



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

***LACTOCOCCUS GARVİEAE* İZOLATLARININ  
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLLERİNİN FENOTİPİK  
VE GENOTİPİK OLARAK BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İlker HANCI**

**Samsun  
Temmuz-2018**





ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

***LACTOCOCCUS GARVİEAE* İZOLATLARININ  
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLLERİNİN FENOTİPİK  
VE GENOTİPİK OLARAK BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İlker HANCI**

**Danışman  
Doç. Dr. Ertan Emek ONUK**

**Samsun  
Temmuz-2018**

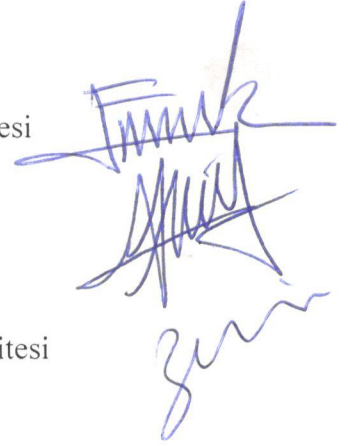
T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İlker HANCI tarafından Doç. Dr. Ertan Emek ONUK danışmanlığında hazırlanan “*Lactococcus garvieae* izolatlarının antimikrobiyal direnç profillerinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 25/07/2018 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Ertan Emek ONUK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye: Doç. Dr. Banu YARDIMCI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye: Doç. Dr. Behire Işıl DİDİNEN, Süleyman Demirel Üniversitesi  
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)



ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / .... / .....

**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimin ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, tez konusunun seğilmesinde ve çalışmaların yürütülmesinde büyük katkısını gördüğüm tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ertan Emek ONUK'a, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Belgin SIRIKEN, Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ, Doç. Dr. Banu YARDIMCI'ya ve eşim Hülya HANCI'ya destekleri için sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.17.013 proje numarası ile desteklenmiştir.

## ÖZET

### **LACTOCOCCUS GARVIEAE İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ PROFİLLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK BELİRLENMESİ**

**Amaç:** Antimikrobiyel ajanların su ürünleri yetiştiriciliğindeki yoğun ve bilinçsiz kullanımı sucul ortamda antibiyotik dirençli bakterilerin ve antibiyotik direnç genlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda su ve sediment antibiyotik direnç genleri için rezervuar durumuna dönüşebilir ve bu genler horizontal gen transferi ile insan ve balık patojenleri arasında yayılabilirler. Bu tez ile ülkemiz su ürünleri sektöründe, özellikle, alabalık işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olan *L. garvieae* izolatlarının antibiyotik direnç durumlarının, direnç ile ilgili bazı genetik yapıların (antibiyotik direnç genleri) ve izolatlar arası ilişkilerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş 25 *L. garvieae* izolatının 14 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. İzolatların sahip oldukları çeşitli antibiyotik direnç genlerinin varlığı spesifik primer çiftlerinin kullanıldığı PCR metodu ile belirlendi. Ayrıca izolatlar arasındaki olası klonal ilişkiler RAPD-PCR metodu ile ortaya konuldu.

**Bulgular:** *L. garvieae* saha izolatlarının çalışmada kullanılan 14 farklı antibiyotiğe karşı değişik düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlendi. İzolatların tamamının en az 4 farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, bir izolatın ise 9 farklı antibiyotiğe karşı direnç ile en yüksek direnç profiline sahip olduğu belirlendi. İzolatlardan birinin (%4) *suI* direnç genine, altısının (%24) *suII* direnç genine ve bir izolatın (%4) *tetD* direnç genine sahip olduğu belirlendi. İzolatların ERIC2 primeri ile 3 farklı genotipe ayrıldığı ve izolatların büyük bir bölümünün (16 izolat) baskın tip olan LG2 genotipine dahil olduğu belirlendi.

**Sonuç:** Çalışmada çoklu ilaç direncinin yüksek oranda saptanması balık hastalıklarının tedavisinde uygun antimikrobiyel ajanların seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik; Antibiyotik direnç geni; Genotiplendirme; *L. garvieae*

**İlker HANCI, Yüksek Lisans Tezi  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Temmuz - 2018**

## ABSTRACT

### PHENOTYPIC AND GENOTYPIC DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE FOR *LACTOCOCCUS GARVIEAE* ISOLATES

**Aim:** The intense and unconscious use of antimicrobial agents in aquaculture results in the occurrence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes (ARGs). In such cases, water and sediment may become a reservoir for ARGs and these genes can be transferred horizontally among fish and human pathogens. This thesis is mainly aim to determine antibiotic resistance profiles and some genetic structures that related resistance (ARGs) and relationships among the *L. garvieae* isolates which causes important economical losses in Turkish aquaculture industry, especially trout industry.

**Material and Method:** Antimicrobial activity of 25 *L. garvieae* strains isolated from different regions of Turkey was determined by disk diffusion method against the 14 different antibiotics. Presence of various antibiotic resistance genes in the isolates was determined by PCR method with specific primers. Additionally, possible clonal relationships between isolates was demonstrated by the RAPD-PCR method

**Results:** *L. garvieae* field isolates were found to have antimicrobial activity at different levels against 14 different antibiotics used in the study. All isolates have resistant to at least 4 different antibiotics, also one isolate had the highest resistance profile with resistance to 9 different antibiotics. It was determined that one of the isolates (4%) has *SulI* resistance gene, six (24%) of isolates have the *sulII* resistance gene and one isolate (4%) has *tetD* resistance gene. It was determined that the isolates were divided into 3 different genotypes by the ERIC2 primer and large amount of the isolates (16 isolates) have involved dominant type LG2 genotype.

**Conclusion:** Detection of high rate multi-drug resistance in the study, suggested that selection of appropriate antimicrobial agents is important for treatment of fish diseases.

**Keywords:** Antibiotic; Antibiotic resistance gene; Genotyping; *L. garvieae*

**İlker HANCI, Master's Thesis**  
**University of Ondokuz Mayıs - Samsun, July-2018**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µM</b>	: Mikromol
<b>AM</b>	: Ampisilin
<b>AX</b>	: Amoksisilin
<b>BHIA</b>	: Brain Heart Infüzyon Agar
<b>bp</b>	: Baz çifti
<b>CEP</b>	: Sefoperazon
<b>CN</b>	: Gentamisin
<b>dk</b>	: Dakika
<b>E</b>	: Eritromisin
<b>ENR</b>	: Enrofloksasin
<b>FFC</b>	: Florfenikol
<b>FLM</b>	: Flumekuin
<b>gr</b>	: Gram
<b>HGT</b>	: Horizontal gen transferi
<b>I</b>	: Orta derecede duyarlı
<b>K</b>	: Kanamisin
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimol
<b>N</b>	: Neomisin
<b>NA</b>	: Nutrient agar
<b>OA</b>	: Oksolinik asit,
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>R</b>	: Dirençli
<b>RAPD</b>	: Random amplified polimorfik DNA
<b>S</b>	: Duyarlı
<b>sn</b>	: Saniye
<b>SXT</b>	: Trimetoprim+sulfametoksazol
<b>T</b>	: Oksitetrasiklin
<b>TMP</b>	: Trimetoprim
<b>TSA</b>	: Trypticase soy agar
<b>U</b>	: Ünite



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1. Tarihçe .....	4
2.2. Fenotipik Özellikler .....	4
2.3. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	6
2.4. Koruma, Kontrol ve Sağaltım.....	8
2.5. Antibiyotik Direnci ve Önemi .....	9
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>11</b>
3.1. Materyal.....	11
3.2. Metot.....	12
3.2.1. <i>L. garvieae</i> Spesifik PCR.....	12
3.2.2. Disk Difüzyon Testi .....	12
3.2.3. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	13
3.2.4. İzolatlar Arası Klonal İlişkinin Belirlenmesi .....	15
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>17</b>
4.1. <i>L. garvieae</i> Spesifik PCR .....	17
4.2. Disk Difüzyon Testi.....	17
4.3. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Belirlenmesi .....	20
4.4. İzolatlar Arası Klonal İlişki .....	24
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>25</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>29</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>30</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>36</b>

## 1. GİRİŞ

İstatistikler su ürünlerine olan talebin özellikle son yüzyılda dünya çapında artış gösterdiğini göstermektedir. Bu talep patlamasının sadece avcılık yoluyla karşılanamayacağı zaman içinde kendini göstermiştir. Nitekim son yüzyılda dünya çapında en hızlı büyüyen tarımsal sektörün su ürünleri yetiştiriciliği sektörü olduğu gözlemlenmiştir. Günümüzde dünya çapında üretilen balıkçılık ürünleri üretiminin yarısı yetiştiricilik yoluyla sağlanmaktadır. Artan talep, artan tüketim beraberinde kalite standartlarının korunması ve sürdürülmesini zorunlu kılmaktadır. Bakteriyel, viral, protozoal ve trematodal etmenler su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe önemli kayıplara neden olmaktadır (Austin ve Austin, 2012). Balık hastalıklarının tedavisinde antibiyotikler önemli bir rol oynamaktadır. Yeme katılarak, enjeksiyon yolu ile veya suya katılarak kullanılabilen antibiyotiklerin kullanımına, son zamanlarda çeşitli ülkeler tarafından kısıtlama getirilmiştir. ABD’de balıklarda sulfamerazin, oksitetrasiklin dihidrat, sulfadimetoksin-ormetoprim ve florfenikol’ün yasal kullanımına izin verilmektedir (Baydan ve ark., 2012). İngiltere’de sadece üç adet antibiyotik (florfenikol, oksitetrasiklin ve amoksisilin) su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanım için lisans almıştır (Ngo ve ark., 2018). Ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliğinde çok çeşitli antibakteriyellerin kullanıldığı bildirilmiş olmasına rağmen, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü verilerine göre balıklarda kullanılacak 40 adet ruhsatlı antibakteriyel ürün bulunmakta ve bu ürünlerin ise 5 farklı etken madde florfenikol, oksitetrasiklin HCl, enrofloksasin, sülfadiazin-trimetoprim ve amoksisilin trihidrat içerdiği görülmektedir (GTHB, 2018b). Dolayısıyla bu veriler ışığında balıklarda kontrolsüz ve bilinçsiz bir antibiyotik kullanımının olduğundan bahsedilebilir. Faj terapisi ve probiyotik bakteri kullanımı su ürünleri yetiştiriciliğinde umut verici bir seçenek olarak karşımıza çıksa da daha ileri düzeyde araştırmalar yapmak ve bunları pratikğe dökmek gerekmektedir. Bu bağlamda antibiyotik kullanımı zorunlu hale gelmektedir.

Antibiyotikler birçok balık türünde görülen streptokokkal enfeksiyonlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Aoki ve ark., 1990). Uygulama genellikle spesifiye edilmiş yemlerle birleştirilerek ağız yoluyla uygulama şeklinde olmaktadır. Antimikrobiyal maddelerin in vitro *L. garvieae*’ye karşı güçlü etki göstermesine karşı infekte olmuş zayıf iştahsız balıklarda etkisi oldukça zayıftır (Bercovier ve ark., 1997). Linkomisin, oksitetrasiklin ve makrolid grubu antibiyotikler kültür balıkçılığında *L.*

*garvieae*'nin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Aoki ve ark., 1990; Kawanishi ve ark., 2005). Gökkuşığı alabalıklarında Laktokokkozis salgınlarının tedavisinde çoğunlukla eritromisin, oksitetrasiklin, amoksilin ve düşük düzeyde doksisisiklin kullanılmaktadır (Vendrell ve ark., 2006). Ancak kemoterapötik tedavi streptokokkal balık patojenlerinde antibiyotik direnci oluşmasına neden olmuştur (Aoki ve ark., 1990; Austin ve Austin, 2012). Bununla birlikte insan ve hayvanlarda düzensiz ve yanlış antibiyotik kullanımı ile birlikte antibiyotik direncinin yayılımı küresel bir sağlık sorunu olarak hızla büyümektedir (Heuer ve ark., 2009).

Bu tez çalışması ile Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan *L. garvieae* izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve izolatların sahip oldukları bazı antibiyotik direnç genleri belirlenmiş ve izolatlar arasındaki genetik ilişkiler Random Amplified Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) metodu ile ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçların *L. garvieae* izolatlarına yönelik uygun antibiyotik seçiminin yapılmasına ve bu sayede dirençli saha izolatlarının gelişiminin engellenmesine katkı sağlayacağı kanısındayız.

## 2. GENEL BİLGİLER

*L. garvieae*, su sıcaklığının 16 C°'nin üzerine çıktığı yaz aylarında birçok balık türünü etkileyen ve hem tatlı hem de tuzlu su yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan Laktokokkozis hastalığının etiyolojik ajanıdır. Genel olarak hastalık hiperakut bir seyir gösterir ve hemorojik septisemi ile karakterizedir (Vendrell ve ark., 2006). Hastalığın tüm boyutlardaki balıklarda görülmesi ve mortalite oranının %95'e ulaşması (Pereira ve ark., 2004) işletmelerde ekonomik olarak ciddi kayıplara neden olmaktadır.

Günümüzde, *L. garvieae* dünya genelinde yayılım göstermiş ve birçok ülkede başta alabalık olmak üzere farklı sucul hayvanlardan izole edilmiştir. Son yıllarda Hindistan'da Gökkuşluğu alabalıklarında (Shahi ve ark., 2018), Mısır'da Nil tilapyaalarında (*Oreochromis niloticus*) (Osman ve ark., 2017), Brezilya'da bir tür yayın balığında (*Pseudoplatystoma* sp.) (Fukushima ve ark., 2017), Amerika'da alabalıklarda (Nelson ve ark., 2016), Endonezya'da Nil tilapyaalarında (Anshary ve ark., 2014), Tayvan'da kefal (*Mugil cephalus*), tilapya, sarı yüzgeçli çipura (*Acanthopagrus latus*) balıklarında, Japon yayın balığında (*Anguilla japonica*) ve dev tatlı su karideslerinde (*Macrobrachium rosenbergii*) (Tsai ve ark., 2012) etkenin izole edildiğine dair bildirimler bulunmaktadır.

Ülkemizde ilk hastalık bildirimini 2001 yılında Türkiye'nin batısında yer alan bir gökkuşluğu alabalığı işletmesinden yapılmıştır. Bu hastalık vakasında su sıcaklığının 17 °C olduğu ve etkenin 100-150 gr ağırlığındaki balıklarda %80'in üzerinde bir kayba neden olduğu bildirilmiştir (Diler ve ark., 2002). İlk izolasyon sonrası hastalığın hızlı bir yayılım sürecine girdiği ve Türkiye'nin farklı bölgelerinde, özellikle de yetiştiriciliği yapılan gökkuşluğu alabalıklarının önemli bir patojeni haline geldiği görülmüştür (Altun ve ark., 2004; Özer ve ark., 2008; Timur ve ark., 2011; Altun ve ark., 2013; Didinen ve ark., 2014; Türe ve Altinok, 2016).

*L. garvieae*'nin sucul hayvanlar dışında insanlarda enfeksiyona (Tandel ve ark., 2017) neden olması etkenin balık kökenli zoonozlar içerisinde sınıflandırılabilceğini göstermektedir. Ancak moleküler tiplendirme metotlarının (Pulsed Field Gel Electroforesis) kullanıldığı birçok çalışmada balıklardaki salgınlardan elde edilen izolatlar ile farklı konakçılardan elde edilen izolatlar arasında farklılıkların olduğu, bir başka ifadeyle düşük genetik ilişkilerin olduğu ortaya konmuştur (Kawanishi ve ark.,

2006; Tejedor ve ark., 2011). Dolayısıyla *L. garvieae*'nin zoonoz olup olmadığı hala soru işaretidir.

## 2.1. Tarihçe

*L. garvieae*'nin taksonomik pozisyonu tartışmalı ve dolambaçlı bir geçmişe sahiptir. İlk olarak *Streptococcus garvieae* olarak adlandırılan etken Birleşik Krallıkta sığır mastitis vakasından izole edilmiş ve o izolasyonda elde edilen izolat referans suş (ATCC 43921) olarak kayıtlara girmiştir (Collins ve ark., 1983; Vendrell ve ark., 2006). Kısa bir süre sonra gelişen tekniklerle birlikte *Streptococcus* genusu içerisinde yer alan laktik streptococlar 1985 yılında yeni bir genus olan *Lactococcus* içerisine dahil edilmiştir (Schleifer ve ark., 1985). 1991 yılında Japonya'da sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*) balıklarında meydana gelen streptococcal hastalık salgınından izole edilen Gram pozitif balık patojeni yeni bir patojen, *Enterococcus seriolicida* olarak rapor edilmiştir (Kusuda ve ark., 1991). 1988 yılında İspanya'da gökkuşuğu alabalıklarında ilk defa laktokokkozis salgınında izole edilen bakteri *Enterococcus* sp. olarak tanımlanmıştır (Palacios ve ark., 1993). 1993 yılında *E. seriolicida* ile *L. garvieae* arasında yakın bir ilişki olduğuna dair fenotipik ve filogenetik kanıtlar ortaya konulmuştur (Domenech ve ark., 1993). İlerleyen yıllarda farklı kıtalarda yer alan araştırmacılar yaptıkları fenotipik ve genotipik çalışmalar sonrası *E. seriolicida*'nın *L. garvieae* ile sinonim (eş anlamlı) olduğunu kabul etmişler ve *Enterococcus* ile *Lactococcus* genusunu yeniden ilişkilendirmişlerdir (Eldar ve ark., 1996; Teixeira ve ark., 1996). Günümüzde *L. garvieae* taksonomik olarak lactobacillales takımında streptococcaceae familyasında *Lactococcus* genusu içerisinde yer almaktadır (NCBI, 2018).

## 2.2. Fenotipik Özellikleri

*L. garvieae* Gram- pozitif, fakültatif anaerobik, hareketsiz endospor üretmeyen bir bakteridir. Optimum üreme sıcaklığı 37°C olup 4-42°C arasındaki sıcaklıklarda üreyebilmektedir. Bazı suşlar 45°C'de zayıf ve yavaş bir şekilde üreyebilirler. Üreme çift ya da kısa zincirler halinde olmaktadır (Boomker ve ark., 1979, Kusuda ve ark., 1991, Eldar ve ark., 1996). Bakterinin Man, Rogosa ve Sharpe agar, trypticase-soy (TSA) agar ve brain-heart infusion (BHIA) agar gibi genel besi yerlerinde iyi bir şekilde ürediği (Kusuda ve ark., 1991), McConcey ve *Enterococcus* agar'ın ise etkenin

üremesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Toranzo ve ark., 1994). Genel olarak  $\alpha$ -hemolitik bakteriler olarak tanımlanırlar (Ravelo ve ark., 2001), ancak  $\beta$ -hemolitik aktivite gösterdikleri de rapor edilmiştir (Teixeira ve ark., 1996). Bakteriyel üreme, pH 4,5-9,6 arasında ve %4 NaCl içeren ortamda gerçekleştiği, bazı türlerin ise %6,5 NaCl içeren ortamda üreyebildiği bildirilmiştir (Kusuda ve ark., 1991).

*L. garvieae* izolatları arasında bazı biyokimyasal özellikler yönünden farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (hippuratı hidroliz etme yeteneği) (Vendell ve ark., 2006). Altun ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada  $\beta$ -Glukoronidaz, D-riboz, sorbitol, laktoz, rafinoz, voges proskauer (VP), alanyl-phenylalanyl-proline arylamidase (APPA), pyrrolidonyl arylamidase (PyrA) ve üreaz testlerinin *L. garvieae* izolatları arasında farklı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada sadece ATCC 43921 suşunun hippuratu hidroliz ettiği ortaya konulmuştur. Genel olarak *L. garvieae*'nin fenotipik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

*L. garvieae* izolatları biyokimyasal testlerle birbirinden ayırt edilemeyen 2 serotipe ayrılmıştır. Serotipler *L. garvieae* karşı elde edilmiş serumları aglutine etme yeteneklerine göre ayrılmaktadır. Aglütinasyon göstermeyen (Non-agglutinating) fenotipler KG- ile aglütinasyon (agglutinating) gösteren fenotipler KG+ ile ifade edilmektedir. İmmuno floresan boyama tekniği ile KG+ antijenlerinin sadece bakterinin hücre yüzeyinde yoğunlaştığı, KG- antijenlerinin ise hücre kapsülü boyunca yerleştiği gözlemlenmiştir (Meyburg ve ark., 2017).

**Tablo 1.** *L. garvieae*'nin biyokimyasal, fizyolojik ve kültürel özellikleri (Vendell ve ark., 2006'dan).

Özellik	Reaksiyon	Özellik	Reaksiyon
Hücre morfolojisi	Oval kok		
Gram	+	Arginin üretimi	+
Hareket	-	Ornitin üretimi	-
Üreme;		Lizin üretimi	-
4 °C	+	Asit Üretimi;	
20 °C	+	Gliserin	-
37 °C	+	Rafinoz	-
45 °C	+	Arabinoz	-
pH 9,6	+	Sorbitol	+
% 6.5 NaCl	+	Mannitol	+
Hemoliz	$\alpha$ hemoliz	Cellobiose	+
Katalaz	-	Galaktoz	+
Oksidaz	-	D-Glikoz	+
TSI	A/A-	Maltoz	+
Oksidatif / fermentatif	Fermentatif	Trehaloz	+
Nitrat redüksiyon	-	D- Mannoza	+
Sitrat	-	Inositol	-
Üre	-	Laktoz	Z+
Indol üretimi	-	Riboz	D
Esculin	+	Sukroz	D
VP	+	Adonitol	-
H <sub>2</sub> S üretimi	-	Glikojen	-
Arginin dihidrolase	+	Melibiose	-
Pyrrolidonil arylamidase	+	Melezitose	-
Alkalın fosfataz	-	Niştasta	-
B-Glucuronidase	D	Tagatose	D
Lösin arylamidase	+	L-Rhamnosa	-
Sodyum hippurate hidrolizi	-	D- Ksiloz	-
Lancefield grup	N	Salicin	+

V: değişken reaksiyon, Z: zayıf reaksiyon, (+) : pozitif reaksiyon, (-) : negatif reaksiyon, A/A-: TSI'da asit ve H<sub>2</sub>S üretimi.

### 2.3. İzolasyon ve İdentifikasyon

Laktokokkozis salgınlarında örnekler hasta balıklardan veya soğukta muhafaza edilmiş yeni ölmüş balıklardan alınmalıdır. Etken karaciğer, dalak, göz, bağırsak veya kandan izole edilebilmesine rağmen izolasyon için en uygun organlar böbrek ve

beyindir (Vendell ve ark., 2006). İzolasyonda genellikle TSA, BHIA, kanlı agar ve nutrient agar (NA) gibi klasik kültür vasatları kullanılmaktadır (Austin ve Austin, 1999). Son zamanlarda *L. garvieae*'yı ve diğer balık patojenlerinden ayırmak için LG agar olarak adlandırılan bir besiyeri geliştirilmiştir. Bu besiyeri Difco™Oxgall (%3) ve potasyum tellurite (10 ppm) gibi birçok bakterinin üremesini inhibe eden selektif maddeleri içermektedir. Kapsüllü *L. garvieae* izolatları besiyerinde metalik siyah renkte etrafında kırmızı halka bulunan koloniler oluşturmaktadır (Chang ve ark., 2014).

İdentifikasyon etkenin biyokimyasal özelliklerine dayanılarak konvansiyonel mikrobiyolojik metotlar veya API-20 Strep ve API-32 Strep gibi minyatürize sistemler kullanılarak yapılabilmektedir (Vendell ve ark., 2006; Altun ve ark., 2013). Ancak fenotipik olarak *L. garvieae*'yı kendisine en yakın tür olan *L. lactis* subsp. *lactis*'den ayırmak için clindamisin duyarlılık testinin yapılması gerektiği veya bu iki türün genetik olarak PCR uygulamalarıyla birbirinden ayrılması gerektiği bildirilmiştir (Zlotkin ve ark., 1998). Bu bağlamda *L. garvieae* izolatlarının genetik olarak identifikasyonunda kullanılabilecek farklı gen bölgelerini hedef alan primerler geliştirilmiş ve rutin kullanıma sunulmuştur. Tablo 2'de *L. garvieae* spesifik primer çiftleri ve bu primerlerin hedef alındığı gen bölgeleri verilmiştir.

**Tablo 2.** *L. garvieae* izolatlarının moleküler identifikasyonunda kullanılan hedef genler (Meyburg ve ark., 2017'den).

Hedef Gen	Primer Çifti	Ürün Boyutu (bp)
16SrDNA	pLG-1 pLG-2	1100
Dihydropteroate synthase	SA1B10-1-F SA1B10-1-R	709
16S rRNA	LcG-F LcG-R	252
16S-23S rRNA	TSLg30F ITSLg31R	290

Zlotkin ve ark., (1998) tarafından geliştirilen pLG-1/pLG-2 primerlerinin ülkemiz saha izolatlarının moleküler teşhisinde araştırmacılar tarafından yaygın bir şekilde kullanıldığı görülmektedir (Altun ve ark., 2013; Didinen ve ark., 2014).



## 2.4. Koruma, Kontrol ve Sağaltım

*L. garvieae* enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında duyarlı popülasyonların etkene karşı aşılması önemli bir yer tutmaktadır (Vendrell ve ark., 2006). Ancak 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 ve ark., 2003). Bununla birlikte, son yıllarda *L. garvieae*'ye karşı aşı denemelerinin hız kazandığı görülmektedir (Bastardo ve ark., 2012; Nakajima ve ark., 2014; Fukushima ve ark., 2017). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından 2018 yılı itibarı ile ruhsatlı balık aşılarının listesine göre ülkemizde balıklarda laktokokkozis hastalığının kontrolünde kullanılabilir bir adet ruhsatlı balık aşısı bulunmaktadır (GTHB, 2018a). Ek olarak son yıllarda ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliği yapılan işletmelerde meydana gelen salgınların kontrol altına alınmasında otovaksin uygulamalarının arttığı gözlenmektedir.

Patojen mikroorganizmaların işletmelere giriş olasılığının azaltılarak hastalık risklerini en aza indirilmesinde biyogüvenlik stratejilerinin geliştirilmesi ve uygulanması hayati önem taşır. Bu tür stratejiler, aynı zamanda, vahşi su hayvanı popülasyonları üzerinde ciddi etkileri olabilecek ve çiftlik hayvanları için bir enfeksiyon rezervuarı olarak rol oynayabilecek yabancı ortama patojenlerin yerleşmesinde önleyebilecektir (Oidtmann ve ark., 2011). Patojen etkenlerin balık çiftliklerine girişini önlemede ilk bariyer sanitasyon uygulamalarıdır. Balıklara manipülasyonun azaltılması, ölü veya hasta balıkların elemine edilmesi, stok yoğunluğunun düşük düzeyde tutulması en önemli uygulamalardır. Ek olarak tankların periyodik olarak temizlenmesi, işletmelerde kullanılan aletlerin dezenfektan maddeler ile yeterli bir düzeyde dezenfekte edilmesi etkenin yayılmasını azaltacak diğer önemli uygulamalardır. Ayrıca etkenin işletmelere girişinin ve yayılımının engellenmesi için balık ya da yumurta ithalatı kontrol edilmelidir (Vendrell ve ark., 2006).

*L. garvieae* enfeksiyonlarının tedavisinde en etkin yol, patojene karşı antibiyogram yaparak en etkili antibiyotiği tespit ederek uygulamaktır. Bu sayede etkene karşı direnç gelişimi önlenebileceği gibi hastalıkların nükslerinin de azaltılabileceği bildirilmektedir (Kubilay ve ark., 2005). Hem ülkemizde hem de dünyada çeşitli hastalık vakalarında izole edilmiş *L. garvieae* izolatlarının antibiyotik

etkinlik profillerinin belirlendiği birçok çalışma bulunmaktadır (Kubilay ve ark., 2005; Altun ve ark., 2013; Didinen ve ark., 2014; Türe ve Boran 2015; Osman ve ark., 2017). Genel olarak *L. garvieae* enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan antibiyotikler eritromisin, oksitetrasiklin, amoksisilin ve düşük düzeyde doksosiklin'dir (Vendrell ve ark., 2006).

## 2.5. Antibiyotik Direnci ve Önemi

Antibiyotik direncinin yayılımı, insan ve hayvanlarda düzensiz ve yanlış antibiyotik kullanımı ile birlikte küresel sağlık sorunu olarak hızla büyümektedir (Heuer ve ark., 2009). Özellikle, veteriner antibiyotiklerinin gıda hayvanlarına uygulanmasının beşeri hekimlikte kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli suşların gelişimini arttırdığı düşünülmektedir. Bu suşların aktarımı, hayvanlarla doğrudan temas yoluyla veya gıda zinciriyle tüketicilere iletelebilmektedir (Kemper, 2008).

Kemoterapötik tedavi streptokokkal balık patojenlerinde antibiyotik direnci oluşmasına neden olmuştur (Aoki ve ark., 1990; Austin ve Austin, 2012). Bir izolatta birden fazla kemoterapötik ajana karşı direncin geliştiği çoklu direnç sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriyel populasyonlardaki antibiyotik direnç genlerinin yayılımı, horizontal gen transferinin çeşitli mekanizmaları yoluyla gerçekleşmektedir. Streptokokkal balık patojenlerinde en yaygın gen transfer mekanizması plazmid ilişkili transferdir. Akuvatik streptokok türlerinde antibiyotik direnciyle ilgili ilk rapor Japonya'da kültüre edilen sarıkuyruk balıklardan yapılmıştır (Aoki ve ark., 1990). Bu çalışmada makrolid, linkomisin ve tetrasikline karşı orta düzeyde direnç olduğu ve direnç genlerinin yapısal olarak ekspresse olduğu ve transfer edilemez olduğu ortaya konulmuştur. Yine aynı çalışmada makrolid, linkomisin, tetrasiklinler ve kloramfenikole karşı yüksek düzeyde direnç olduğu ve ilişkili direnç genlerinin transfer edilebilir ve indüklenebilir olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, antibiyotik direnç determinantlarının direnç (R) plazmidlerinde ya da tranposonlarda lokalize olduğunu tahmin etmişlerdir (Aoki ve ark., 1990). Bu bulgular, eritromisin, oksitetrasiklin ve linkomisin dirençli *L. garvieae* izolatlarından izole edilen R plazmidlerinin karakterizasyonuna neden olmuş ve *ermB* ve *tet(S)* direnç genlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır (Hirono ve Aoki, 2001). 170 adet *L. garvieae* izolatının antibiyotik duyarlılık testi sonucu izolatların neredeyse yarısının aynı anda eritromisin, linkomisin ve oksitetrasikline dirençli olduğu ve tüm dirençli izolatların *ermB* ve *tet(S)*

direnç genlerine sahip oldukları ortaya konulmuştur (Kawanishi ve ark., 2005). İran’da yapılan çalışmada 49 *L. garvieae* izolatının %65,3’ü enrofloksasin’e, %42,8’i eritromisin’e, %40,8’i kloramfenikol ve trimetoprim+sulfametoksazol ve %38,7’sinin tetrasiklin’e karşı dirençli olduğu bulunmuş ve test edilen 49 izolatın tamamının en az bir tetrasiklin direnç geni taşıdığı saptanmıştır (Raissy ve Shahrani, 2015). Ülkemizde *L. garvieae* izolatlarında antibiyotik direnç genlerinin varlığının belirlendiği bir çalışmada izolatların en yaygın olarak tetrasiklin (*tetB*) direnç geni taşıdığı ortaya konulmuştur (Türe ve Boran, 2015).



### 3. MATERYAL METOT

#### 3.1. Materyal

Çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan 25 adet Gökkuşuğu alabalığı kökenli *L. garvieae* saha izolatu ve *L. garvieae* ATCC 43921 referans suşu kullanıldı (Tablo 3). Çalışmadan önce gliserinli buyyon (%15) içerisinde -20 °C'de saklanan izolatlar Trypticase soy broth'a (Merck, Almanya) pasajlandı ve 25 °C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı.

**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan *L. garvieae* saha izolatları, izolasyon yerleri ve tarihi

No	İzolatlar	İzolasyon Yeri		İzolasyon Yılı
1	Çob S	Muğla	Akdeniz	2001
2	Alk S	Antalya	Akdeniz	2002
3	Haykas 12B	Isparta	Akdeniz	2012
4	Anakas 12B	Isparta	Akdeniz	2012
5	Kep B	Antalya	Akdeniz	2001
6	Yal B	Isparta	Akdeniz	2012
7	Çan B	Isparta	Akdeniz	2012
8	Göz B	Muğla	Akdeniz	2001
9	Çift B	Eskişehir	İç Anadolu	2012
10	Esk B	Eskişehir	İç Anadolu	2017
11	Sam ED	Samsun	Karadeniz	2010
12	Sam EK	Samsun	Karadeniz	2010
13	Or YDD	Ordu	Karadeniz	2014
14	Or YDB	Ordu	Karadeniz	2014
15	Or YDE	Ordu	Karadeniz	2014
16	Or YDF	Ordu	Karadeniz	2014
17	SK 68D	Aydın	Ege	2011
18	SK 45K	Aydın	Ege	2011
19	SK 31K	Aydın	Ege	2011
20	SK 19K	Aydın	Ege	2011
21	SK 67K2	Aydın	Ege	2011
22	SK 66B	Aydın	Ege	2011
23	SK 53K	Aydın	Ege	2011
24	SK 65B	Aydın	Ege	2011
25	37K	Aydın	Ege	2011

## 3.2. Metot

### 3.2.1. *L. garvieae* Spesifik PCR

İzolatların DNA ekstraksiyonları prensibi spin kolon ile filtrasyon esasına dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Invitrogen, Kanada) kullanılarak yapıldı. Kit içeriğine ek olarak Gram pozitif bakteriler için 0,06 g Tris-HCl, 0,15 g EDTA, 240 ml Triton X-100, 0,4 g lizozim'den oluşan 20 ml lizozim lizis buffer hazırlandı. *L. garvieae* izolatları genetik olarak tür spesifik pLG-1 (5'-CATAACAATGAGAATCGC-3') ve pLG-2 (5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3') primer setinin kullanıldığı PCR metodu ile konfirme edildi (Zlotkin ve ark., 1998). Bu amaçla PCR amplifikasyonunda PCR water, 1xPCR Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, herbir dNTP'den 0,2 mM, 1,0 U Taq polymerase (Fermentas), 1µM her bir primer ve 5 µl template DNA içeren 25 µl PCR karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 94°C'de 3 dk ön denatürasyon ve sonrasında 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 1,5 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifiye edildi. Amplifikasyon sonrası oluşan son ürünler etidium bromid (2mg/ml) içeren % 1,5 agaroz jel elektroforezinde koşuturuldu ve sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. *L. garvieae* spesifik 1100 bp'lik son amplifikasyon ürününün görüldüğü izolatlar *L. garvieae* olarak değerlendirildi. PCR çalışmasında pozitif kontrol olarak *L. garvieae* ATCC 43921 suşu kullanıldı.

### 3.2.2. Disk Difüzyon Testi

İzolatların antibiyotik profillerinin belirlenmesinde disk difüzyon metodu kullanıldı. İzolatların amoksisilin (10 µg), ampisilin (10 µg), enrofloksasin (5 µg), eritromisin (15 µg), florfenikol (30 µg), flumekuin (30 µg), gentamisin (10 µg), kanamisin (30 µg), neomisin (30 µg), oksitetrasiklin (30 µg), oksolinik asit (2 µg), sefoperazon (75 µg), trimetoprim (5 µg) ve trimetoprim+sulfametoksazol (25 µg) (Bioanalyse, Türkiye) olmak üzere 14 farklı antibiyotiğe karşı direnç profilleri belirlendi. Bu amaçla her bir bakteri BHI broth 25 °C'de 24-48 saat inkubasyona bırakılarak subkültüre edildi. Elde edilen bakteri subkültürleri McFarland 0.5 standardına göre ayarlandı ve süspansiyonlarının her birinden 0,1 ml alınarak Müeller-Hinton agara steril svap yardımıyla ekimleri yapıldı. Daha sonra ekim yapılan petrilere antibiyotik diskleri yerleştirilerek 25 °C'de 24-48 saat inkube edildi. İnkubasyon sonrası

diskler etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü ve sonuçlar referans değerlerle karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı (CLSI, 2011).

### 3.2.3. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan *L. garvieae* izolatlarında eritromisin (*ermB*, *ermF*), florfenikol (*floR*), sulfanamid (*suI*, *suII* ve *suIII*), tetrasiklin (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE* ve *tetG*) ve trimetoprim (*dhfr1*) antibiyotik direnç genlerinin varlığı PCR metodu ile araştırıldı. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primer dizileri ve bu dizilere ait beklenen PCR son ürün boyutları Tablo 4’de verildi.

**Tablo 4.** Antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primer setleri

Primerler	Primer Dizileri	Hedef Gen	PCR Ürün Boyutu	Kaynak
<i>ermB</i> -F	GAAAAGGTACTIONCAACCAAATA	<i>ermB</i>	639	Roberts ve ark., 1999
<i>ermB</i> -R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC			
<i>ermF</i> -F	CGGGTCAGCACTTTACTATTG	<i>ermF</i>	466	Roberts ve ark., 1999
<i>ermF</i> -R	GGACCTACCTCATAGACAAG			
<i>floR</i> -F	TATCTCCCTGTCGTTCCAG	<i>floR</i>	399	Van ve ark., 2008
<i>floR</i> -R	AGAACTCGCCGATCAATG			
<i>SuI</i> -F	CGCACC GGAAACATCGCTGCAC	<i>suI</i>	163	Pei ve ark., 2006
<i>SuI</i> -R	TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG			
<i>SuII</i> -F	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	<i>suII</i>	191	Pei ve ark., 2006
<i>SuII</i> -R	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG			
<i>SuIII</i> -F	TCCGTT CAGCGAATTGGTGCAG	<i>suIII</i>	128	Pei ve ark., 2006
<i>SuIII</i> -R	TTCGTT CACGCCTTACACCAGC			
<i>tetA</i> -F	GCTACATCTGCTTGCCCTTC	<i>tetA</i>	210	Ng ve ark., 2001
<i>tetA</i> -R	CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
<i>tetB</i> -F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	<i>tetB</i>	659	Ng ve ark., 2001
<i>tetB</i> -R	GTAATGGGCCAATAACACCG			
<i>tetC</i> -F	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	<i>tetC</i>	418	Ng ve ark., 2001
<i>tetC</i> -R	ATGGTCGTCATCTACCTGCC			
<i>tetD</i> -F	AAACCATTACGGCATTCTGC	<i>tetD</i>	787	Ng ve ark., 2001
<i>tetD</i> -R	GACCGGATACACCATCCATC			
<i>tetE</i> -F	AAACCACATCCTCCATACGC	<i>tetE</i>	278	Ng ve ark., 2001
<i>tetE</i> -R	AAATAGGCCACAACCGTCAG			
<i>tetG</i> -F	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	<i>tetG</i>	468	Ng ve ark., 2001
<i>tetG</i> -R	AGCAACAGAATCGGGAACAC			
<i>dhfr1</i> -F	AAGAATGGAGTTATCGGGAATG	<i>dhfr1</i>	391	Van ve ark., 2008
<i>dhfr1</i> -R	GGGTAAAACTGGCCTAAAATTG			

Direnç genlerinden *ermB*, *floR*, *sulI*, *sulII*, *tetA*, *tetB* ve *tetC*'ye ait pozitif DNA örnekleri Dr. Mustafa Türe (Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trabzon) ve Dr. Muhammed Duman'dan (Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa) temin edildi.

Eritromisin direnç genlerinin belirlenmesinde Roberts ve ark. (1999)'un bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. *ermB* ve *ermF* direnç genlerinin belirlenmesinde tekli PCR denemeleri gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonu için 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Bu karışım DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,5 U Taq polymerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA'dan oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 45 sn uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifiye edildi.

Florfenikol direnç geninin (*floR*) belirlenmesinde Van ve ark. (2008)'in bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. PCR amplifikasyonunda PCR water, 1xPCR Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,5 U Taq polymerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA içeren 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50,5°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 45 sn uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Sulfonamid direnç genlerinin belirlenmesinde Pei ve ark. (2006)'nın bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. *sulI*, *sulII* ve *sulIII* direnç genlerinin belirlenmesinde tekli PCR denemeleri gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,75 U Taq polymerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA içeren 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 95°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 95°C'de 15 sn denatürasyon, *sulI* için 55,9°C'de, *sulII* için 60,8°C'de ve *sulIII* için 60°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 7 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Tetrasiklin direnç genlerinin belirlenmesinde Ng ve ark. (2001)'in bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. Bu amaçla iki farklı Multipleks PCR denemesi gerçekleştirildi. Birinci denemede *tetB*, *tetC* ve *tetD* genlerinin, ikinci denemede ise *tetA*, *tetE* ve *tetG* genlerinin varlığı belirlendi. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0,3 mM, 1,5 U Taq polymerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol (1. denemede *tetB*, *tetC* ve *tetD* primerleri, 2. denemede *tetA*, *tetE* ve *tetG* primerleri kullanıldı) ve 3 µl template DNA içeren 50 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 1,5 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Trimetoprim direnç geninin (*dhfr1*) belirlenmesinde Van ve ark. (2008)'in bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,75 U Taq polymerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA içeren 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 95°C'de 15 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 1 dk uzama olmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 7 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Tüm PCR analizleri sonrası oluşan son amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesinde etidium bromid (2 mg/ml) içeren %1,5-2'lik agaroz jel kullanıldı. Jel elektroforezi sonrasında oluşan ürünler UV transilluminatör ile görüntülendi.

### **3.2.4. İzolatlar Arası Klonal İlişkinin Belirlenmesi**

İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin ortaya konması amacıyla rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) metodu kullanıldı. Bu metotta random primer olarak "Enterobacterial repetitive intergenic consensus" dizilerine özgü ERIC-2 primeri (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') kullanıldı (Versalovic ve ark., 1991). Amplifikasyon aşamasında DEPC-treated water, 1XPCR Buffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM her bir dNTP, 2,5U Taq DNA polimeraz, 25 pmol primer ve 5 µl (500 ng) template DNA içeren 25 µl'lik bir RAPD master karışımı hazırlandı. Bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 40°C'de 1 dk annealing, 72°C'de 3 dk ekstension olmak üzere 40



siklus ve 72°C'de 7 dk final ekstensiyon koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi.

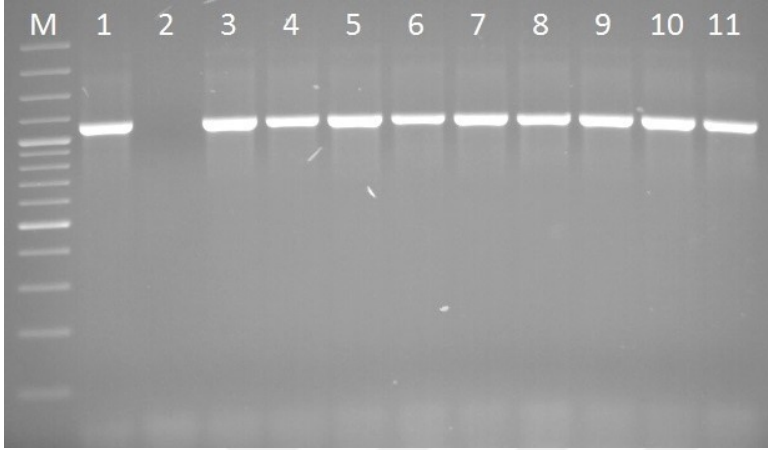
Oluşan RAPD paternlerinin dendogramları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) ile, CHEF-DR® III, Quantity One® yazılımı (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kullanılarak çizildi. RAPD analizinin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla rastgele 7 izolat seçildi ve analiz arka arkaya 3 kez tekrarlandı. İzolatlar arasındaki genetik yakınlık % 70 benzerlik katsayısına göre hesaplandı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. *L. garvieae* Spesifik PCR

Çalışmada kullanılan izolatlar *L. garvieae* tür spesifik PCR uygulamasıyla moleküler olarak konfirme edildi. *L. garvieae* spesifik PCR sonucunda tüm izolatların 1100 bp amplifikasyon ürünü verdiği saptandı (Şekil 1).



**Şekil 1.** *L. garvieae* spesifik PCR (1100 bp). M; Marker (100 bp Plus DNA Marker), 1; *L. garvieae* ATCC 43921, 2; Negatif Kontrol (Distile su), 3-11; *L. garvieae* saha izolatları

### 4.2. Disk Difüzyon Testi

*L. garvieae* saha izolatlarının çalışmada kullanılan 14 farklı antibiyotiğe karşı değişik düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlendi. İzolatların tamamının en az 4 farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, bir izolatın (Yal B izolatu) ise 9 farklı antibiyotiğe karşı direnç ile en yüksek direnç profiline sahip olduğu belirlendi. Çalışmada kullanılan izolatların sergilediği antimikrobiyal profiller Tablo 5'de sunuldu. İzolatların tamamının flumekuın, gentamisin, neomisin ve oksolonik asit'e karşı dirençli amoksisilin, florfenikol ve sefoperazon'a karşı ise duyarlı olduğu saptandı. En düşük direnç oranının ise %4 ile oksitetrasiklin ve %12 ile enrofloksasin'e karşı şekillendiği görüldü (Tablo 6).

**Tablo 5.** Disk difüzyon test sonuçları ve sonuçların değerlendirilmesi

<b>İzolatlar</b>	<b>AX</b>	<b>AM</b>	<b>ENR</b>	<b>E</b>	<b>FFC</b>	<b>FLM</b>	<b>CN</b>
Çob S	S(30)	I(25)	S(23)	S(24)	S(22)	R(0)	R(12)
Alk S	S(28)	I(24)	I(22)	S(21)	S(20)	R(0)	R(11)
Haykas 12B	S(28)	S(30)	S(24)	S(26)	S(23)	R(0)	R(12)
Anakas 12B	S(28)	I(24)	I(22)	S(25)	S(22)	R(0)	R(10)
Kep B	S(28)	I(24)	I(21)	S(24)	S(20)	R(10)	R(11)
Yal B	S(30)	S(26)	R(16)	I(17)	S(18)	R(0)	R(10)
Çan B	S(26)	I(24)	I(20)	S(24)	S(20)	R(0)	R(10)
Göz B	S(30)	S(26)	I(19)	I(20)	S(22)	R(7)	R(12)
Çift B	S(28)	I(24)	I(22)	S(24)	S(22)	R(10)	R(12)
Esk B	S(24)	S(26)	S(23)	S(24)	S(20)	R(10)	R(10)
Sam ED	S(25)	I(22)	R(8)	S(21)	S(20)	R(0)	R(11)
Sam EK	S(24)	I(22)	R(10)	S(22)	S(20)	R(0)	R(10)
Or YDD	S(30)	S(26)	I(20)	S(22)	S(20)	R(10)	R(11)
Or YDB	S(28)	I(23)	I(20)	S(25)	S(22)	R(10)	R(12)
Or YDE	S(28)	I(22)	I(20)	S(24)	S(22)	R(0)	R(12)
Or YDF	S(26)	I(24)	I(20)	S(22)	S(22)	R(0)	R(11)
SK 68D	S(28)	I(24)	I(20)	S(23)	S(20)	R(0)	R(12)
SK 45K	S(24)	I(24)	I(17)	S(22)	S(20)	R(12)	R(12)
SK 31K	S(25)	I(22)	I(20)	S(24)	S(20)	R(10)	R(12)
SK 19K	S(30)	I(25)	I(20)	S(22)	S(21)	R(10)	I(13)
SK 67K2	S(26)	I(23)	I(17)	S(21)	S(20)	R(0)	R(12)
SK 66B	S(24)	I(24)	I(20)	S(21)	S(20)	R(0)	R(10)
SK 53K	S(28)	I(22)	I(20)	S(22)	S(20)	R(0)	R(11)
SK 65B	S(28)	I(24)	I(20)	I(20)	S(20)	R(0)	R(10)
37K	S(26)	I(22)	I(20)	S(22)	S(20)	R(0)	R(10)

AX: Amoksisilin, AM: Ampisilin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, FFC: Florfenikol, FLM: Flumekuini, CN: Gentamisin, S: duyarlı, I: Orta derece duyarlı, R: Dirençli

**Tablo 5.** Disk difüzyon test sonuçları ve sonuçların değerlendirilmesi (devam)

<b>İzolatlar</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>OA</b>	<b>CEP</b>	<b>TMP</b>	<b>SXT</b>
Çob S	R(12)	R(10)	S(24)	R(0)	S(28)	R(0)	I(14)
Alk S	R(13)	R(12)	I(22)	R(0)	S(28)	I(12)	I(11)
Haykas 12B	R(11)	R(12)	S(26)	R(0)	S(28)	R(0)	R(0)
Anakas 12B	R(10)	R(10)	S(25)	R(0)	S(26)	R(0)	I(13)
Kep B	I(14)	R(12)	I(22)	R(0)	S(25)	I(12)	I(12)
Yal B	R(11)	R(8)	R(0)	R(0)	S(22)	R(0)	R(0)
Çan B	I(14)	R(10)	S(25)	R(0)	S(26)	R(0)	R(0)
Göz B	I(14)	R(11)	I(22)	R(0)	S(27)	R(10)	R(8)
Çift B	I(14)	R(11)	S(25)	R(0)	S(26)	R(10)	R(0)
Esk B	R(13)	R(11)	S(24)	R(0)	S(28)	R(0)	R(10)
Sam ED	I(14)	R(10)	S(24)	R(0)	S(26)	I(12)	R(10)
Sam EK	R(12)	R(10)	I(22)	R(0)	S(24)	R(8)	I(12)
Or YDD	I(15)	R(11)	S(24)	R(0)	S(30)	R(0)	I(12)
Or YDB	I(16)	I(13)	S(24)	R(0)	S(28)	S(18)	I(12)
Or YDE	R(13)	R(12)	S(24)	R(0)	S(26)	S(16)	I(12)
Or YDF	I(14)	R(11)	S(24)	R(0)	S(28)	R(0)	R(10)
SK 68D	I(14)	R(10)	I(22)	R(0)	S(26)	R(0)	R(10)
SK 45K	I(14)	R(12)	I(20)	R(0)	S(22)	I(12)	R(10)
SK 31K	I(14)	R(10)	S(24)	R(0)	S(25)	R(0)	I(12)
SK 19K	R(13)	R(10)	I(21)	R(0)	S(25)	I(12)	I(13)
SK 67K2	I(14)	R(11)	S(23)	R(0)	S(26)	R(0)	R(0)
SK 66B	I(15)	R(12)	I(22)	R(0)	S(26)	R(0)	I(12)
SK 53K	I(15)	R(10)	S(24)	R(0)	S(26)	R(0)	R(10)
SK 65B	R(12)	R(12)	I(22)	R(0)	S(22)	R(0)	I(12)
37K	R(12)	R(10)	S(24)	R(0)	S(26)	R(0)	R(10)

K: Kanamisin, N: Neomisin, T: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik asit, CEP: Sefoperazon, TMP: Trimetoprim, SXT: Trimetoprim+sulfametoksazol, S: duyarlı, I: Orta derece duyarlı, R: Dirençli

**Tablo 6.** Çalışmada kullanılan *L. garvieae* izolatların antimikrobiyal profilleri

Antibiyotik	<i>L. garvieae</i> (n=25)		
	n (%)		
	S	I	R
Amoksisilin	25 (100)	-	-
Ampisilin	5 (20)	20 (80)	-
Enrofloksasin	3 (12)	19 (76)	3 (12)
Eritromisin	22 (88)	3 (12)	-
Florfenikol	25 (100)	-	-
Flumequin	-	-	25 (100)
Gentamisin	-	-	25 (100)
Kanamisin	-	14 (66)	11 (44)
Neomisin	-	-	25(100)
Oksitetrasiklin	15(60)	9 (36)	1 (4)
Oksolinik asit	-	-	25 (100)
Sefaperazon	25 (100)	-	-
Trimetoprim	5 (20)	2 (8)	18 (72)
Trimetoprim-sulfametoksazol	-	12 (48)	13 (52)

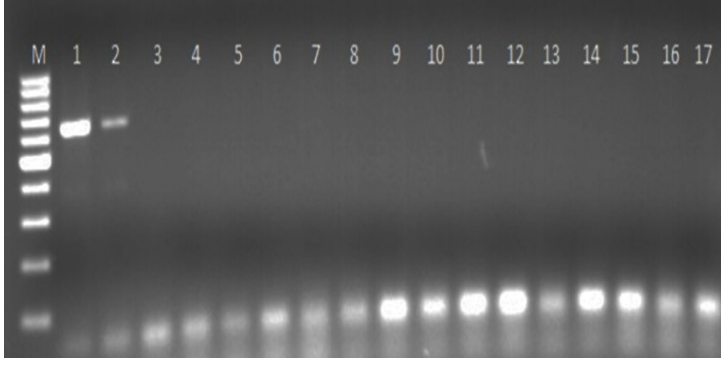
S: duyarlı, I: Orta derece duyarlı, R: Dirençli

### 4.3. Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında incelenen *L. garvieae* saha izolatları arasından bir izolatın (%4) *suII* direnç genine, altı izolatın (%24) *suIII* direnç genine ve bir izolatın (%4) *tetD* direnç genine sahip olduğu belirlendi. İzolatlar arasında *dhfr1*, *ermB*, *ermF*, *floR*, *SuIII*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE* ve *tetG* direnç genlerinin varlığı saptanamadı. Sadece bir izolatın (Anakas 12B) birden fazla direnç genine sahip olduğu belirlendi (Tablo 7). İzolatların izole edildikleri yerler ile sahip oldukları antibiyotik direnç genleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı. *L. garvieae* izolatlarında gözlenen farklı direnç genlerine ait jel elektroforez görüntüleri Şekil 2, 3, 4, 5, 6 ve 7’de verildi.

**Tablo 7.** Çalışmada kullanılan izolatların sahip oldukları antibiyotik direnç genleri

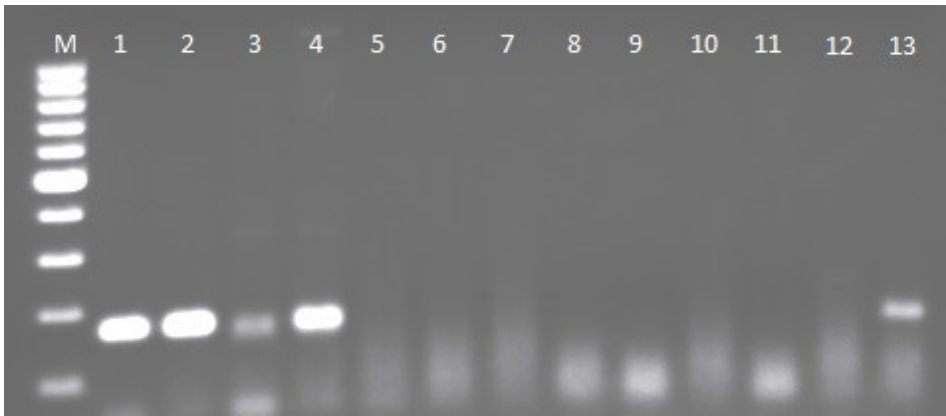
İzolatlar	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>floR</i>	<i>suII</i>	<i>suIII</i>	<i>suIII</i>	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>	<i>tetD</i>	<i>tetE</i>	<i>tetG</i>	<i>dhfrA</i>
Çob S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alk S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haykas 12B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anakas 12B	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Kep B	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Yal B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Çan B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Göz B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Çift B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Esk B	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sam ED	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sam EK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Or YDD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Or YDB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Or YDE	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Or YDF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 68D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 45K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 31K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 19K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 67K2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 66B	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 53K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK 65B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37K	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-



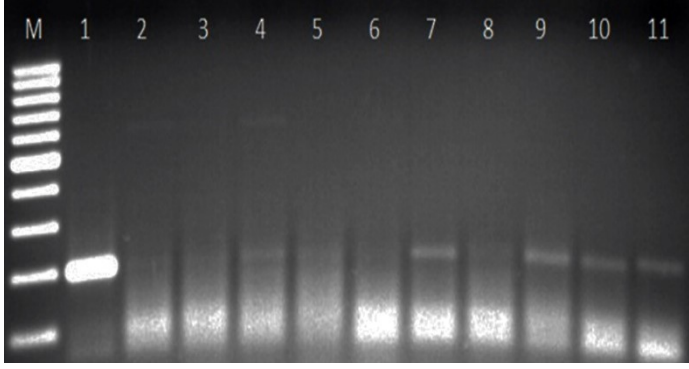
**Şekil 2.** *ermB* spesifik PCR (639 bp). M; Marker (100 bp Plus DNA Marker), 1-2; *ermB* pozitif kontrol, 3-17; *ermB* negatif *L. garvieae* saha izolatları



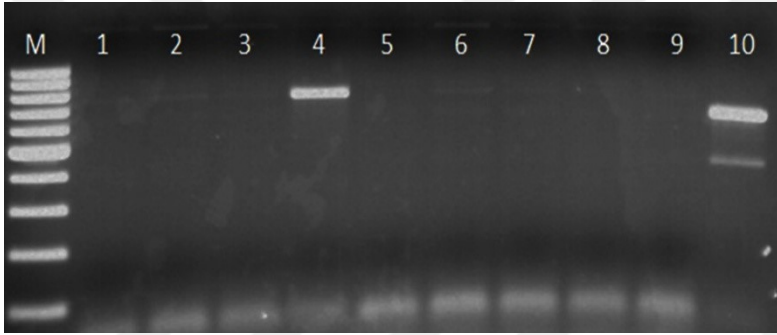
**Şekil 3.** *floR* spesifik PCR (399 bp). M; Marker (100 bp Plus DNA Marker), 1; *floR* pozitif kontrol, 2-10; *floR* negatif *L. garvieae* saha izolatları



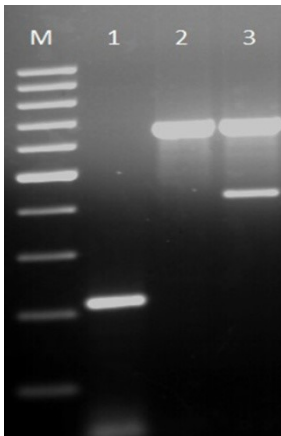
**Şekil 4.** *sulI* spesifik PCR (163 bp). M; Marker (100 bp Plus DNA Marker), 1-4; *sulI* pozitif kontrol, 5-12; *sulI* negatif *L. garvieae* saha izolatları, 13; *sulI* pozitif *L. garvieae* saha izolatu (Anakas 12B izolatu)



**Şekil 5.** *suII* spesifik PCR (191 bp). M; Marker (100 bp Plus DNA Marker), 1; *suII* pozitif kontrol, 2, 3, 6, 8; *suII* negatif *L. garvieae* saha izolatları, 4, 5, 7, 9, 10, 11; *suII* pozitif *L. garvieae* saha izolatları



**Şekil 6.** *tetB* (659 bp), *tetC* (418 bp) ve *tetD* (787 bp) Multipleks PCR. M; Marker (100 bp Plus DNA Marker), 1-3 ve 5-9; *tetB*, *tetC* ve *tetD* direnç geni negatif *L. garvieae* saha izolatları, 4; *tetD* direnç geni pozitif *L. garvieae* saha izolatı (Çift B izolatı), 10; *tetB* ve *tetC* genini taşıyan pozitif kontrol

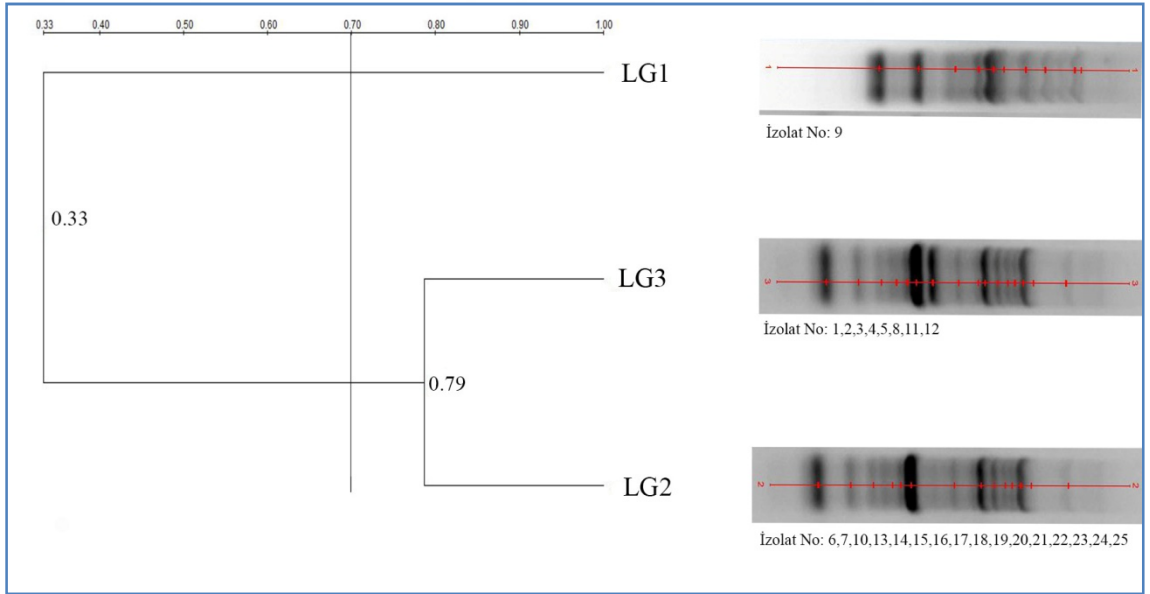


**Şekil 7.** *L. garvieae* izolatlarında görülen farklı tetrasiklin direnç genleri. M; Marker (100 bp Plus DNA Marker), 1; *tetA* pozitif kontrol (210 bp), 2; *tetB* pozitif kontrol (659 bp); 3; *tetB* ve *tetC* (418 bp) genini taşıyan pozitif kontrol



#### 4.4. İzolatlar Arası Klonal İlişki

İzolatlar arası genetik ilişkinin belirlenmesi amacıyla seçilen ERIC-2 primeri ile farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş olan 25 *L. garvieae* saha izolatının üretken bant paternleri verdiği gözlemlendi. ERIC-2 primeri ile üç farklı genotip saptandı ve izolatlar %70 benzerlik katsayısına göre bir küme (LG2 ve LG3 nolu genotip) ve bir “unique” tip (LG1 nolu genotip) içerisinde sınıflandırıldı. Baskın genotip olan LG2’ye izolatların 16’sının (%64) dahil olduğu, unique tipe ise sadece bir izolatın dahil olduğu, diğer genotipe ise 8 izolatın (%32) dahil olduğu saptandı (Şekil 8). Testin tekrarlanabilirliği %100 olarak bulundu.



Şekil 8. ERIC2 primeri ile *L. garvieae* izolatlarında belirlenen genotipler

Analiz sonucunda elde edilen genotiplerin %30.5 ile %78.7 arasında değişen oranlarda birbirleri arasında benzerlik gösterdiği saptandı (Tablo 8).

Tablo 8. ERIC2 primeri ile izolatlar arasında belirlenen genetik benzerlik matrisi (benzerlik katsayısı %70)

	1	2	3
1	100.0	36.1	30.5
2	36.1	100.0	78.7
3	30.5	78.7	100.0

## 5. TARTIŞMA

*L. garvieae*, balıklarda hiperakut, hemorajik septisemisi ile seyreden laktokkozis hastalığının etiyolojik ajanıdır. Etken aynı zamanda önemli bir zoonotik patojen olarak ele alınmaktadır. Ticari öneme sahip birçok tatlı ve tuzlu su balık türlerinde laktokokkozis sonucu meydana gelen önemli ekonomik kayıplar su ürünleri yetiştiriciliğine zarar vermektedir (Meyburg ve ark., 2017). Bununla birlikte *L. garvieae* enfeksiyonlarında tedavi kemoterapotik ajanlar ile yapılabilmektedir. Ancak tedavide kullanılan antibiyotiklerin kalıntı, antimikrobiyal direnç gelişimi ve maliyet gibi faktörler göz önüne alınarak yapılması gerektiği, bunun için de uygun antibiyotik seçimi için etkenin duyarlı olduğu antibiyotik belirlenerek, uygulanmasının büyük önem taşıdığı bildirilmektedir (Kubilay ve ark., 2005). Antimikrobiyal direnç gelişimin önüne geçilebilmesi ve ülkesel düzeyde izlenebilmesi için *L. garvieae* izolatların antimikrobiyel profillerinin belirlendiği çalışmaların gelecekte de kesintisiz olarak sürdürülmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasının da bu bağlamda literatüre önemli katkılar sağlayacağı kanısındayız.

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalar ile değişik bölge ve illerden izole edilmiş olan *L. garvieae* izolatlarının sahip olduğu antimikrobiyal aktiviteler göz önüne serilmiştir. Kubilay ve ark., (2005) 2001-2003 yılları arasında Antalya, Isparta, Konya, Denizli ve Muğla illerinden izole edilmiş 7 *L. garvieae* izolatının kanamisin, sefuroksim, linkomisin, penisilin, norfloksasin, siprofloksasin, ceftriaxone, klindamisin, vankomisin, okzasilin, streptomisin, trimetoprim+sulfametoksazol, gentamisin, apramisin, tylosin, colistin, sulfamethizol, flumequin ve oksolinik asit'e dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda benzer şekilde flumequin, gentamisin ve oksolinik asit'e karşı %100 oranında direnç saptanmıştır. Kav ve Erganiş (2008) 2002-2004 yılları arasında Konya ilinde gökkuşuğu alabalığı işletmelerinden elde ettikleri izolatların tamamında metisilin, okzasilin, kloksasilin, spiramisin, klindamisin, linkomisin, gentamisin, neomisin, basitrasin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı direnç saptamışlardır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre *L. garvieae* enfeksiyonlarının tedavisinde  $\beta$ -laktam gurubu antibiyotiklerin tercih edilebileceği bildirilmiştir. Altun ve ark. (2013) disk difüzyon yöntemi ile Türkiye'nin değişik illerinden izole edilen 10 gökkuşuğu alabalığı kökenli *L. garvieae* izolatının tamamının gentamisin, neomisin, linkomisin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı dirençli

olduklarını belirlemişlerdir. Oksitetrasiklin ve eritromisin'e karşı ise sırasıyla %80 ve %90 oranında yüksek düzeyde direnç saptanmıştır. Akdeniz bölgesinde 2012 yılında rastlanılan salgından izole edilen suşlarında benzer şekilde oksitetrasiklin, neomisin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Didinen ve ark., 2014). Türe ve Boran (2015) çalışmalarında kullandıkları 29 *L. garvieae* izolatu arasında 20 izolatin çoklu antibiyotik direncine sahip olduklarını bildirmişler ve en yüksek direnç oranının %86,3 ile trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı şekillendiğini belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında Türe ve Boran (2015)'in bildirdiği gibi izolatlar arasında yüksek düzeyde (%100) çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır. Yapılan çalışmalardan farklı olarak trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı ise daha düşük düzeyde (%52) direncin şekillendiği belirlenmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda (Didinen ve ark., 2014; Türe ve Boran, 2015) çalışmamıza benzer şekilde florfenikol'e karşı bir direncin şekillenmediği görülmüş olup *L. garvieae* enfeksiyonlarının sağaltımında bu antibiyotiğin kullanılabilir olduğu değerlendirilmiştir.

Duyarlı bakteriler, antibiyotiğin hücre membranı tarafından dışlanması, antibiyotiğin hücre içi modifikasyonu ve/veya deaktive edilmesi, hücresel hedefe duyarlılığının azaltılması, antibiyotiğin hücreden dışarıya atılması ve hücre içi ayrıştırma gibi çoklu ve kompleks mekanizmalar yoluyla antibiyotiklere karşı dirençli hale gelebilirler (Taylor ve ark., 2011). Bu mekanizmalar mutasyon ve seleksiyon yoluyla ya da diğer bakterilerden direnç kodlayan genetik bilgilerin kazanılması ile evrimleşebilir. Direnç kodlayan genetik bilgilerin aktarımı horizontal gen transferi (HGT) aracılığıyla gerçekleşebilir. HGT içerisinde, konjugasyon (bakteriyel plazmidler ve konjugatif transpozonlar yoluyla), transformasyon (serbest DNA'nın çevreden alınmasıyla) ve transdüksiyon (bakteriyofajlarla) gibi büyük bir ölçüde antibiyotiğe dirençli bakterilerin geliştirilmesinden sorumlu mekanizmalar bulunmaktadır (Marti ve ark., 2014). Antibiyotik direnç genlerinin patojenler arasında aktarılmasında özellikle, akuvatik ortamların önem taşıdığı ve bu ortamların rezervuar olarak görev yaptıkları bildirilmektedir (Heuer ve ark., 2009). Dolayısıyla balık patojenlerinde görülen antibiyotik direncinin ve izolatların sahip oldukları direnç genlerinin belirlenmesi hem hayvan sağlığı hem de insan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Ülkemizde ve dünyada *L. garvieae* izolatlarının sahip oldukları antibiyotik direnç genlerinin ortaya konulduğu sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Türe ve Boran (2015) 28 *L. garvieae*

saha izolatinında 12 farklı antibiyotik direnç geninin varlığını inceledikleri çalışmalarında, izolatların en yaygın olarak *tetB* (20/28) ve *ereB* (19/28) direnç genlerini taşıdıklarını saptamışlardır. Araştırdıkları diğer direnç genlerinden 13 izolatın *floR*, 12 izolatın *sulII* ve *blaTEM* ( $\beta$ -lactam direnç geni), 3 izolatın *sulI*, 2 izolatın *tetS*, *dhfrI* ve *aadA* (gentamisin direnç geni) taşıdığını, izolatların hiç birinin *ereA*, *blaPSE* ( $\beta$ -lactam direnç geni) ve *ampC* ( $\beta$ -lactam direnç geni) taşımadığını ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte izolatların tamamının en az 2 antibiyotik direnç geni taşıdığını bildirmişlerdir. 25 adet *L. garvieae* saha izolatinın incelendiği bu tez çalışmasında ise, Türe ve Boran (2015)'in aksine izolatların düşük düzeyde antibiyotik direnç geni taşıdığı belirlenmiştir. Çalışmamızda bir izolatın (%4) *sulI* direnç genine, altı izolatın (%24) *sulII* direnç genine ve bir izolatın (%4) *tetD* direnç genine sahip olduğu belirlendi. İzolatlar arasında *ermB*, *ermF*, *floR*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE* *tetG* ve *dhfr1* direnç genlerinin varlığı saptanamamıştır. Çalışmamızla benzer şekilde Duman, (2017) 137 *L. garvieae* saha izolatinın incelendiği çalışmada izolatların *tetA* ve *floR* direnç genlerine sahip olmadığını belirlemiştir. Ancak yine aynı çalışmada, her iki çalışmada ortak olarak araştırılan genlerden *ermB*'nin dört izolat da var olduğu bildirilmiştir. Bunun dışında izolatların dokuzunda *ermA*, yedisinde *tetM* ve dördünde *tetS* direnç genine sahip olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda *sulI* ve *sulII* direnç genine sahip olduğu belirlenen 4, 10 ve 25 nolu izolatın fenotipik olarak trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı dirençli, 15 ve 22 nolu izolatın ise orta düzeyde duyarlı oldukları belirlenmiştir.

İran'da yapılan bir çalışmada 49 *L. garvieae* izolatinında yüksek düzeyde (%89,4) *tetA* geninin varlığına rastlanılmıştır (Raissy ve ark., 2015). Aynı çalışmada, tez çalışmasında bulduğumuz tek tetrasiklin direnç geni olan *tetD* ise %15,3 oranında saptanmıştır. Yine İran'da yapılan bir başka çalışmada ise 24 *L. garvieae* izolatu incelenmiş ve izolatların dokuzunun *ermB*, onunun ise *tetS* direnç genine sahip oldukları belirlenmiştir (Raissy ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında ise *ermB* direnç geni saptanamamıştır. Sonuçlar farklı coğrafik bölgelerden izole edilen izolatların farklı direnç genlerine sahip olduklarını göstermektedir. Bu farklılıkların işletmelerde hastalıkların tedavisinde bölgesel olarak kullanılan antibiyotik farklılıklarından ve/veya izolatların bölgeler arası yumurta ve balık nakilleri ile yayılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bakteriyel izolatlar arasında genetik ilişkilerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan metotlardan birisi RAPD-PCR metodudur (Onuk ve ark., 2011; Altun ve ark., 2013). Araştırmacılar bu metotta random primer olarak farklı primer dizilerinin kullanılabilirliğini değerlendirmişlerdir. Ravelo ve ark. (2003) farklı coğrafik bölge ve balık türlerinden izole edilen *L. garvieae* izolatlarını P5 ile P6 primerlerinin kullanıldığı RAPD-PCR ile genotiplendirmişlerdir. Çalışmalarında kullandıkları izolatları 3 geno gruba ayırmışlardır. Alabalıklardan izole edilen İspanya, Portekiz, İngiltere ve Türkiye izolatlarının 1. grupta, yine alabalıklardan izole edilen Fransa ve İtalya suşlarının 2. grupta ve sarıkuyruk balıklarından izole edilen Japon izolatları ile *L. garvieae* NCDO 2155 referans suşun ise 3. grupta kümelendiğini bildirmişlerdir. Foschino ve ark. (2008) *L. garvieae* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede M13 ve P5 primerlerini kullanmışlardır. M13 primerinin en iyi ayırım gücüne sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu primer ile İtalyan balık ve çiftlik örneklerinden elde edilen toplam 81 izolatı 5 küme içerisinde 52 RAPD genotipine ayırmışlardır. Balıklardan izole edilen izolatların ise 3 farklı kümeye dağıldığı görülmüştür. Sonuçta balık ve çiftlik izolatları arasında düşük genetik ilişkinin olduğu belirlenmiştir. Altun ve ark. (2013) *L. garvieae* izolatlarının ERIC2 primeri ile değişken bant paternleri verdikleri, dolayısıyla epidemiyolojik araştırmalarda bu random primerin kullanılabilir olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar *L. garveae* izolatlarını 3 farklı genotip içeren bir küme içerisinde gruplamış ve Ravelo ve ark. (2003)'ün çalışmalarına paralel olarak ülkemizden izole edilen bazı izolatların İspanya ve İngiltere izolatlarıyla yüksek oranda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada Türkiye kökenli izolatların büyük bir bölümü (8 izolat) predominant tip olan LG1 genotipine dahil olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında 25 *L. garvieae* saha izolatının ERIC2 primeri ile üretken bant paternleri verdiği gözlenmiş ve izolatlar üç farklı genotip içerisine yerleştirilmiştir. İzolatların 16'sının (%64) baskın genotip olan LG2 içerisine dahil olduğu, unique tip'te ise sadece bir izolatın bulunduğu belirlenmiştir. İzolatların büyük çoğunluğunun Altun ve ark. (2013)'ün yapmış oldukları çalışmada olduğu gibi baskın bir genotip içerisinde gruplanmış olması Türkiye kökenli *L. garvieae* izolatlarının tek bir epidemiyolojik suş ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Su ürünleri yetiştiriciliğinde meydana gelen periyodik hastalık salgınlarının %54,9'undan bakteriyel patojenlerin, %22,6'sından virusların, %3,1'inden mikotik ajanların ve %19,4'ünden paraziter ajanların sorumlu olduğu bildirilmektedir (Dhar ve ark., 2014). Yetiştiricilik sistemlerinde meydana gelen bakteriyel hastalıkların tedavisinde antimikrobiyal ajanlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Heuer ve ark., 2009) Ancak, bu maddelerin bilinçsiz ve yaygın kullanımı antimikrobiyal direnç gelişimine neden olabilmektedir. Bu bağlamda işletmelerde görülen hastalıkların ve hastalık etkenlerinin antimikrobiyal aktiviteleri ve etkenlerin sahip oldukları direnç genlerin izlenmesi hem balık sağlığı hem de insan sağlığı açısından önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe yaygın olarak görülen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan *L. garvieae* izolatlarının antimikrobiyal etkinlikleri ve sahip oldukları çeşitli direnç genleri ortaya konuldu. Elde edilen veriler izolatların çoklu antibiyotik direncine sahip olduğunu gösterdi. Antimikrobiyal direnç gelişiminin önüne geçilebilmesi için sahada balık hastalıklarının uygun olmayan şekilde tedavi edilmesinin veya ruhsatsız antibiyotik kullanımının önlenmesi için tedbirlerin alınması gerekmektedir. İşletmelerde kullanılan ilaçların mutlaka reçeteli olmasının ve ilaçların kayıt altına alınmasının sağlanması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Afonso A, Silva J, Gomes S. *Lactococcus garvieae* trout infections in Portugal: a new challenge on fish vaccinology. *IBMC News* 2003;7; 4-6.
- Altun S, Diler Ö, Adiloğlu AK. Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16S rDNA sequencing. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 2004;24:119-125.
- Altun S, Onuk EE, Çiftçi A, Büyükekiz AG, Duman M. Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. *Kafkas Üni Vet Fak Derg* 2013;19:375-381.
- Anshary H, Kurniawan RA, Sriwulan S, Ramli R, Baxa DV. Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. *Springerplus* 2014;24;3:627.
- Aoki T, Takami K, Kitao T. Drug resistance in a nonhemolytic *Streptococcus* sp. isolated from cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis Aquat Org* 1990;8:171-177.
- Austin B, Austin DA. *Bacterial fish pathogens, diseases of farmed and wild fish*, 3rd ed. Chichester, UK: Springer-Praxis; 1999.
- Austin B, Austin AD. *Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish*, 5th edn. Springer/Praxis Publishing, Chichester, 2012.
- Bastardo A, Ravelo C, Castro N, Calheiros J, Romalde JL. Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Shellfish Immunol* 2012;32(5):756-61.
- Baydan E, Yurdakök B, Aydın FG. Balıklarda antibiyotik kullanımı. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci* 2012;3(3):45-52.
- Bercovier H, Ghittino C, Eldar A. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Dev Biol Stand* 1997;90:153-160.
- Boomker J, Imes G, Cameron C, Naude T, Schoonbee H. Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. *Onderstepoort J Vet Res* 1979;46:71-77.
- Chang CI, Lee CF, Tsai JM, Wu CC, Chen LH, Chen SC, Lin KJ. Development of a selective and differential medium for capsulated *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis* 2014;37:719-728.
- Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). The susceptibility of the isolates was determined according to Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility

- Testing: Twenty-First Informational Supplement, Zone Diameter Standards for *Enterococcus* spp. (7). CLSI.: Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first Informational Supplement, 2011.
- Collins MD, Farrow JA, Phillips BA, Kandler O. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. J Gen Microbiol 1983;129:3427-31.
- Dhar AK, Manna SK, Allnutt FCT. Viral vaccines for farmed finfish. Virus Dis 2014;25(1): 1-17.
- Didinen BI, Yardımcı B, Onuk EE, Metin S, Yıldırım P. Naturally *Lactococcus garvieae* infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): New histopathological observations, phenotypic and molecular identification. Rev Med Vet 2014;165(1-2):12-19.
- Diler O, Altun S, Adiloglu AK, Kubilay A, Işıklı B. First Occurrence of *Streptococcosis* Affecting Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol 2002;22:21-25.
- Domenech A, Prieta J, Fernandez-Garayzaabal J, Collins MD, Jones D, Dominguez L. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. Microbiologia (SEM) 1993;9:63-68.
- Duman M. Gökkuşuğu alabalıklarında görülen motil aeromonas (*Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*), *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* bakterilerinin antimikrobiyal duyarlılıkları ve duyarlılıkta rol oynayan genlerin tespiti. Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa, Doktora Tezi, 2017; 70.
- Eldar AC, Ghittino C, Asanta L, Bvozzetz E, Gorla M. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. Curr Microbiol 1996;32:85-88.
- Fukushima HC, Leal CA, Cavalcante RB, Figueiredo HC, Arijo S, Moriñigo MA, Ishikawa M, Borra RC, Ranzani-Paiva MJ. *Lactococcus garvieae* outbreaks in Brazilian farms *Lactococcosis* in *Pseudoplatystoma* sp. - development of an autogenous vaccine as a control strategy. J Fish Dis 2017;40(2):263-272.
- Foschino R, Nucera D, Volponi G, Picozzi C, Ortoffi M, Bottero MT. Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. J Applied Microbiol 2008;105(3):652-62
- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB). İyi üretim uygulamaları sertifikası (GMP) bakanlığımızca verilmiş veya kabul edilmiş pazarlama izinli veteriner biyolojik ürünler. <https://www.tarim.gov.tr/Konular/Veteriner-Hizmetleri/Veteriner-Saglik-Urunleri>. 2018a. İnternet Erişimi: 15.03.2018.



- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB). Bakanlığımızdan izinli veteriner tıbbi ürünler listesi. <https://www.tarim.gov.tr/Konular/Veteriner-Hizmetleri/Veteriner-Saglik-Urunleri>. 2018b. İnternet Erişimi: 15.03.2018.
- Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis* 2009;49:1248-1253.
- Hirono I, Aoki T. Characterization of structure and genes of R Plasmid from fish-pathogenic *Lactococcus garvieae*. *Proc Jpn Soc Antimicrob Anim* 2001;23:22-24.
- Kav K, Erganiş O. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. *Bull Vet Inst Pulawy* 2008;52: 223-226.
- Kawanishi M, Kojima A, Ishihara K, Esaki H, Kijima M, Takahashi T, Suzuki S, Tamura Y. Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Lett Appl Microbiol* 2005;40:322-328.
- Kawanishi M, Yoshida T, Yagashiro S, Kijima M, Yagyu K, Nakai T, Murakami M, Morita H, Suzuki S. 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. *J Appl Microbiol* 2006;101(2):496-504.
- Kubilay A, Altun S, Ulukoy G, Diler O. *Lactococcus garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi* 2005;1(1):39-48.
- Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* 2008;8:1-13.
- Kusuda K, Kawai K, Salati F, Banner CR, Fryer JL. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol* 1991;41:406-409.
- Marti E, Variatza E, Balcazar JL. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol* 2014;22(1):36-41.
- Meyburgh CM, Bragg RR, Boucher CE. *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Dis Aquat Org* 2017;123:67-79.
- Nakajima N, Kawanishi M, Imamura S, Hirano F, Uchiyama M, Yamamoto K, Nagai H, Futami K, Katagiri T, Maita M, Kijima M. Development of a serology-based assay for efficacy evaluation of a lactococcicosis vaccine in *Seriola* fish. *Fish Shellfish Immunol* 2014;38(1):135-9.

- National Center for Biotechnology Information (NCBI), İnternet Erişim Tarihi: 07.03.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1363>.
- Nelson MC, Varney JS, Welch TJ, Graf J. Draft genome sequence of *Lactococcus garvieae* strain PAQ102015-99, an outbreak strain isolated from a commercial trout farm in the Northwestern United States. *Genome Announc* 2016;4;4(4).
- Ng LK, Marti, I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cel Prob* 2001;15:209-215.
- Ngo TPH, Smith P, Bartie KL, Thompson KD, Verner-Jeffreys DW, Hoare R, Adams A. Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from the United Kingdom. *J Fish Dis* 2018;41:309-320.
- Oidtmann BC, Thrush MA, Denham KL, Peeler EJ. International and national biosecurity strategies in aquatic animal health. *Aquaculture* 2011;320:22-33.
- Onuk EE, Çiftçi A, Fındık A, Çiftçi G, Altun S, Balta F, Özer S, Çoban AY. Phenotypic and Molecular Characterization of *Yersinia ruckeri* Isolates from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in Turkey. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2011;124(7-8):320-328.
- Osman KM, Al-Maary KS, Mubarak AS, Dawoud TM, Moussa IMI, Ibrahim MDS, Hessain AM, Orabi A, Fawzy NM. Characterization and susceptibility of streptococci and enterococci isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) showing septicaemia in aquaculture and wild sites in Egypt. *BMC Vet Res* 2017;25:13(1):357
- Özer S, Bulduklu PS, Dönmez E. Mersin ilinde yetiştiriciliği yapılan Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) streptokokkozis varlığı. *Journal of Fisheries Sciences* 2008;2(3):272-283.
- Palacios MA, Zamora MJ, Velazquez J, Zamora E, Duran A. Streptococcus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. *Boll Sci Ital Pathol* 1993;13:11-14.
- Pei R, Kim SC, Carlson KH, Pruden A. Effect of river land scape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res* 2006;40:2427-2435.
- Pereira F, Ravelo C, Toranzo AE, Romalde JL. *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 2004;24:274-279.
- Raissy M, Moumeni M. Detection of antibiotic resistance genes in some *Lactococcus garvieae* strains isolated from infected Rainbow trout. *Iran J Fish Sci* 2016;15(1):221-229.

- Raissy M, Shahrani M. Detection of tetracycline resistance genes in *Lactococcus garvieae* strains isolated from Rainbow trout. World Academy of Science, Engineering ve Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food ve Biotechnological Engineering 2015;9(2):126-129.
- Ravelo C, Magarinos B, Lopez-Ramade S, Toranzo AE, Romalde JL. Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by Random Amplified polymorphic DNA Analysis. J Clin Microbiol 2003;41(2):751-756.
- Ravelo C, Magariños B, Romalde JL, Toranzo AE. Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. Bull Eur Assoc Fish Pathol 2001;21:136-144.
- Roberts MC, Chung WO, Roe D, Xia M, Marquez C, Borthagaray G, Whittington WL, Holmes KK. Erythromycin resistant *Neisseria gonorrhoeae* and oral commensal *Neisseria* spp. carry known rRNAmethylase genes. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(6):1367-1372.
- Ruhsatlı Veteriner Tıbbi Ürünler-Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, <http://www.gkgm.gov.tr/vtu/> Erişim tarihi: 11.05.2016.
- Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Klipper-Bälz R, Collins MD, Fisher W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to genus *Lactococcus* gen. nov. Syst Appl Microbiol 1985;6:183-195.
- Shahi N, Mallik SK, Sahoo M, Chandra S, Singh AK. First report on characterization and pathogenicity study of emerging *Lactococcus garvieae* infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), from India. Transbound Emerg Dis 2018;1-10.
- Tandel K, Bhatt P, Ranjan P, Rathi KR. Meningitis caused by *Lactococcus garvieae*. Med J Armed Forces India 2017;73(1):94-96.
- Taylor NGH, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? Trends Ecol Evol 2011;26(6):278-284.
- Teixeira LM, Merquior VLC, Vianni MCE, Carvalho MGS, Fracalanza SEL, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Facklam RR. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. Int J Syst Bacteriol 1996;46:664-668.
- Tejedor JL, Vela AI, Gibello A, Casamayor A, Domínguez L, Fernandez-Garayzabal JF. A genetic comparison of pig, cow and trout isolates of *Lactococcus garvieae* by PFGE analysis. Lett Appl Microbiol 2011;53(6):614-619.

- Timur G, Yardimci RE, Urku C, Canak O. Marmara Bölgesi kültür gökkuşağı alabalıklarında lactococcosisin bakteriyolojik ve histopatolojik metotlarla teşhisi. İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi 2011;26(1):63-81.
- Toranzo AE, Devesa S, Heinen P, Riaza A, Núñez S, Barja JL. Streptococcosis in cultured turbot caused by an Enterococcus-like bacterium. Bull Eur Assoc Fish Pathol 1994;14:19-23.
- Tsai MA, Wang PC, Liaw LL, Yoshida T, Chen SC. Comparison of genetic characteristics and pathogenicity of *Lactococcus garvieae* isolated from aquatic animals in Taiwan. Dis Aquat Organ 2012;102(1):43-51.
- Türe M, Altinok I. Detection of putative virulence genes of *Lactococcus garvieae*. Dis Aquat Org 2016;119:59-66.
- Türe M, Boran H. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Lactococcus* sp. strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bull Vet Inst Pulawy 2015;59:37-42.
- Van TTH, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. Int J Food Microbiol 2008;124:217-223.
- Vendrell D, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuola I, De Blas I, Girones O, Muzquiz JL. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comp Immun Microbiol Infect Dis 2006;29:177-198.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991;19(24):6823-6831.
- Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J Clin Microbiol 1998;36:983-985.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İlker HANCI

Doğum Yeri: Vezirköprü

Doğum Tarihi: 05.11.1978

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Selçuk Unv. Vet. Fakültesi, 1995- 2001, Konya  
Veteriner Sağlık Meslek Lisesi, 1992-1995, Samsun  
Akpınar Öğretmen Lisesi, 1989-1992, Ladik/Samsun

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Malazgirt İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 1996-2002  
Vezirköprü İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 2002-2012  
Sinop İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 2012-.....

E-posta: ilkerhanci@hotmail.com