



## Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Görülen *Lactococcus garvieae* Enfeksiyonu ve Tedavisi<sup>[\*]</sup>

Fikri BALTA<sup>1\*</sup> İsmail KARATAY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Anabilim Dalı, 53100, Rize, Türkiye

<sup>2</sup>Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, 53100, Rize, Türkiye

Geliş/Received: 17.11.2021

Kabul/Accepted: 16.12.2021

Yayın/Published: 31.12.2021

Atf yapmak için: Balta, F. & Karatay, İ. (2021), Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Görülen *Lactococcus garvieae* Enfeksiyonu ve Tedavisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 6(4), 651-661.

How to cite: Balta, F. & Karatay, İ. (2021). *Lactococcus garvieae* Infection and Treatment Observed in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 6(4), 651-661.

\*ID: <https://orcid.org/0000-0002-1823-5823>  
ID: <https://orcid.org/0000-0003-1205-0577>

\*Corresponding author:

Fikri BALTA  
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su  
Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Anabilim Dalı,  
Rize, Türkiye  
✉: [fikri.balta@erdogan.edu.tr](mailto:fikri.balta@erdogan.edu.tr)

**Öz:** Bu çalışma, 2012 Ocak ve 2017 Eylül tarihleri arasında Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki 12 farklı Gökkuşluğu alabalık çiftliklerinden balık örnekleri toplandı. Bu örneklerden toplam 100 adet bakteri izole edildi. Tüm izolatların tanımlanması geleneksel biyokimyasal testler, API 20 strep testi ve PZR testi kullanılarak yapıldı. Pozitif kontrol olarak ATCC 43921 referans izolatı kullanıldı. API 20 strep test sonuçlarına göre izole edilen 100 bakteri izolatından 65 izolatın *Lactococcus garvieae* olduğu belirlendi. Bu izolatları moleküler olarak *L. garvieae* izolatına özel pLG-1 ve pLG-2 (16S rRNA) referans genleri kullanılarak PCR testi ile doğrulandı. Çalışmanın sonucunda, Gökkuşluğu alabalıklarından izole edilen 100 izolatın 65'inin *L. garvieae* olduğu teyit edildi. Antibiyogram test sonuçlarına göre izolatların sulfametoksazol, streptomisin ve sulfametoksazol+trimetoprim'e %100, ampisiline %94,2, oksitetrasiklin %72,5, eritromisine %55,07 ve oksolinik asit %43,5 oranında dirençli olduğu tespit edildi. Ek olarak enrofloksasin %26,09, doksisisikline %20,3, amoksiklin ve florfenikole %8,7 oranında daha düşük seviyede direnç tespit edildi. Hastalığın tedavisinde, balık üreticisine antibiyogram test sonuçlarına göre en etkili olan florfenikol, amoksiklin ve doksisisiklin antibiyotiklerden birinin kullanılması önerildi.

**Anahtar kelimeler:** Antimikrobiyal ajanlar, API 20 strep, *L. garvieae*, PZR.

## *Lactococcus garvieae* Infection and Treatment Observed in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

**Abstract:** In this study, fish samples were collected from 12 different Rainbow trout farms in the Eastern Black Sea Region between January 2012 and September 2017. A total of 100 bacteria were isolated from these samples. Identification of all isolates were carried out by using conventional biochemical tests, API 20 strep tests and PCR tests. ATCC 43921 reference isolate was used as a positive control. According to API 20 strep test results, 65 isolates from 100 bacterial isolates were determined to be *Lactococcus garvieae*. These isolates were molecularly confirmed by PCR testing using the pLG-1 and pLG-2 (16S rRNA) reference genes specific to *L. garvieae* isolate. It was confirmed by PCR testing using the reference genes pLG-1 and pLG-2 (16S rRNA) specific to the *L. garvieae* isolate. As a result of this study, 65 isolates out of 100 bacterial isolates isolated from diseased rainbow trout were confirmed to be *L. garvieae*. According to the antibiogram test results, the isolates were 100% resistant to sulfamethoxazole, streptomycin and sulfamethoxazole+trimethoprim, 94.2% to ampicillin, 72.5% to oxytetracycline, 55.07% to erythromycin and 43.5% to oxolinic acid. In addition, lower levels of resistance were detected with enrofloxacin 26.09%, doxycycline 20.3%, amoxicillin and florfenicol 8.7%. In the treatment of the disease, the fish producer was advised to use one of the most effective antibiotics, florfenicol, amoxicillin and doxycycline, according to the antibiogram test results.

\*Sorumlu yazar:

Fikri BALTA  
Recep Tayyip Erdoğan University, Faculty  
of Fisheries, Department of Diseases, Rize,  
Turkey  
✉: [fikri.balta@erdogan.edu.tr](mailto:fikri.balta@erdogan.edu.tr)

**Keywords:** Antimicrobial agents, API 20 strep, *L. garvieae*, PCR.

[\*] Bu çalışma, İsmail KARATAY'ın yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

This study was produced from the master thesis prepared by İsmail KARATAY.

## GİRİŞ

Laktokokozis hastalığı ilk defa 1974 yılında Japonya’da kültürü yapılan sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiat*) balıklarında görülen önemli bir bakteriyel hastalık etkeni olarak rapor edilmiştir (Kusuda vd., 1991; Çağırğan & Tanrikul, 1997; Kusuda & Salati, 1999). Hastalık etkeni, *Lactococcus garvieae* (Synonim=*Enterococcus seriolicida*)’nın dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki tatlı ve tuzlu su balık türlerinde hastalık meydana getirdiği bildirilmiştir (Toranzo vd., 1994; Elder & Ghittino, 1999; Muzquiz vd., 1999; Chen vd., 2001). *L. garvieae* enfeksiyonunun İspanya, İtalya, Portekiz, İngiltere, Fransa, Avustralya, Güney Afrika ve Asya ülkelerinde kültürü yapılan gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) çiftliklerinde görüldüğü rapor edilmiştir (Çağırğan & Tanrikul, 1997; Elder & Ghittino, 1999; Chang vd., 2002; Çağırğan, 2004; Türe vd., 2012, Balta & Dengiz Balta, 2019). *L. garvieae* ile enfekte çiğ balık tüketilmesiyle insanlarda sporadik vakalar rapor edilmiştir (Wang vd., 2007). Dolayısıyla insanlardaki hastalık olgularından etkenin izole edilmesi etkenin zoonoz karakterini ortaya koymaktadır (Zlotkin vd., 1998; James vd., 2000; Mofredj vd., 2000; Vela vd., 2000; Yiu vd., 2007). Önceden *Streptococcus garvieae* olarak tanımlanan *L. garvieae*, ilk olarak İngiltere’deki mastitisli ineklerden izole edilmiştir (Collins vd., 1983). *L. garvieae* ile enfekte çiğ balık tüketilmesiyle insanlarda sporadik vakalar rapor edilmiştir (Wang vd., 2007). Ülkemizde ise 2001 yılında Ege Bölgesinde Gökkuşağı alabalığı işletmelerinde streptokokozis enfeksiyonun ortaya çıktığı ve yüksek mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir (Çağırğan & Tanrikul, 1997; Diler vd., 2002; Altun vd., 2004). Ülkemizde Gökkuşağı alabalığı işletmelerinde son yıllarda ortaya çıkan *L. garvieae* enfeksiyonları hızlı bir yayılım göstermiş ve %90’a varan ölümler yüzünden sürdürülebilir üretimi engelleyerek büyük ekonomik kayıplara neden olmuştur. Karadeniz bölgesinde, özellikle yaz aylarında dere ve baraj göllerinde kültürü yapılan her boy Gökkuşağı alabalıklarında yüksek su sıcaklığının yanı sıra yoğun stoklama, düşük su kalitesi (pH, amonyak, nitrit, vs) ve strese bağlı olarak ortaya çıkan hastalık vakalarında ölümlerin %50-90’a ulaştığı ve büyük ekonomik kayıplara neden olduğu rapor edilmiştir (Türe vd., 2012; Balta & Dengiz Balta, 2019).

Ülkemizde günümüze kadar; Kubilay vd. (2005), *L. garvieae* izolatlarında antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi, Türe vd. (2012), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi kullanılarak *L. garvieae*’nin genetik varlığının ve yayılımının belirlenmesi, Öztürk vd. (2013), Orta Karadeniz Bölgesi’nde Gökkuşağı alabalıklarında antimikrobiyal hassasiyeti ve hastalık

etkeninin tespit edilmesi, Türe vd. (2012), Doğu Karadeniz Bölgesi’ndeki Gökkuşağı alabalıklarında *L. garvieae* etkeni ve antimikrobiyal duyarlılığı ortaya konulması, Çağırğan (2004), Türkiye’den izole edilen *L. garvieae* izolatlarının biyotiplendirilmesi, Kav ve Erganiş, (2007) ise Konya Bölgesi’ndeki Gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) çiftliklerinden toplanan hastalıklı balıkların iç organlarından *L. garvieae*’nin izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin tespit edilmesi, Akşit ve Kum, (2008) gökkuşağı alabalıklarında oldukça sık rastlanılan patojen mikroorganizmaların varlığının belirlenmesi ve antimikrobiyallere karşı hassasiyet düzeylerinin tespit edilmesi gibi birçok çalışma yapılmıştır.

Bu çalışma ile Doğu Karadeniz Bölgesindeki Trabzon, Rize, Artvin, Gümüşhane, Ordu ve Erzurum il sınırları içerisinde yer alan ticari Gökkuşağı alabalığı işletmelerinde 6 yıl boyunca meydana gelen kok enfeksiyonlarının varlığının tespit edilmesi çalışılmıştır. *L. garvieae* ile kontamine işletmelerin belirlenmesi ve hastalığın tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERIAL AND METHOD

**Balık Örnekleri:** Doğu Karadeniz Bölgesi’nde 2012-2017 yıllarının 12 farklı Gökkuşağı alabalığı çiftliğinden özellikle su sıcaklığının 18°C’nin üzerine yükseldiği yaz mevsiminde hastalık semptomu gösteren ve ölmek üzere olan balıklardan her seferinde en az 10 balık laboratuvara laboratuvara getirildi. Örneklemde, rengi kararmış ve çift taraflı ekzoftalmus görülen balıkların seçilmesine özen gösterildi. Bu çalışma esnasında laboratuvara toplam 4320 adet (6 ay x 6 yıl x 10 balık x 12 çiftlik) gökkuşağı alabalığı analiz edildi. Laboratuvara getirilen balıklar öncelikle 2-phenoxy etanol ile derin anestezi altına alındı. Nekroskopide sonucunda bağırsakların boylu boyuna hemorajik olan, aynı zamanda hava kesesi üzerinde yaygın kanama alanların bulunan, karaciğerinde farklı derecede renk değişimleri görülen, karaciğer ve plorik sekanın üzerinde nokta şeklindeki kanamalar gözlenen balıklar kok enfeksiyonu yönünden şüpheli olarak ele alındı. Balıklarda görülen makroskopik bulgular, işletmelerde görülen mortalite oranları ve tedavi süresince uygulanan protokoller kayıt altına alındı.

**Hastalık Etkenin izolasyonu:** Balıkların ön böreğinden öze yardımı ile alınan örnekler lam üzerinde bir damla steril FTS (%0,85 NaCl) ile karıştırılarak mikroskopun 40’lık objektif altında incelendi. Hareketsiz ve kok olarak görülen bakteriler Gram boyama yöntemiyle boyandı. Boyanan preparatlar 100’lük objektifte muayene edildi. Mikroskopik bakıda tek, ikili ve kısa zincirler (5-7

kok) halinde mor renkte Gram pozitif olan bakterilerin *L. garvieae* olabileceği düşünüldü. Örnekleme yapılan Gökkuşluğu alabalık işletmelerinin coğrafik yerleşimleri, örnekleme tarihi, izolasyonun yapıldığı organlar ve izolat numaralarına ait bilgiler Tablo 1’de verildi.

Mikroskopik kontrol sonrası balıkların özellikle böbrek, dalak, nadiren karaciğerlerinden ve eğer mevcutsa deri lezyonlarından Triptik Soy Agar (TSA) ve Broth (TSB), Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ve Broth (BHIB)’a steril bir öze yardımı ile ekimler yapıldı. Ekzoftalmus semptomu gösteren ve bütünlüğünü koruyan (patlamamış) gözlerden steril öze ve swap yardımı ile göz içi sıvısından TSB’a ve TSA’ya aseptik olarak ekimler yapıldı. Bu besi yerleri 20±1°C 48 saat inkübasyona bırakıldı. TSA’da 24 ve 48 saat

sonunda üreyen küçük beyaz kolonilerin değerlendirilmeye alındı. Bu amaçla izole edilen bakterilere hareket muayenesi, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapıldı ve hareketsiz, Gram pozitif, katalaz ve oksidaz testi negatif olan izolatlar seçildi. Çalışma esnasında izole edilen 100 bakteri izolatının TSA’da saf kültürleri üretildi. Bakterilere yapılan hareket muayenesinde hareketsiz, katalaz ve oksidaz testi negatif olan Gram boyamada mikroskopik sahada tek, ikili ve kısa zincir tarzında mor renkte olan toplam 65 adet izolat çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılmak üzere seçildi. TSB’de üretilen bu izolatların taze kültürleri %20 gliserol içeren 1,5 ml’lik epondorf tüplerde 1 ml hacimde homojenize edilip etiketlenerek -80°C’de derin dondurucuda çalışılmak üzere stoklandı.

**Tablo 1.** Gökkuşluğu alabalıklarından izole edilen *L. garvieae* izolatlarına ait veriler.

**Table 1.** Data of *L. garvieae* isolates isolated from rainbow trout.

No	İN	Orijin	Yer	Tarih	No	İK	Orijin	Yer	Tarih
1	PY1	Böbrek	Trabzon	16.08.17	34	Y338	Böbrek	Rize	21.07.13
2	FH20	Böbrek	Rize	14.09.14	35	Y449	Böbrek	Trabzon	04.08.13
3	B116	Böbrek	Trabzon	13.08.17	36	B64	Göz	Rize	24.07.17
4	B157	Böbrek	Trabzon	23.08.17	37	B29	Böbrek	Artvin	01.07.17
5	B173	Göz	Sivas	03.09.17	38	B67	Dalak	Rize	24.07.17
6	B176	Göz	Sivas	03.09.17	39	B66	Böbrek	Rize	24.07.17
7	B185	Böbrek	Trabzon	08.09.17	40	Y380	Böbrek	Artvin	18.07.13
8	B186	Böbrek	Trabzon	08.09.17	41	B36	Böbrek	Rize	02.07.17
9	B187	Böbrek	Trabzon	08.09.17	42	B69	Böbrek	Rize	24.07.17
10	B188	Böbrek	Trabzon	08.09.17	43	B70	Dalak	Rize	24.07.17
11	B193	Böbrek	Rize	09.09.17	44	B71	Göz	Rize	24.07.17
12	B197	Böbrek	Rize	09.09.17	45	B82	Böbrek	Trabzon	31.07.17
13	B201	Böbrek	Rize	14.09.17	46	B84	Böbrek	Trabzon	31.07.17
14	Y73	Böbrek	Trabzon	21.07.14	47	B85	Böbrek	Trabzon	31.07.17
15	Y126	Dalak	Trabzon	28.08.14	48	B86	Dalak	Trabzon	31.07.17
16	Y127	Böbrek	Trabzon	28.08.14	49	B87	Böbrek	Trabzon	31.07.17
17	Y180	Göz	Trabzon	13.09.14	50	B88	Böbrek	Trabzon	31.07.17
18	Y182	Böbrek	Trabzon	13.09.14	51	B89	Göz	Trabzon	31.07.17
19	Y183	Göz	Trabzon	13.09.14	52	B90	Göz	Trabzon	31.07.17
20	Y184	Böbrek	Trabzon	13.09.14	53	B114	Göz	Trabzon	13.08.17
21	Y185	Böbrek	Trabzon	13.09.14	54	B115	Göz	Trabzon	31.07.17
22	Y196	Böbrek	Trabzon	20.10.14	55	B116	Göz	Erzurum	13.08.17
23	RT39	Böbrek	Rize	19.05.12	56	B133	Böbrek	Erzurum	13.08.17
24	R83	Böbrek	Rize	18.06.12	57	B134	Böbrek	Rize	13.08.17
25	R103	Böbrek	Trabzon	25.06.12	58	B135	Böbrek	Rize	13.08.17
26	R151	Böbrek	Trabzon	06.07.12	59	B137	Karaciğer	Rize	13.08.17
27	R164	Böbrek	Rize	21.07.12	60	B149	Böbrek	Trabzon	23.08.17
28	R165	Böbrek	Rize	21.07.12	61	B150	Dalakk	Trabzon	23.08.17
29	R197	Böbrek	Trabzon	04.08.12	62	B151	Böbrek	Trabzon	23.08.17
30	R198	Göz	Trabzon	17.07.13	63	B152	Böbrek	Trabzon	23.08.17
31	R648	Böbrek	Rize	03.10.15	64	B154	Böbrek	Ordu	23.08.17
32	R656	Böbrek	Rize	03.10.15	65	B158	Göz	Gümüşhane	23.08.17
33	B159	Göz	Trabzon	23.08.17	66	Ref.	Meme	ATCC	1984-86

İN: İzolat numarası. Ref.: *L. garvieae* (ATCC 43921) referans suşu (Collins et.al 1984/Schleifer vd., 1986).

İN: Isolate number. Ref.: *L. garvieae* (ATCC 43921) reference strain (Collins et.al 1984/Schleifer vd., 1986).

**Hastalık Etkenin Tanımlanması:** *L. garvieae* izolatları -80°C’den çıkarılıp önce TSB’de üretildi. Bu izolatlar TSA’ya ekilerek saflık kontrolleri yapıldı. Kontamine olanlar izolatlar yeniden saflaştırıldı. Saflaştırılan izolatların tamamına hareket, gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapıldı ve %5 koyun kanı ilave

edilmiş kanlı agara ekildi. Kanlı agarda 25±1°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı.

İzolatlarının kanlı agarda hemoliz oluşturup oluşturmadıkları kontrol edildi. Kanlı agarda üreyen izolatlar API 20 strep test kitine (bioMérieux, Fransa) talimatlarına uygun olarak inoküle edildi ve 25±1°C’de soğutmalı inkübatörde 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı.

API 20 strep test kitlerine 24 saat sonunda ayıraç dökülerek değerlendirme yapıldı. Şeker testleri için 48 saat sonunda son okuma yapılarak izolatlar ait biyokimyasal testlerin sonuçları değerlendirildi. API 20 strep kitlerine *L. garvieae* izolatlarının inokülasyon sonrası ilk görünümü Şekil 1’de verildi.

**Bakteri Genomik DNA’ların Elde Edilmesi:** *L. garvieae* izolatlarının genomik DNA’sı promega mini genomik DNA saflaştırma kiti kullanılarak üretici firma talimatına uygun olarak gerçekleştirildi.

**İzolatlarının PZR’la Doğrulanması:** *L. garvieae* izolatlarının tanımlanmasında 16S rRNA geninden yararlanıldı. Moleküler identifikasyonda *L. garvieae* için spesifik olan oligonükleotid primerleri pLG-1 (5'-CATAACAATGAGAATCGC-3') ve pLG-2 (5'-GCACCTCGCGGTTG-3') kullanıldı (Zlotkin vd., 1998). API 20 strep test kitleri ile tanımlanan tüm izolatların *L. garvieae* olup olmadığının doğrulanması amacıyla bu primerler yardımıyla PZR testleri yapıldı ve test sonucunda 1100 bp büyüklüğünde PZR ürünün görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edildi. Çalışmada *L. garvieae* ATCC 43921 referans suşu pozitif ve *Vibrio anguillarum* genomik DNA’ları ise negatif kontrol olarak kullanıldı. PZR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları ait bilgiler Tablo 2’de verildi. Bu çalışmada uygulanan PZR döngü koşullarına ait bilgiler Tablo 3’de verildi.

**Tablo 2.** PZR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.

Kimyasallar	Konsantrasyon	
5X Go Taq Buffer		5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µl
dNTP karışımı	10 mM	4 µl
Primer R	10 pmol	0,5 µl
Primer F	10 pmol	0,5 µl
Total DNA	50 (ng/ml)	2 µl
Taq DNA Polimeraz	5 (U/µl)	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O		9,75 µl
Toplam		25 µl

**Tablo 3.** Kullanılan primerler için PZR döngü şartları.

**Table 3.** PCR cycling conditions for the primers used.

PZR Basamakları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Ayrılma	94	3 dk	1
Ayrılma	94	1 dk	
Yapışma	43	45 sn	40
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	10 dk	1
Bekleme	4	∞	

**Tablo 5.** Tetrasiklin’e dirençli gen primerleri ve PZR döngü şartları.

**Table 5.** Tetracycline resistant gene primers and PCR cycling conditions.

Primer	Hedef gen	Sekans (5' - 3')	Gen büyüklüğü (bp)	Bağ. sıcaklığı (°C)	Literatürler
tetA-F	Tet A	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	210 bp	56	Ng vd., 2004.
tetA-R		CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG			
tetB-F	Tet B	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	659 bp	54	Ng vd., 2004.
tetB-R		GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG			
tetC-F	Tet C	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	418 bp	56	Ng vd., 2004.
tetC-R		ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC			
tetD-F	Tet D	AAA CCA TTA CGG CAT TCT GC	787 bp	55	Ng vd., 2004.
tetD-R		GAC CGG ATA CAC CAT CCA TC			

**Disk Difüzyon Testi:** İzolatların National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997) tarafından bildirilen standart disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyel duyarlılık testleri yapıldı ve değerlendirildi. Bu amaçla *L. garvieae* izolatlarının 18-24 saatlik taze kültürleri steril 1,5 ml’lik fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) içeren tüplerde McFarland No: 0,5 bulanıklığına ayarlandı. Her bir izolatın hazırlanmış olan süspansiyondan 0,1 ml alınarak Müller Hilton Agar’a (MHA) yayma tarzında ekim yapıldı. Manual bir dispenser (Bioanalyse) yardımı ile antibiyotik diskleri MHA üzerine yerleştirildi. Çalışmada, ampicilin (10 µg), oksitetrasiklin (30 µg), gentamisin (10 µg), sulfadiazin-trimetoprim (25 µg), eritromisin (15 µg), sulfametoksazol (25 µg), enrofloksasin (5 µg), florfenikol (30 µg), oksolinik Asit (2 µg), amoksiklin (10 µg) ve streptomisin (10 µg) antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Türkiye) kullanıldı. Petri kutuları 25°C’de 18 saat süresince inkübasyona bırakıldı. Üreme sonrası antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çapları dijital kumpas yardımı ile ölçüldü. Antibiyogram hassasiyetine ait test sonuçları Tablo 4’de verilen inhibisyon zon çapı standart aralıkları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

**Tetrasiklin Direnç Genlerinin Tespiti:** *L. garvieae* izolatların antibiyotik direnç genleri PZR testi kullanılarak tespit edildi. Spesifik primerler kullanılarak bakteri izolatların ilgili gen bölgeleri ayrı ayrı çoğaltılarak tetrasikline dirençli kılan hedef gen bölgeleri (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* ve *tetE*) varlığı belirlendi. Tetrasikline dirençli genlerinin tespiti için kullanılan primerlerin baz dizimleri, gen bölgeleri, ürün boyları ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 5’de verildi.

**Tablo 4.** Antibiyotik disk konsantrasyonları ve standart inhibisyon zon çapları.

**Table 4.** Antibiotic disc concentrations and standard inhibition zone diameters.

Antimikrobiyeller ve Disk Konsantrasyonu	Standart inhibisyon zon çapı (mm)			Referanslar
	D	OH	H	
T-30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	NCCLS (1997)
OA-2 µg	≤ 10	11-12	≥ 13	NCCLS (1997)
SMZ 100 µg	≤ 12	13-16	≥ 17	NCCLS (1997)
AM-10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17	NCCLS (1997)
AX	≤ 13	14-17	≥ 18	NCCLS (1997)
FFC-30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	NCCLS (1997)
S-10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15	NCCLS (1997)
ENR-5 µg	≤ 16	17-20	≥ 21	NCCLS (1997)
E-15 µg	≤ 13	14-22	≥ 23	NCCLS (1997)
SXT-25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16	NCCLS (1997)

T: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik asit, SMZ: Sulfametoksazol, AM: Ampisilin, FFC: Florfenikol, S: Streptomisin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, SXT: Trimetoprim+Sulfametoksazol. D: Dirençli, OH: Orta hassas, H: Hassas.



tetE-F  
tetE-R

Tet E

CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG  
GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG

1180 bp

56

Guardabassi vd., 2000.

## BULGULAR

Doğu Karadeniz Bölgesindeki Trabzon, Rize, Artvin, Gümüşhane, Ordu, Sivas ve Erzurum illerindeki 12 farklı Gökkuşluğu alabalığı çiftliğinden (karasal havuzlardan ve baraj göllerinde bulunan yüzer ağ kafesler) yaz aylarında yapılan örneklemeler sonucu toplam 100 bakteri izolatu elde edildi. Bu izolatların tamamına geleneksel biyokimyasal testler (Gram pozitif, katalaz ve oksidaz testi negatif) yapıldı ve testlerin sonuçlarına göre *L. garvieae* olabileceği düşünülen 65 izolata API 20 strep testi yapıldı. *L. garvieae* ATCC 43921 referans suşuna da API 20 strep testi yapıldı ve pozitif kontrol olarak kullanıldı. Standart suşun test sonuçları ile klinik izolatların test sonuçları karşılaştırılarak izolatların *L. garvieae* olabileceğine karar verildi. API 20 strep kitlerine *L. garvieae* izolatlarının inokülasyon sonrası ilk görünümü Şekil 2’de verildi.



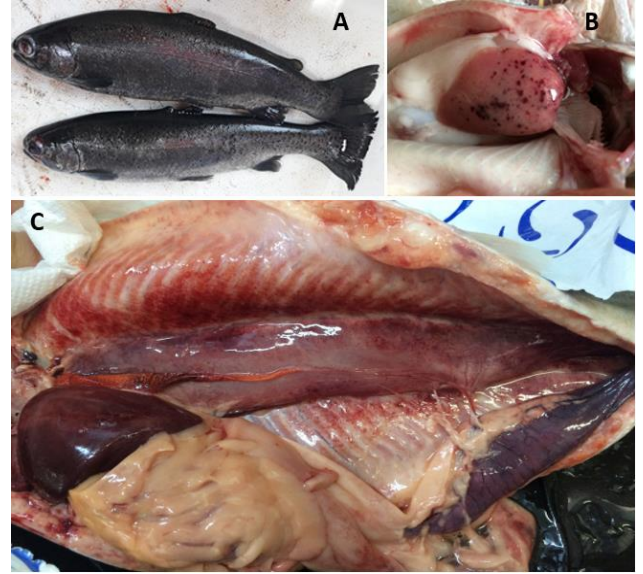
Şekil 1. API 20 strep kitlerine *L. garvieae* izolatlarının inokülasyon sonrası ilk görünümü.

Figure 1. First appearance of *L. garvieae* isolates after inoculation in the API 20 strep kits.

**Klinik semptomlar ve nekropsi bulguları:** Bu çalışmada, alabalık çiftliklerindeki havuzlardan örneklem yapılırken özellikle kok hastalığı için tipik makroskobik bulgu olarak renkte kararırma ve gözlerde çift taraflı ekzoftalmus gösteren hasta balıklar örneklendi. Hasta balıkların su yüzeyinde halsiz bir şekilde yüzdüğü gözlemlendi. Bazı balıkların havuz çıkış suyuna toplandığı, bazı balıkların ise stresli olduğu, hızlı bir şekilde hareket ettiği ve havuz dibine kaçtığı görüldü. Hastalığın ileri vakalarında özellikle her iki gözünde ekzoftalmusun ve beraberinde gözün etrafında beyaz bir halka teşkil ettiği görüldü. Hastalığın kronik safhasında balıkların gözlerinin tek veya çift taraflı matlaşarak kör olduğu tespit edildi. Balıkların bazılarında ise gözün yerinden çıkmış olduğu ve göz çukurunun boş olduğu görüldü. Ayrıca balıklarda anüs etrafında hafif bir kızarıklık olduğu tespit edildi.

Hastalıklı semptomu gösteren Gökkuşluğu balıklarının nekropsisinde karaciğerin solgun olduğu ve bazen üzerinde nadiren peteşial kanamaların varlığı tespit edildi. Benzer şekilde pilorik sekalar üzerinde peteşial kanamalar tespit edildi. Bağırsakların şişkin, hemorajik ve

beyaz bir içerikle dolu olduğu belirlendi. Hava kesesi üzerinde yaygın kanamaların varlığı dikkat çekici bir bulgu olarak rastlandı. *L. garvieae*’nın gökkuşluğu alabalıklarında oluşturduğu hastalığın semptomları Şekil 2’de verildi.



Şekil 2. Lactococcosis’in semptomları A) Renkte kararırma, B) Karaciğerde solgun görünüm ve nokta şeklinde kanamalar, C) Hava kesesi üzerinde noktasal kanama ve bağırsakta yaygın kanama.

Figure 2. Symptoms of Lactococcosis A) Darkening in color, B) Pale and petechial hemorrhaging on the liver, C) The congestion in the gut and petechial hemorrhaging on the air bladder.

**Fiziksel ve Biyokimyasal Test Sonuçları:** Gökkuşluğu alabalıklarındaki ortaya çıkan kok enfeksiyonlarından elde edilen izolatlarla yapılan testlerde etkenin hareketsiz olduğu, mikroskobik bakıda bakterilerin Gram pozitif, yuvarlak (kok), ikili oval veya 6-7 koktan oluşan kısa zincirler tarzında görüldüğü belirlendi. Bu çalışmada elde edilen izolatlarla ait fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 6’de verilmiştir. *L. garvieae*’nın gökkuşluğu alabalıklarında oluşturduğu hastalığın semptomları Şekil 3’de verildi.

**API 20 strep test sonuçları:** *L. garvieae* referans suşu (ATCC 43921) ile yapılan API 20 strep test sonuçlarına ait verilerin görünümü Şekil 4’de verilmiştir. Hastalıklı gökkuşluğu alabalıklardan izole edilen *L. garvieae* izolatlarının API 20 strep test kitlerine inoküle edildikten 24 saat sonra ayıraç dökülmeden önceki görünüm Şekil 5’de, ayıraçlar döküldükten sonraki görünümü ise Şekil 6’de verildi. API 20 strep test kitine ait biyokimyasal verileri *L. garvieae* referans suşuna ait API 20 strep test kitinin biyokimyasal test sonuçları ile

karşılaştırılarak değerlendirildi. *L. garvieae* referans suşunun API 20 strep test kitinde; Voges Proskuer (VP), Hippurat hidroliz (HP), Eskulin hidroliz (ESC), Pirrolidonil arilamidaz (PYRA), lösin arilamidaz (LAP) ve Arjinin dihidrolaz (ADH) pozitif iken  $\alpha$  Galaktosidaz ( $\alpha$  GAL),  $\beta$  Glukuronidaz ( $\beta$  GUR)  $\beta$  Galaktosidaz ( $\beta$  GAL) Alkalın fosfataz (PAL) negatif reaksiyon verdiği belirlendi. Ayrıca aynı kitteki karbonhidrat testlerinden asit üretiminde; Riboz (RİB), Mannitol (MAN), Trehaloz (TRE) ve Amigdalin (AMD) pozitif reaksiyon iken, Arabinoz (ARA), Sorbitol (SOR), Laktoz (LAC), İnulin (INU), Rafinoz (RAF) ve Glikojen (GLYG) negatif reaksiyonlar verdiği tespit edildi. API 20 strep testi sonuçlarına göre çoğunun 7143115 profili gösterdiği espit edildi. İzolatlara yapılan API 20 strep test kitleri ile yapılan testlerin sonuçları Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 6.** *L. garvieae* izolatlarına ait geleneksel ve API 20 strep test sonuçları.

**Table 6.** Conventional and API 20 strep test results of *L. garvieae* isolates.

Fenotipik test sonuçları	Api 20 strep testi	
Şekil (kok=K)	K (66/66)	VP + (66/66)
Hareket	- (66/66)	HIP + (66/66)
Gram	+ (66/66)	ESC + (66/66)
Katalaz	- (66/66)	PYRA + (66/66)
Oksidaz	- (66/66)	$\alpha$ GAL - (66/66)
OF	F (66/66)	$\beta$ GUR - (66/66)
H <sub>2</sub> S	- (66/66)	$\beta$ GAL + (66/66)
İndol	- (66/66)	PAL - (64/66)
Lysin	- (66/66)	LAP - (66/66)
Ornitin	- (66/66)	ADH + (66/66)
Arjinin	+ (66/66)	RIB + (66/66)
Nitrat	- (66/66)	ARA - (66/66)
MR testi	+ (66/66)	MAN + (66/66)
VP testi	- (66/66)	SOR - (66/66)
SS testi	- (66/66)	LAC + (40/66)
Eskulin	+ (66/66)	TRE + (66/66)
%0 NaCl	+ (66/66)	INU - (66/66)
%6,5 NaCl	+ (66/66)	RAF - (39/66)
+10°C	+ (66/66)	AMD + (66/66)
+20°C	+ (66/66)	GLYG - (66/66)
+45°C	+ (66/66)	*Hemoliz $\alpha$ (66/66)

K: Kok, F: Fermantatif, MR: Metil Red, VP: Voges-Proskver, SS: Simon-Sitrat, HP: Hippurat hidroliz, ESC: Eskulin hidroliz, PYRA: Pirrolidonil arilamidaz,  $\alpha$ GAL:  $\alpha$  Galaktosidaz,  $\beta$ GUR:  $\beta$  Glukuronidaz,  $\beta$ GAL:  $\beta$  Galaktosidaz, PAL: Alkalın fosfataz, LAP: Lösin arilamidaz, ADH: Arjinin dihidrolaz, RİB: Riboz, ARA: Arabinoz, MAN: Mannitol, SOR: Sorbitol, LAC: Laktoz, TRE: Trehaloz, INU: İnulin, RAF: Rafinoz, AMD: Amigdalin ve GLYG: Glikojen. \*Hemoliz: %5 koyun kanı ile edilmiş standart agarda yapıldı.

K: Coc, F: Fermentative, MR: Methyl Red, VP: Voges-Proskauer, SS: Simon-Citrate, HP: Hippurate hydrolysis, ESC: Esculin hydrolysis, PYRA: Pyrrolidonyl arylamidase,  $\alpha$ GAL:  $\alpha$  Galactosidase,  $\beta$ GUR:  $\beta$  Glucuronidase,  $\beta$ GAL:  $\beta$  Galactosidase, PAL: Alkaline phosphatase, LAP: Leucine arylamidase, ADH: Arginine dihydrolyase, RIB: Ribose, ARA: Arabinose, MAN: Mannitol, SOR: Sorbitol, LAC: Lactose, TRE: Trehalose, INU: Inulin, RAF: Raffinose, AMD: Amygdalin and GLYG: Glycogen. \*Hemolysis: It was done on standard agar supplemented with 5% sheep blood.



**Şekil 3.** Gram boyanmış *L. garvieae* izolatının mikroskopik görünümü.  
**Figure 3.** Microscopic appearance of Gram-stained *L. garvieae* isolate.



**Şekil 4.** API 20 strep test kitindeki *L. garvieae* referans izolatının (ATCC43921) ayıraçlar dökülmeden önceki ve döküldükten sonraki biyokimyasal testlerin sonuçları.

**Figure 4.** Results of biochemical tests of the reference isolate (ATCC43921) of *L. garvieae* in the API 20 strep test kit before and after pouring the reagents.



**Şekil 5.** *L. garvieae* izolatları için API 20 strep testinde biyokimyasal test sonuçlarının ilk görünümü.

**Figure 5.** First view of biochemical test results in the API 20 strep test for *L. garvieae* isolates.

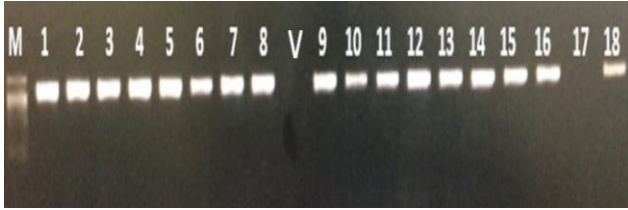


**Şekil 6.** *L. garvieae* izolatları için API 20 strep testinde ayıraçlar döküldükten 10 dakika sonra biyokimyasal test sonuçlarının görünümü.

**Figure 6.** Appearance of biochemical test results 10 minutes after pouring reagents in API 20 strep test for *L. garvieae* isolates.

VP: Voges Proskuer, HP: Hippurat hidroliz, ESC: Eskulin hidroliz, PYRA: Pirrolidonil arilamidaz,  $\alpha$ GAL:  $\alpha$  Galaktosidaz,  $\beta$ GUR:  $\beta$  Glukuronidaz,  $\beta$ GAL:  $\beta$  Galaktosidaz, PAL: Alkalın fosfataz, LAP: Lösin arilamidaz, ADH: Arjinin dihidrolaz, RİB: Riboz, ARA: Arabinoz, MAN: Mannitol, SOR: Sorbitol, LAC: Laktoz, TRE: Trehaloz, INU: İnulin, RAF: Rafinoz, AMD: Amigdalin ve GLYG: Glikojen.

**PCR test Sonuçları:** Klasik yöntemle identifiye edilen 100 izolatın 65 izolatın *L. garvieae* olduğu düşünülerek bu izolatlara API 20 strep testi yapıldı. Test sonuçları API web sisteminde *L. garvieae* olmadığı ve farklı *Lactococcus* spp., türlerine değişik oranda benzerlik göstermesinden dolayı izolatlardan tanımlanması fenotipik olarak doğru bir şekilde yapılamadığı tespit edildi. Bu yüzden izole edilen bakterilerden elde edilen genomik DNA'ları pLG-1 ve pLG-2 primerleri kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi PZR ile çoğaltıldı. Pozitif kontrol olarak referans suşu (ATCC 43921) kullanıldı. *L. garvieae* referans suşunun (ATCC 43921) 1100 bp büyüklüğünde PZR ürünü verdiği görüldü. Negatif kontrol olarak *V. anguillarum* kullanıldı. Bu çalışmada sonuçta toplam 65 adet izolatın genetik olarak *L. garvieae* olduğu teyit edildi. *L. garvieae* izolatlara ait PZR görüntüleri Şekil 7'de gösterildi.

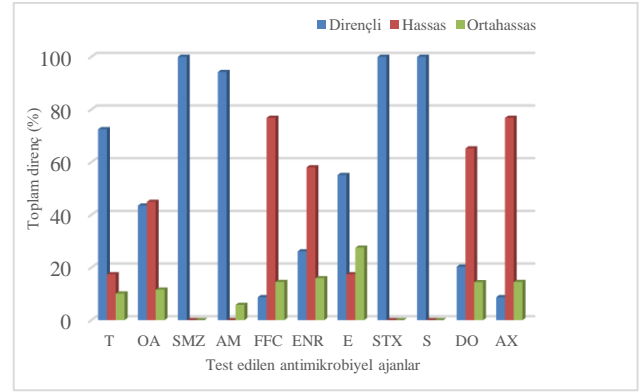


**Şekil 7.** *L. garvieae* izolatlara ait PZR ürünlerin agaroz jel görünümü.

**Figure 7.** Agarose gel appearance of PCR products of *L. garvieae* isolates.

M; Marker (100-1500 bp), 1: *L. garvieae* (ATCC 43921); V: *V. anguillarum*, 17. Negatif kontrol (saf su), 2-8, 9-16, 18, *L. garvieae* saha izolatlari

**Antibiogram test sonuçları:** Çalışmada kullanılan izolatlara yapılan antibiyogram testinde tespit edilen sonuçlarına göre izolatların sulfamethoksazol, streptomisin ve sulfametoksazol+trimetoprime %100, ampisiline %94,2, oksitetrasiklin %72,5 oranlarında yüksek düzeyde dirençli olduğu, diğer antibiyotiklere karşı sırasıyla; eritromisine %55,07, oksolinik asit %43,5, enrofloksasin %26,09, doksisisikline %20,3, amoksiklin ve florfenikol %8,7 düzeyinde direnç gösterdiği tespit edildi. *L. garvieae* izolatlara karşı amoksisilin ve florfenikolün %91,3, doksikline %79,7 oranında etkili olduğu belirlendi. Antibiyotiklere karşı *L. garvieae* izolatlarının belirlenen hassasiyet ve direnç yüzdelik profilleri Şekil 8'de verildi.



**Şekil 8.** *L. garvieae* izolatlarının farklı antibiyotiklere gösterdiği direnç profilleri.

**Figure 8.** Resistance profiles of *L. garvieae* isolates to different antibiotics.

### Tetrasiklin Direnç Genlerinin Tespiti:

Çalışmada tetrasiklin direnç genleri taramasında moleküler düzeyde 65 adet *L. garvieae* izolatından 13 izolatta *tetA*, 8 izolatta *tetB*, 11 izolatta *tetC*, 15 izolatta *tetD* ve 25 izolatın *tetE* direnç genine rastlanıldığı tespit edildi. Antibiyogram test sonuçlarına göre tetrasiklinlere %72,5 direnç tespit edilen izolatlardan 16, 22 ve 23 sıra nolu izolatlarda *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* ve *tetE* moleküler düzeyde direnç genlerinde hiçbirine rastlanılmadığı belirlendi.

### SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçlarına göre hastalıklı gökkuşuğu alabalıklardan izole edilen 65 izolatların ve 1 adet referans suşun (ATCC 43921) biyokimyasal olarak yapılan API 20 strep testi sonuçlarına göre çoğu 7143115 profili göstermiştir. Aynı izolatların *L. garvieae* ait 1100 bp büyüklüğünde olan pLG-1 ve pLG-2 oligonukleotid primerleri ile genetik olarak yapılan PZR test sonuçlarına göre *L. garvieae* olduğu doğrulanmıştır. Bu izolatların antimikrobiyel ajanlara duyarlılığını belirlemek için agar disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre 3 farklı antimikrobiyel ajana %100 dirençli olduğu belirlenmiştir. Antibiyograma duyarlılık test sonuçlarına göre izolatların %72,5 oranında oksitetrasiklin ve %20,3 doksisisikline dirençli olması nedeni ile yapılan moleküler düzeyde tetrasiklinlere dirençli genlerin varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada moleküler düzeyde 65 izolatın 13 izolatın *tetA*, 8 izolatın *tetB*, 11 izolatın *tetC*, 15 izolatın *tetD* ve 25 izolatın *tetE* direnç genine rastlanıldığı tespit edilmiştir. Antibiyogram testinde tetrasiklinlere % 72,5 direnç tespit edilen izolatlardan 16, 22 ve 23 sıra nolu izolatlarda *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* ve *tetE* direnç genlerinde hiçbirine rastlanılmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, *tetG*, *tetM*, *tetO*, *tetQ* ve *tetW* gibi primerler kullanılarak tetrasikline direnç genlerinin varlığının da genetik olarak çalışılması gerektiği düşünülmüştür.



Tetrasiklin direnci, sucul ortamda antibiyotik direnç genlerinin tespitine yönelik çalışmalarda sıklıkla belirleyici olduğu bildirilmiştir. Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki mevcut nehirlerden izole edilen Enterobacteriaceae familyasına ait bakterileri izolatlarının tetrasiklin direnç genlerinin (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* ve *tetE*) varlığını tespit ettikleri bir çalışmada 52 tetrasiklin dirençli bakteri izolatından 8'inde *tetA*, 10'unda *tetB* ve 1'inde ise her iki direnç genine rastlanılmasına karşın *tetC*, *tetD* ve *tetE* direnç genlerine ise hiç rastlanılmadığı bildirilmiştir (Sandallı vd., 2010). Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki gökkuşağı alabalık çiftliklerindeki hastalıklı balıklardan izole edilen oksitetrasikline dirençli *Yersinia ruckeri* izolatlarında 16 izolatın *tetA*, 2 izolatın *tetB*, 3 izolatın ise hem *tetA* hem de *tetB* direnç genine varlığına sahip olduğu ve nehir sularının insan sağlığını risk altında tutan antibiyotik direnç genleri için bir rezervuar olabileceğini bildirmiştir (Balta vd., 2010). Ülkemizde 29 adet *L. garvieae* izolatına ait genomik DNA'sında moleküler düzeyde 12 farklı primer kullanılarak yapılan bir çalışmada; tetrasikline (*tetB*, *tetS*), eritromisine (*ereA*, *ereB*), sulfonamide (*sull*, *sullI*), β-laktam (*ampC*, *blaTEM*, *blaPSE*), trimetoprim (*dhfr1*), aminoglikoside (*aadA*), ve florfenikol (*floR*) en yüksek düzeyde 19 izolatın *ereB*, 20 izolatın *tetB* ve 2 izolatın *tetS*, 3 izolatın *sull* ve 13 izolatın *sullI*, 12 izolatın *blaTEM* ve 14 izolatın *floR* moleküler düzeyde direnç genlerinin varlığı rapor edilmiştir (Türe ve Boran, 2015). Başka bir çalışmada ise 25 adet *L. garvieae*'nin saha izolatları arasında moleküler düzeyde bir izolatın *sull* direnç genine, altı izolatın (%24) *sullI* direnç genine ve bir izolatın *tetD* direnç genine sahip olduğu bildirilmiştir. Fakat aynı çalışmada izolatların hiç birinde moleküler düzeyde; *ermB*, *ermF*, *floR*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE* *tetG* ve *dhfr1* direnç genlerinin varlığına rastlanılmadığı bildirilmiştir (Hancı & Onuk, 2018).

*L. garvieae* su sıcaklığının 18°C'nin üzerine çıktığı yaz mevsiminde gerek tatlı su gerek deniz balıklarında septisemiye neden olduğu, gökkuşağı alabalıklarında %50'den daha fazla ölüm meydana getirdiği ve önemli ekonomik kayıplara neden olan önemli bir bakteriyel hastalık olduğu rapor edilmiştir (Austin & Austin, 2012). Etkilenen balıklarda gözlenen dış bulgular arasında tek ya da çift taraflı ekzoftalmi, gözde periorbital ve intraoküler bölgede, yüzgeçlerin tabanda, perianal bölgede hemorajiler, abdominal kısımda şişkinlik ve anal prolapsusun varlığı bildirilmiştir (Altun vd., 2004; Kav ve Erganiş, 2007; Durmaz & Kılıçoğlu, 2015; Balta & Dengiz Balta, 2019). Nekropside peritoneal asidik sıvı birikimi, karaciğer, dalak ve böbrek dahil iç organlarda hemoraji, dalak ve karaciğerde fokal nekroz ile barsakta kanlı sıvı birikimi gözlenir (Altun vd., 2004; Kav & Erganiş, 2007; Durmaz & Kılıçoğlu, 2015; Balta & Dengiz Balta, 2019). *L. garvieae*'nin Doğu Karadeniz Bölgesindeki farklı

gökkuşağı alabalığı işletmelerinde gözlenen hastalık çıkışlarından sorumlu olup olmadıklarının araştırıldığı bu çalışmada su sıcaklığını 18°C olduğu Haziran-Temmuz aylarında başlayıp su sıcaklığının 15°C'nin altına düştüğü Ekim ayında enfeksiyonun hızla bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Farklı işletmelerden yapılan örnekleme çalışmalarında hastalıktan etkilenen balıklarda genel olarak iştahsızlık, durgunluk, renkte kararma, gözlerde bilateral ekzoftalmusi, hemoraji ve opaklaşma, vücutta abdominal şişkinlik ve anal bölgede prolapsus ile solungaçların ise solgun olduğu tespit edilmiştir. Nekropside, vücut kası ile hava kesesinde yaygın hemorajiler, dalağın renginde koyulaşma, splenomegaly, barsağın boyu boyunca kızarıklık olduğu ve sarımsı renkli kanlı bir sıvı birikimi gözlenmiştir. Hasta balıklarda gözlenen bu bulgular, diğer araştırmacılar (Altun vd., 2004; Kav & Erganiş, 2007; Durmaz & Kılıçoğlu, 2015) tarafından *L. garvieae* ile enfekte gökkuşağı alabalıklarından bildirilen bulgulara benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

*L. garvieae* fakültatif anaerobik, hareketsiz, spor oluşturmayan, Gram-pozitif kok şeklindeki bir bakteridir. Mikroskopik görünümde hücreler, çiftler ve kısa zincirler şeklinde bulunmaktadır. *L. garvieae* kanlı agarda α-hemoliz oluştururken, sitokrom oksidaz ve katalaz negatiftir (Kav & Erganiş, 2007; Austin & Austin, 2012). Altun vd. (2004) gökkuşağı alabalıklarından izole edilen sekiz *L. garvieae* izolatının sitokrom oksidaz ve katalaz negatif, VP pozitif olduğunu, 4°C ile 45°C de gelişme gösterdiklerini, glikoz, fruktoz, galaktoz, mannitol ve sakkarozu fermente ettiklerini bildirmiştir. izolatlar α-hemolitik olup MacConkey agarda koloni oluşturmuştur. Söz konusu izolatlar nişasta ve jelatini hidrolize edemezken, %6.5 NaCl'de gelişme göstermiştir. Kav ve Erganiş (2007) çalışmalarında 30 adet *L. garvieae* izolatının glikoz, galaktoz, mannitol, sakkaroz, fruktoz ve arabinoz'dan asit üretimlerinin pozitif olduğunu ancak sorbitol ile ksilozdan asit üretimlerinin ise negatif olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada *L. garvieae* izolatının Gram-pozitif, fermentatif, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif, VP testin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan izolatların hemoliz testi, 45°C ve % 6,5 NaCl de üreme testi, glikoz, galaktoz, mannitol ve sakkaroz fermentasyon testlerinin pozitif olması diğer çalışmalarının sonuçları ile benzerlik göstermiştir (Anshary vd., 2014, Altun vd., 2004; Kav & Erganiş, 2007). Bu çalışmada izolatların sorbitol ve ksilozdan asit üretimlerinin pozitif olup Kav ve Erganiş (2007) ise çalıştıkları *L. garvieae* izolatlarının sorbitol ve ksilozdan asit üretimlerinin negatif olduğunu bildirmiştir.

İzolatların API 20 strep test sonuçları API web sisteminde *L. garvieae*'nin özelliklerine ait bir veri bulunmadığından için sisteme girilen izolatların 7143115



kod profili *L. lactis* subsp. *lactis* % 57,9, *Enterococcus faecalis* %24,1, *E. durans* %14,5 ve *E. faecium* %3,3 türlerinin biyokimyasal testlerinin benzerliğinden dolayı bu etkenleri birbirinden kesin olarak ayırt edilemediği ve yanlış identifikasyona neden olunabildiği belirlenmiştir. Bu neden yanlış identifikasyonu önlemek için *L. garvieae*'nin referans suşun (ATCC 43921) ile hem API 20 strep testi yapılarak test sonuçları değerlendirildiği gibi moleküler çalışmada aynı referans suşun genomik DNA'sı çıkartılarak PZR'da pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kav ve Erganiş (2007), 30 *L. garvieae* izolatının API 20 strep testinin 24 saatlik test sonuçlarına göre %90 oranında *L. lactis* subsp. *lactis* ve %6.6 oranında da *E. faecalis*'e benzerlik gösterdiğini bildirilmiştir. Bu çalışmamızda 65 izolatın API 20 strep test sonuçlarının, Kav ve Erganiş (2007) tarafından elde edilen sonuçlara benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Biyokimyasal özelliklerdeki farklar, bir organizmanın fizyolojik profili üzerine önemli bir bilgi vermesine karşın, fenotipik özellikler ile tek başına tür seviyesinde yeterli tanımlama yapılamamaktadır.

Moleküler teknikler ile patojenik türleri tanımlama ve tür ile izolatlar arasındaki farkı ayırt edebilmek mümkün olduğu rapor edilmiştir (Vale vd., 2000). *L. garvieae* izolatları arasındaki genetik çeşitliliği belirlemek için RAPD (Rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA) tekniğini kullanılarak yapılan bir çalışmada, izolatların 1100 bp'lik spesifik amplifikasyon ürününü verdiği bildirilmiştir (Ravelo vd., 2003). Bu çalışmadaki 68 *L. garvieae* izolatının identifikasyonu için uygulanan PZR tekniği sonuçlarına göre izolatların 1100 bp'lik amplifikasyon ürününü verdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların Ravelo vd. (2003) ve Zlotkin vd. (1998) tarafından bildirilen sonuçlar ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Aynı bölgedeki gökkuşağı alabalık çiftliklerinden ekzozofthalmus semptomu gösteren balıkların gözlerinden yapılan ekim sonucunda izole edilen *L. garvieae* izolatlarının antibiyogram test sonuçları ile birebir örtüştüğü tespit edilmiştir (Balta & Dengiz Balta, 2019). Kav ve Erganiş (2007) çalışmalarında *L. garvieae* izolatlarının ampisilin, oksitetrasiklin ve eritromisine hassas olduklarını, Durmaz ve Kılıçoğlu (2015), ise izole ettikleri *L. garvieae* izolatlarının ampisilin, eritromisine hassas, trimetoprim'e ise dirençli olduklarını bildirmiştir. Türe ve Boran (2015), ampisilinin *L. garvieae* izolatlarına karşı en etkili ajanlardan birisi olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada ise izolatların eritromisine %45 oranında duyarlı olması ile Kav ve Erganiş (2007), Durmaz ve Kılıçoğlu (2015) ve Türe ve Boran (2015)'in sonuçlarına benzerlik göstermesine karşın, bu araştırmacılar farklı olarak izolatların oksitetrasikline %72,5 oranında dirençli olması ve ampisiline karşı ise izolatların %100 dirençli olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmanın bulgularına göre, hastalıklı gökkuşağı alabalıklarından izole edilen bakteriyel etkenlerin gerek fenotipik tanı test sonuçlarına ve gerekse moleküler PZR teknikleri kullanılarak yapılan çalışmanın sonuçlarına göre *L. garvieae* olarak izole ve identifiye edilmiştir. Gökkuşağı alabalık işletmelerindeki suyun sıcaklığı 18°C'nin üzerine ulaştığı yaz mevsiminde örnekleme çalışması yapılan bölgede görülen hastalık vakalarından sorumlu başlıca etken *L. garvieae*'nin olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre izolatların en az üç antimikrobiyal ajana %100 dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu durum, işletme şartlarında yanlış doz ve sürede kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı bakterilerde artan direnç ile açıklanması mümkündür. Farklı çalışmalarda bakterideki direnç gelişimi artmakla olduğu ve bu direnç gelişiminin ortamda bulunan diğer bakteri türlerine de değişik yollarla aktarılabilirliğini düşündürmektedir. Antibiyogram duyarlılık testi sonuçları hastalığa karşı mevcut aşuların kullanılması ve yeni aşı çalışmalarının geliştirmesi gerektiğini düşünülmektedir.

Gökkuşağı alabalık çiftliklerinde yaz aylarında ortaya çıkan kok enfeksiyonlarında kitleler halinde ölümlere neden olmaktadır. Gökkuşağı alabalık çiftliklerinde gerçekleşen toplu ölümler nedeni ile ortaya çıkan büyük ekonomik kayıpların varlığı akuakültürdeki sürdürülebilir üretimi kısıtlamaktadır. Bu bağlamda hastalığın erken teşhis ve tedaviye erken başlanması sürdürülebilir bir üretim için şarttır. Bunun için yaz aylarında üretici ve/veya su ürünleri mühendisleri su sıcaklığının yanı sıra çevresel şartlardaki değişimleri ve suyun pH değerlerini mutlaka takip etmelidir. Balıklarda görülen sporadik ölümler dikkate alınmalı ve en yakın balık hastalıkları laboratuvarına gönderilip muayenesi yapıldıktan sonra ekimler yapılarak hastalığın etkeni tespit edilmelidir. Balıklardaki az miktarda görülen ölümler dikkate alınmayıp geç kalındığı vakalarda su sıcaklığının yüksek olması ve sudaki oksijen bağlama kapasitesinin düşük olması balıklarda oluşan iştah kaybına bağlı olarak ölüm oranları şiddetli bir şekilde artırmaktadır. Hastalık etkeninin 24 saat içinde TSA ve BHIA gibi besi yerlerinde uygun sıcaklıkta üremesi ve antibiyogram testlerinin yapılarak uygun kemoterapotik maddelerin zamanında ve uygun dozda verilmesi tedavi başarısını artırmaktadır. Bu amaçla bölgemizdeki alabalık çiftliklerinde yapılan arazi çalışmaları ile bütün çiftliklerin kontamine olduğu tespit edilmiştir. Yapılan antibiyogram hassasiyet test sonuçlarına göre amoksiklin, florfenikol ve doksiklin gibi antibiyotiklerden birinin uygun doz ve sürede kullanılması başarılı sonuçların alındığı gözlenmiştir. Ayrıca antibiyotiklerle birlikte polivitaminler veya su sıcaklığına bağlı stresi azaltmak için özellikle vitamin C kullanımının faydalı olduğu düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Hazırlanan bu Yüksek Lisans Tezi; Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklen 2014.103.02.3 nolu projeden üretilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Akşit, D. & Kum, C., 2008. Gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg.*, **19**(1), 1-7.
- Altun, S., Diler, O. & Adiloğlu, A.K. (2004). Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16S rDNA sequencing. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **24**, 119-125.
- Anshary, H., Kurniawan, R.A., Sriwulan, S., Ramli, R. & Baxa, D.V. (2014). 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*, **3**:627, 1-11. DOI: 10.1186/2193-1801-3-627
- Austin, B. & Austin, D.A. (2012). *Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish*. 5th ed., 17-118, Springer Science, Dordrech.
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2019). The isolation of *Lactococcus garvieae* from eyes of diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exophthalmia. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, **4**(1), 27-33. DOI: 10.35229/jaes.527258
- Balta, F., Sandalli, C., Kayis, S. & Ozgumus, O.B., 2010. Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **30**(6), 211-219.
- Chang, P.H., Lin, C.W. & Lee, C. (2002). *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *O. mykiss* in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **25**(5), 319-327.
- Chen, S.C., Lin, Y.D., Liaw, L.L. & Wang, P.C. (2001). *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16SrDNA sequencing. *Dis. Aquat. Org.*, **45**, 45-52. DOI: 10.3354/dao045045
- Collins, M.D., Farrow, J.A., Phillips, B.A. & Kandler, O. (1983). *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *J Gen Microbiol*, **129**, 3427-3431. DOI: 10.1099/00221287-129-11-3427
- Çağırğan, H. & Tanrıku, T.T. (1997). A *Lactococcus* in a trout farm. *Mediterranean Fisheries Congress*, 9-11 April, Izmir, Turkey, 40p.
- Çağırğan, H. (2004). Biotyping of *Lactococcus garvieae* isolated from Turkey. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, **21**(3-4), 267-269.
- Diler, Ö., Altun, S., Adiloğlu, A.K., Kubilay, A. & Işıklı, B.I. (2002). First occurrence of streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **22**, 21-26.
- Durmaz, Y. & Kılıçoğlu, Y. (2015). Bir alabalık çiftliğinde doğal enfekte gökkuşuğu alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) *Lactococcus garvieae*'nin kültür ve PCR ile saptanması ve etkenin antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, **10**(2), 109-115. DOI: 10.17094/avbd.58682
- Eldar, A. & Ghittino, C. (1999). *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Similar, but different diseases. *Diseases of Aquatic Organisms*, **36**, 227-231. DOI: 10.3354/dao036227
- Hancı, İ. & Onuk E.E. (2018). *Lactococcus garvieae* izolatlarının antimikrobiyal direnç profillerinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi. *Etilik Vet Mikrobiyol Derg*, **29**(2), 94-103.
- James, P.R., Hardman, S.M.C. & Patterson, D.L.H. (2000). Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae*: A first case report. *Postgrad Med. J.*, **76**, 301-303. DOI: 10.1136/pmj.76.895.301
- Kav, K. & Erganiş, O. (2007). Konya bölgesinde bulunan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. *Vet. Bil. Derg.*, **23**(1), 7-17.
- Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G. & Diler, Ö. (2005). The determination of antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus garvieae* strains. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, **1**, 39-48.
- Kusuda, K., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. & Fryer, J.L. (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **41**(3), 406-409. DOI: 10.1099/00207713-41-3-406
- Kusuda, R. & Salati, F. (1999). *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. In (eds. Woo PTK, Bruno, D.W.) *Fish Diseases and Disorders*, Vol: 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing, 303-317pp.
- Mofredj, A., Baraka, D., Kloeti, G. & Dumont, J.L. (2000). *Lactococcus garvieae* septicemia with liver abscess in an immuno-suppressed patient. *Am. J. Med.*, **109**(6), 513-514. DOI: 10.1016/S0002-9343(00)00534-9
- Muzquiz, J.L., Royo, F.M., Otega, C., Blas, I., Ruiz, I. & Allonso, J.L. (1999). Pathogenicity of

- Streptococcosis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) dependence on age of diseased fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **19**(3), 114-119.
- Öztürk, T., Didinen, B.I., Doğan, G., Özer, A. & Bircan, R. (2013).** Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in the middle Black Sea Region in Turkey and antimicrobial susceptibility of the aetiological agent, *Lactococcus garvieae*. *Etlik Vet. Mikrobiyol Derg.*, **24**, 7-12.
- Ravelo, C., Magariños, B., López-Romalde, S. & Toranzo, A.E. (2003).** Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 751-756. DOI: [10.1128/JCM.41.2.751-756.2003](https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.751-756.2003)
- Sandallı, C., Özgümüş, O.B. & 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.
- Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, P., Riaza, A., Nunez, S. & Barja, J.L. (1994).** *Streptococcosis* in cultured turbot caused by an *Enterococcus*-like Bacterium. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **14**, 19-23.
- Türe, M. & Boran, H. (2015).** Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Lactococcus* sp. strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, **59**, 37-42.
- Türe, M., Işıdan, H., Savaş, H. & Kutlu, İ. (2012).** PFGE metodu kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin genetik çeşitliliğinin ve yayılımının belirlenmesi. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü-Trabzon (TAGEM/HS/10/09/02/179) proje sonuç raporu, 61s.
- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M., Liebana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A., Dominguez, L. & Fernandez-Garayzabal, J.F. (2000).** Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from Lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. *J. Clin. Microbiol.*, **38**(10), 3791-3795. DOI: [10.1128/JCM.38.10.3791-3795.2000](https://doi.org/10.1128/JCM.38.10.3791-3795.2000)
- Wang, C.Y., Shie, H.S., Chen, S.C., Huang, J.P., Hsieh, I.C., Wen, M.S., Lin, F.C. & Wu, D. (2007).** *Lactococcus garvieae* infections in humans: Possible association with aquaculture outbreaks. *Int. J. Clin. Pract.*, **61**, 68-73. DOI: [10.1111/j.1742-1241.2006.00855.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2006.00855.x)
- Yiu, K., Siu, C., To, K., Jim, M., Lee, K., Lau, C. & Tse, H. (2007).** A rare cause of infective endocarditis; *Lactococcus garvieae*. *Int. J. Cardiol.*, **114**, 286-287. DOI: [10.1016/j.ijcard.2005.11.092](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.11.092)
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. & Bercovier, H., (1998).** Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 983-985. DOI: [10.1128/JCM.36.4.983-985.1998](https://doi.org/10.1128/JCM.36.4.983-985.1998)