Arda, M., 1985. Genel Bakteriyoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 3. baskı. 402, 489-503.
- Arthur, M., Autissier, D. and Courvalin, P., 1986. Analysis of the nucleotide sequence of the *ereB* gene encoding the erythromycin esterase type II. *Nucleic Acids Research*, 14: 4987–4999.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1999. *Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish*, Third Edition, Chichester, UK: Springer-Praxis.
- Avcı, H., Aydoğan, A., Tanrikul, T.T. and Birincioglu, S.S., 2010. Pathological and microbiological investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with *Lactococcus garvieae*. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16: 313-318.
- Avcı, H., Birincioglu, S.S., Tanrikul, T.T., Epikmen, E.T., Metin, N. and Arsever, M.L., 2013. Experimental *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792: a comparative histopathological and immunohistochemical study. *Journal of Fish Diseases*, 37 (5), 481-495.
- Aydın, I., Işdan, H., Küçük, E. ve Polat H., 2011. Diploid (2n) ve triploid (3n) Karadeniz kalkan balığının yetiştiricilik performansının karşılaştırılması: büyüme, üreme, anormallikler, et kalitesi ve hastalıklara karşı duyarlılık. Tübitak 1001 Proje Sonuç Raporu.
- Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K. and Park, S.C., 2006. Isolation and Characterization of *Streptococcus sp.* from Diseased Flounder (*Paralichthys olivaceous*) in Jeju Island. *Journal of Veterinary Science*, 7, 53–58.
- Balta, F., Sandallı, C., Kayış, Ş. and Özgümüş, O.B., 2010. Moleküler Analysis of Antimicrobial Resistance in *Yersinia ruckeria* Strains Isolated from Rainbow trout Grown in Commercial Fish Farms in Turkey. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 30, 211-219.
- Baquero, F., Martinez, J.L. and Canton, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 260–265.
- Barakat, R.K., Griffiths, M.W. and Haris, L.J., 2000. Isolation and Characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus spp.* from cooked, modified atmosphere, packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 83–94.
- Bark, S. and 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. and Ellis, A.E., 2002. Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsule and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Fish Shell Immunology*, 12:155–168.
- Bercovier, H., Ghittino, C. and Eldar, A., 1997. Immunization with bacterial antigens: infection with *streptococci* and related organisms. *Developments in biological standardization*, 90: 153–160.

- Boran, H., Terzi, E., Altinok, I., Capkin, E. and Bascinar, N., 2013. Bacterial diseases of cultured Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) in sea cages. *Aquaculture*, 8–13, 396–399.
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., *et al.* 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: Its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15: 1917–1942.
- Campacnolo, E.R., Johnson, K.R., Karpati, A., Rubin, C.S., Kolpin, D.V. *et al.*, 2002. Antimicrobial Residues in Animal Waste and Water Resources Proximal to Large-Scale Swine and Poultry Feeding Operations. *Science of the Total Environment*, 299, 89-95.
- Carattoli, A., 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32: 243–259.
- Carson, J., Gudkovs, N. and Austin, B., 1993. Characteristics of an *Enterococcus*-like Bacterium from Australia and South Africa, Pathogenic for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 6, 381–388.
- Carvalho, M.G., Vianni, M.C., Eliot, J.A., Reeves, M., Facklam, R.R. and Teixeira, L.M., 1997. Molecular Analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* Isolated from Water Buffalos with Subclinical Mastitis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 418, 401–404.
- Chang, P.H., Lin, C.W. and Lee, Y.C., 2002. *Lactococcus garvieae* infection of cultured Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and Associated biophysical characteristics and histopathology. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 22, 319–327.
- Charpentier, E., Gerbaud, G. and Courvalin, P., 1993. Characterization of a new class of tetracycline-resistance gene tet(S) in *Listeria monocytogenes* BM4210. *Gene*. 131, 27–34.
- Chen, S.C., Liaw, L.L., Su, H.Y., Ko, S.C., Wu, C.Y. and Chaung, H.C., 2002. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in Grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, 25, 727–732.
- Chen, S.C., Lin, Y.D., Liaw, L.L. and Wang, P.C., 2001. *Lactococcus garvieae* Infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by PCR and 16S rDNA Sequencing. *Diseases Aquatic Organism*, 45, 45–52.
- Cheng, W. and Chen, J.C., 1998. Effect of cultivation broth pH, temperature and NaCl concentration on virulence of an *Enterococcus*-like bacterium to the giant freshwater prawn. *Diseases Aquatic Organism*, 36: 233–237.
- Cheng, W., Liu, C.H. and Chen, J.C., 2002. Effect of nitrite on interaction between the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its pathogen *Lactococcus garvieae*. *Diseases Aquatic Organism*, 50: 189–97.
- Chopra, I. and Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232–260.
- CLSI, 2011. Clinic Laboratory Standart Institute, Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty first Informational Supplement.
- Courvalin, P.M., Carlier, C. and Chabbeirt, Y.A., 1972. Plasmid-linked tetracycline and erythromycin resistance in group D "Streptococcus." *Annales de l'Institut Pasteur Paris*, 123: 755-759.

- Çağırğan, H. ve Tanrıkul, T.T., 1995. Türkiyedeki Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*, W.) Çiftliklerinde Yeni Bir Sorun: Enterococcus Benzeri Bir Bakteri Enfeksiyonu. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi, 19, 33, 9-19.
- Çağırğan, H. ve Tokşen, E., 1996. Yurdumuzda Kültürü Yapılan Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) Juvenillerinde İlk Defa Görülen *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflagellata) İnfestasyonu. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 27, 197-205.
- Çağırğan, H. ve Yüreklitürk, O., 1996. Kültürü Yapılan Çipura (*Sparus aurata* L.) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) Balıklarında Görülen Bakteriyel Hastalıkların Teşhis ve Tedavisi Üzerine bir Araştırma. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi, 21, 113-122.
- Çağırğan, H., 2004. Biotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated from Turkey. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 21, 3-4, 267-269.
- Çağırğan, H., 2009. The use of veterinary drugs and vaccines in Turkey, CIHEAM, Options Méditerranéennes, 86, 29- 34.
- Çakmak, E., Kurtoğlu, İ.Z., Çavdar, Y., Aksungur, N., Firidin, S. vd, 2007. Karadeniz Alabalığı Yetiştiriciliği ve Balıklandırma Amacıyla Kullanımı. TAGEM/HAYSÜD/2001/07/01/20.
- Dancer, S.J., Shears, P. and Platt, D.J., 1997. Isolation and Characterization of Coliforms from Glacial Ice and Water in Canada's High Arctic. Journal of Applied Microbiology, 82, 597-609.
- Di Salvo, A., Della Rocca, G., Terzetti, E. and Malvisi, J., 2013. Florfenicol depletion in edible tissue of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and sea bream, *Sparus aurata* L. Journal of Fish Diseases, 36(8): 685-693.
- Diler, O., Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A. and Işıklı, B., 2002. First Occurrence of Streptococcosis Affecting Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Bulletin European Association of Fish Pathologists, 22, 21-25.
- Dixon, P.F., Smail, D.A., Algoët, M., Hastings, T.S. and Bayley, A. 2012. Studies on the effect of temperature and pH on the inactivation of fish viral and bacterial pathogens. Journal of Fish Diseases, 35: 51-64.
- Domenech, A., Prieta, J., Fernandez-Garaizabal, J.F., Collins, M.D., Jones, D. and Dominguez, L., 1993. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *L. garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. Microbiologia, 9: 63-68.
- Durmaz, Y., Onuk, E.E. and Çiftçi, A., 2012. Investigation of the Presence and Antibiotic Susseptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* in Rainbow trout Farms in the Middle and Eastern Black Sea Regions of Turkey. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 59, 141-146.
- Elander, R.P., 2003. Industrial production of beta-lactam antibiotics. Applied microbiology and biotechnology, 61 (5-6): 385-392.
- Eldar, A. and Ghittino, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): similar but different diseases. Diseases Aquatic Organism, 36: 227-231.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bvozzetz, E. and Gorla, M., 1996. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *L. garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. Current Microbiology, 32: 85-98.



- Eldar, A., Horovitz, A. and Bercovier, H., 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 56: 175–83.
- Elliot, J.A. and Facklam, R.R., 1996. Antimicrobial Susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a Proposed Method to Discriminate between Them. *Journal of Clinical Microbiology*, 34,5, 1296–1298.
- Elliot, J.A., Collins, M.D., Pigott, N.E. and Facklam, R.R., 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 20: 2731–2734.
- Evans, J.J., Klesius, P.H. and Shoemaker, C.A., 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplathystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *Journal of Fish Diseases*, 32, 943–951.
- Ewart, K.W., Williams J., Richards R.C., Gallant J.W., Melville K. and Douglas S.E., 2008. The early response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages exposed in vitro to *Aeromonas salmonicida* cultured in broth and fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 32, 380-390.
- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D.G. and Chilmonczyk, S., 2004. Clonality and diversity of the Fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean Countries. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 5132–5137.
- Finney, D.K., 1971. *Probit Analysis*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Fukuda, Y., Maita, M., Satoh, K., Yamamoto, H., Okamoto, N. and Ikeda, Y., 1997. Effects of dissolved oxygen concentration on experimental horizontal transmission of induced by artificial infection with *Enterococcus seriolicida* in yellowtail. *Fish Pathology*, 32: 43–49.
- Geldiay, R. ve Balık, S., 1996. *Türkiye Tatlı su Balıkları*, 2. baskı, Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Griffiths, R.P., Moyer, C.L., Caldwell, B.A., Ye, C. and Morita, R.Y., 1990. Long-Term Starvation-Induced Loss of Antibiotic Resistance in Bacteria. *Microbial Ecology*, 19, 251-257.
- Guglielmetti, E., Korhonen, J.M., Heikkinen, J., Morelli, L. and Wright, A., 2009. Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. *FEMS*, DOI:10.1111/j.1574-6968.2009.01512.x
- Hall, R.M. and Collis, C.M., 1995. Mobile Gene Cassettes and Integrons. Capture and Spread of Genes by Site-Specific Recombination. *Molecular Microbiology*, 15, 593-600.
- Holten, K.B. and Onusko, E.M., 2000. Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics". *American Family Physician*, 62 (3): 611–620.
- Iglesias, R., Paramál, A., Alvarez, M.F., Leiro, J., Fernández, J. and Sanmartín, M.L., 2001. *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Diseases Aquatic Organism*, 46: 47–55.
- Işıdan, 2010. Karadeniz Bölgesindeki Balıklarda Viral Hemorrajik Septisemi Virüsünün İzolasyonu ve Patojenitelerinin Belirlenmesi. T.C. Fırat Üniversitesi Virolji Anabilim Dalı, Doktora tezi.

- Işıdan, H. and Bolat, Y., 2011. A survey of viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 11, 507-513.
- Itami, T., Kondo, M., Suganuma, A., Abe, T., Nakagaw, A. and Suzuki, N., 1996. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 19: 185–192.
- Izumiya, H., Sekizuka, H., Nakaya, H., Taguchi, M., Oguchi, A., Ichikawa N. *et al.* 2011. Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome, *Antimicrobiol Agents Chemotherapy*, 55, 623–630.
- Kang, S., Shin, G., Shin, Y., Palaksha K. J., Kim, Y., Yang, H., *et al.*, 2004. Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*) *Jornal of Veterinary Sciences*, 5(4), 387–390.
- Katao, H., 1982. Erithromycin: the application to streptococcal infections in yellowtails. *Fish Pathology*, 17, 77-82.
- Kav, K. ve Erganiş, O., 2007. Konya Bölgesinde Bulunan Gökkuşacağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Çiftliklerinden *L. garvieae* İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Veteriner Bilimler Dergisi*, 23, 3, 7-17.
- Kav, K. and Erganiş, O., 2008. Antibiotic Susceptibility of *Lactococcus garvieae* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Farms. *Bulletin Veterinary Institute in Pulawy*, 52, 223-226.
- Kawanishi, A., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M., Takahashi T, *et al.*, 2005. Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Letter Applied Microbiology*, 40: 322–328.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Kijima M., Yagy, K. *et al.*, 2007. Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG+ phenotype, lack of virulence and absence of a capsule. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 5, 481–487.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Yagashiro, S., Kijima, M., Yagy, K., Nakai, T., Murakami, M., Morita, H. and Suzuki, S., 2006. Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 496–504.
- Kayış, S., Capkin, E., Balta, F. and Altinok, I., 2009. Bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the southern Black Sea Region of Turkey - A survey. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 61, 339-344.
- Kern, M.B., Klemmensen, T., Frimodt-Moller, N. and Espersen, F., 2002. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 513–516.
- Kim, S.R., Nonaka, L. and Suzuki, S., 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 147–156.

- King, J.A., Snow, M., Skall, H.F. and Raynard, R.S., 2001. Experimental susceptibility of Atlantik salmon *Salmo salar* and turbot *Scophthalmus maximus* to European freshwater and marine isolates of *viral haemorrhagic septisemia virus*. Diseases Aquatic Organism, 47: 25-31.
- Kitao, T., Aoki, T. and Iwata, K., 1979. Epidemiological study on streptococcosis of cultured yellowtail. Distribution of *Streptococcus spp.* In sea water and muds around yellowtails farms. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 45: 567-572.
- Kitao T., 1982. The methods for detection of *Streptococcus spp.* causative bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Fish Pathology, 17: 17-26.
- Korun, J., İnce, A.G. and Karaca, M., 2013. Antibiotic Resistance and Plasmid Profile of *Vibrio alginolyticus* Strains Isolated from Cultured Sea bass, Bulletin Veterinary Institute in Pulaws, 57, 173-177.
- Krumperman, P.H., 1983. Multiple antibiotic resistance indexin of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Applied and Environmental Microbiology, 461, 165-170.
- 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. and Hamaguchi, M., 1989. Determination of the median lethal dose of cell-associated toxins from *Streptococcus sp.* in the yellowtail. Bulletin European Associated Fish Pathologie, 9: 117-125.
- Kusuda, K., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. and Fryer, J.L., 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a Fish Pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 406-409.
- Kusuda, R. and Kawai, K., 1998. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. Fish Pathology, 33, 221-227.
- Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the Aquatic Environment, a review. Part I, Chemosphere, 754, 417-434.
- Leblanc, D.J. and Lee, L.N., 1979., Rapid Screening Procedure for Detection of Plasmids in *Streptococci*. Journal of Bacteriology, 140 (3), 1112-1115.
- Ledenberg, J. and Tatum, E.L., 1946. Gene Recombination in *Escherichia coli*, Nature, 158, 558-560.
- Lee, DC., Lee, JI., Park CI. and Park, S.I., 2001. The study on the causal agent of streptococcosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fish. Journal of Fish Pathologist, 14: 71-80.
- Leiro, J., Toranzo, A.E., Estevez, J., Lamas, J., Barja, J.L. and Uberia, F.M., 1996. The humoral immune response of turbot to recently isolated pathogenic *Enterococcus* strains. Cross-reactivity with other Gram-pozitive bacteria. Veterinary Microbiology, 48, 29-39.
- Levy, S.B., McMurray, L.M., Barbosa, T.M., Burdett, V., Courvalin, P. and Hillen, W., 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43, 1523-1528.
- Li, J., Yie, J., Foo, R.W.T., Ling J.M.L., Xu, H. and Woo N.Y.S., 1999. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarpa*. Marine Pollution Bulletin, 39, 245-249.

- Li, X.Z., Mehrotra, M. and Ghimire, S., 2007.  $\beta$ -Lactam Resistance and  $\beta$ -lactamases in Bacteria of Animal Origin, *Veterinary Microbiology*, 121, 197-214.
- Liu, Y.F., Wang, CH. and Janapatla, R.P., 2007. Presence of Plazmid Pa 15 Correlates with Prevalence of Constitutive MLSB Resistance in Group A Streptococcal Isolates at a University Hospital in Southern Taiwan, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 1167-1170.
- Maki, T., Hirono, I., Kondo, H. and Aoki, T., 2008. Drug resistance mechanism of the fish-pathogenic bacterium *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases*, 31(6): 461-468.
- Mata, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M., Dominguez, L. and Fernandez-Garaizabal, J.F., 2004. Multiplex PCR Assay for Detection of Bacterial Pathogens Associated with Warm-Water Streptococcosis in Fish Applied *Environmental Microbiology*, 70, 3183-3187.
- Miyauchi, E., Toh, H., Nakano, A., Tanabe, S. and Morita, H. 2012. Comparative Genomic Analysis of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Different Sources Reveals Candidate Virulence Genes. *International Journal of Microbiology*. doi:10.1155/2012/728276, 7 p.
- Munro, P.D., Barbour, A. and Birkbeck, T.H., 1995. Comparison of the Growth and Survival of Larval Turbot in the Absence of Culturable Bacteria with Those in the Presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a Marine *Aeromonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4425-4428.
- Muziasari, W.I., Managaki, S., Pärnänen, K., Karkman, A., Lyra, C., Tamminen, M., Suzuki, S. and Virta, M., 2014. Sulphonamide and Trimethoprim Resistance Genes Persist in Sediments at Baltic Sea Aquaculture Farms but Are Not Detected in the Surrounding Environment. *PLoS ONE* 9 (3): e92702. doi:10.1371/journal.pone.0092702.
- Muzquiz, J.L., Royo, F.M., Ortega, C., Blas, I., Ruiz, I. and Alonso, J.L., 1999. Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence of age of diseased fish. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 19: 114-119.
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K.H., Matsuoka, S., Mori, K., Nishioka, T. *et al.*, 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases Aquatic Organism*, 37: 33-41.
- Ng, L.K., Martin, I., Alfa, M. and Mulvey, M., 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and cellular probes*. 15, 209-215.
- Nishizawa, T., Savas, H., Işdan, H., Üstündağ, C. Iwamoto, H. and Mamoru Yoshimizu, M., 2006. Genotyping and Pathogenicity of *Viral Hemorrhagic Septicemia Virus* from Free-Living Turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish Coastal Area of the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4: 2373-2378.
- Olesen, I., Hasman, H. and Aarestrup, F.M., 2004. Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 10, 334-340.
- Ounissi, H. and P. Courvalin., 1985. Nucleotide sequence of the gene *ereA* encoding the erythromycin esterase in *Escherichia coli*. *Gene* 35: 271-278.
- Öğüt, H. and Altuntas, C., 2011. Virulence of Viral Haemorrhagic Septisemia Virus (VHSV) genotype Ie on fry of three trout species: black sea trout (*Salmo trutta*

- labrax*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Bulletin European Association of Fish Pathologists, 31(4), 139.
- Öztürk, R.Ç. and Altınok, I., 2014. Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14: 275-297.
- Palacios, M.A., Zamora, M.J., Vasquez, J., Zamora, E. and Duran, A., 1993. Streptococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. Bull. Soc. It Patol Ittica., 13, 11–16.
- Palmer, K.L., Kos, V.N. and Gilmore, M.S., 2010. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. Current Opinion in Microbiology, 13, 632–639.
- Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A.E. and Romalde, J.L., 2004. *Lactococcus garvieae*, an Emerging Pathogen for The Portuguese Trout Culture. Bulletin European Association of Fish Pathologists, 24, 274–279.
- Pot, B., Devriese, L.A., Ursi, D., Vandamme, P., Haesebrouck, F. and Kersters, K., 1996. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. Systematic and Applied Microbiology, 19: 213–222.
- Prieta, J., Domenech, A.M., Fernandez-Garaizabal, J.F., Collins, M.D., Rodrigues, U.M. and Jones, D., 1993. Lactococcosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Medicine, (10): 367–373.
- Raissy, M. and Ansari, M., 2011. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran fish farms. African Journal of Biotechnology, 10 (8), 1473-1476.
- Ravelo, C., Magarinos, B., Romalde, J.L. and Toranzo, A.E., 2001. Convencional versus miniaturizad systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. Bulletin European Association of Fish Pathologists, 21, 136–144.
- Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., McGann, P., Hiney, Maura., Smith, P. and Pickup, R.W., 2000. Distribution of Oxytetracycline Resistance Plasmids between Aeromonads in Hospital and Aquaculture Environments: Implication of Tn1721 in Dissemination of the Tetracycline Resistance Determinant Tet A. Applied and Environmental Microbiology, 66 (9), 3883–3890.
- Robert, M.C., 2005. Update on Acquired Tetracycline Resistance Genes, FEMS Microbiology Letters, 43, 2823-2830.
- Robert, M.C., 2008. Update on Macrolide-Lincosamide-Streptogramin, Ketolide, and Oxazolidone Resistance Genes, FEMS Microbiology Letters, 282, 147-159.
- Rodriguez-Ramilo, S.T., Toro, M.A., Bouza, C., Hermida, M., Pardo, B.G. *et al.*, 2011. QTL detection for *Aeromonas salmonicida* resistance related traits in turbot (*Scophthalmus maximus*). BMC Genomics, 12: 541-547.
- Ronald, N.J., Donald, E.L. and Michael, A.P., 1999. Epidemiologic trends in nosocomial and community-acquired infections due to antibiotic-resistant gram-positive bacteria: the role of streptogramins and other newer compounds. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 33, 101-112.
- Ryan, K.J. and Ray, C.G., 2004. Sherris Medical Microbiology, 4th Edition. McGraw Hill. pp. 322–324. ISBN 0-8385-8529-9.
- Saenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J. and Torres, C., 2004. Mechanisms of resistance in multiple antibiotic-resistant *Escherichia coli*

- strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48, 3996–4001.
- Sandallı, C., Özgümüş, O.B. and Sevim, A., 2010. Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline-resistant *Enterobacteriaceae* obtained from a coliform collection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (11), 2099-2103.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M.D. and Fischer, W., 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related *streptococci* to the genus *Lactococcus* gen nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6: 183–195.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K. and Larsen, J.L., 2000. Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. *Applied And Environmental Microbiology*, 66: 11, 4908–4915.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Larsen, J.L. and Dalsgaard, I., 2001. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 735–743.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B. and Obst, U., 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43, 325-335.
- Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R. and Khan, A.U., 2008. Aminoglycosides Versus Bacteria, A Description of the Action, Resistance Mechanism and Nasocomial Battleground, *Journal of Biomedical Sciences*, 15, 5-15.
- Sköld, O., 2001. Resistance to Trimethoprim and Sulfonamides, *Veterinary Research*, 32, 261-273.
- Su, H.C., Ying, G.G. Tao, R., Zhang, R.Q., Fogarty, L.R. *et al.*, 2011. Occurrence of Antibiotic Resistance and Characterization of Resistance Genes and Integrons in *Enterobacteriaceae* Isolated from Integrated Fish Farms in South China, *Journal of Environmental Monitoring*, 13,11, 3229-3236.
- SUMAE, 2012. TR90 Doğu Karadeniz Bölgesi Su Ürünleri Sektör Raporu, TR90/11/DFD/21, 105s.
- Sunde, M. and Nordstrom, M., 2006. The prevalence of associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 741-747.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Kamradt, A.T. and Wondrack, L., 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 11: 2562.
- Tanrikul, T.T. and Gültepe, N., 2011. Mix infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walborn) *Lactococcus garvieae* and *Vibrio anguillarum* O1. *Jornal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 1019-1023.
- Teixeira, L.M., Merquior, V.L., Vianni, M.C, Carvalho, M.G. *et al.*, 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *International journal of systematic bacteriology*, 46: 664–668.

- Tenover, F.C., 2006. Mechanism of Antimicrobial Resistance in Bacteria, *American Journal of Infection Control*, 34, 5, 3-10.
- Terzi, E., 2013. Alabalık İşletmelerinden İzole Edilen Bakterilerde Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi. Doktora tezi, KTU, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Timur, G., Yardımcı, R.E., Ülkü, Ç. ve Çanak, Ö., 2011. Marmara Bölgesi Kültür Gökkuşığı Alabalıklarında Lactococcosis'in Bakteriyojik ve Histopatolojik Metotlarla Teşhisi. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 26: 63-81.
- Toranzo, A.E., Magarinos, B. and Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246, 37– 61.
- TUİK, 2012. Türkiye İstatistik Kurumu. [www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr). Erişim tarihi: 16.09.2013.
- TUİK, 2013. Türkiye İstatistik Kurumu. [www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr). Erişim tarihi: 08.03.2014.
- Türe, M., Altınok, İ., Işıdan, H., Savaş, H. ve Kutlu, İ., 2012. PFGE Metodu Kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin Genetik Çeşitliliğinin ve Yayılımının Belirlenmesi Projesi. TAGEM/HS/10/09/02/179, s: 61.
- Ture, M., Altınok, I. and Capkin, E., 2015. Comparison of PFGE and ERIC-PCR and biochemical tests to characterize *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases*, 38, 37-47.
- Urda, M.A., Gibello, A., Blanco, M.M., Lopes-Campos, G.H., Cutili, M.T. and Fernandez-Garayzabal, J.F., 2012. Characterization of Plasmids in a Human Clinical Strain of *Lactococcus garvieae*. *PLoS ONE* 7(6): e40119. doi:10.1371/journal.pone.0040119.
- Van Dongen, M.B.M., Van Diemen, A.E.R., Staarman, I.K. and Piera, T., 2008. Antibiotic Resistance in Bacteri from Farmed Fish and Shrimps, Inno Tact Consulting B.V. Netherland, 53 s.
- Van, T.T.H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L.T. and Coloe, P.J., 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 217–223.
- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A. and 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3791–3795.
- Vendrell, D., Balcazar, J.L., Zarzuela, I.R., de Blas, I., Girones, O. and Muzquiz, J.L., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review, *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 29, 177–198.
- Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. and Moschetti, G., 2001. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 430–439.
- Walther, C., Rossano, A., Thomann, A. and Vincent, P., 2008. Antibiotic resistance in Lactococcus species from bovine milk: Presence of a mutated multidrug transporter mdt(A) gene in susceptible *Lactococcus garvieae* strains. *Veterinary Microbiology*, 131, 348–357.
- Wang, C.Y.C., Shie, H.S., Chen, S.C. Huang, J.P., Hsieh, I.C. *et al.*, 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *International Journal of Clinical Practice*, 61, 1, 68–73.

- Werkman, M., Murray, A.G., Munroc, L.A., Turnbull, J.F. and Green, D.M., 2014. Seasonality in live fish movements and its effects on epidemic dynamics. *Aquaculture*, 72, 78, 418–419.
- WHO, 2012. Fact sheet N: 194: Antimicrobial Resistance. <http://www.who.int/medicentre/factsheet/fs194/en/index.html>.
- Wright, G.D., 2007. The Antibiotic Resistome: The Nexus of Chemical Genetic Diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 3, 175-186.
- Wright, G.D., 2010. Antibiotic Resistance in the Environment: A Link to the Clinic. *Current Opinion in Microbiology*, 13,5, 589-594.
- Yoshida, T., Endo, M., Sakai, M. and Inglis, V., 1997. A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Disease of Aquatic Organisms*, 29, 3, 233–235.
- Yu, J.E., Cho, M.Y., Kim, J. and Kang, H.Y., 2012. Large antibiotic-resistance plasmid of *Edwardsiella tarda* contributes to virulence in fish, *Microbial Pathogenesis*, 52 (5), 259-266.
- Zengin, M., Gümüş, A. and Bostancı, D., 2006. Age and growth of the Black Sea turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Scophthalmidae), estimated by reading otoliths and by back-calculation. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 374-381.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. and Bercovier H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 983–995.



## ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini aynı ilde tamamladı. 1994 yılında kayıt olduğu İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1999 yılında mezun oldu. 2001-2006 yılları arasında, özel sektörde çalıştı. 2015 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimini tamamlayan yazar evli ve 2 çocuk babasıdır.

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde 2006 yılından bu yana Veteriner Hekim olarak görev yapmaktadır.