

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

EŞEN ÇAYI KÜLTÜR GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN
(*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) *Lactococcus garvieae*
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE ANTİBAKTERİYEL
DUYARLILIĞININ TESPİTİ

Sabahat Selmin ÇETİNKAYA

Danışman
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

II. Danışman
Araş. Gör. Dr. Mesut YILMAZ

ISPARTA – 2019




© 2019 [Sabahat Selmin ÇETİNKAYA]

TEZ ONAYI

**EŞEN ÇAYI KÜLTÜR GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN
(*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) *Lactococcus garvieae*
İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE ANTİBAKTERİYEL
DUYARLILIĞININ TESPİTİ**

Sabahat Selmin ÇETİNKAYA tarafından hazırlanan bu tez çalıŐması aŐaĐıdaki jüri tarafından Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. AyŐegöl KUBİLAY
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

İmza

.....
.....

II. Danışman Araş. Gör. Dr. Mesut YILMAZ
Akdeniz Üniversitesi


.....

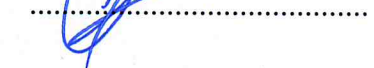
Üye Doç. Dr. Tülin ARSLAN
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi


.....

Üye Doç. Dr. Seyhan ULUSOY
Süleyman Demirel Üniversitesi


.....

Üye Doç. Dr. Seçil METİN
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi


.....

Yukarıdaki Jüri kararı Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/..../.... tarih ve...../..... sayılı kararıyla onaylanmıŐtır.

Prof. Dr. Yusuf UÇAR
Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

22/11/2019

Sabahat Selmin ÇETİNKAYA



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Laktokokkozis	4
2.1.1. <i>Lactococcus garvieae</i> 'nin izolasyonu ve identifikasyonu	4
2.1.1.1. <i>Lactococcus garvieae</i> 'nin izolasyonu	4
2.1.1.2. İdentifikasyon.....	4
2.1.2. Tedavi.....	5
2.1.3. Koruma ve kontrol	6
2.2. Antibiyotik Kullanımı	7
2.2.1. Antibiyotik grupları.....	8
2.2.2. Antibiyotik kullanımının olumsuz etkileri	9
2.2.3. Antibakteriyel tedavide başarısızlık nedenleri	10
2.2.4. Antibiyotiklere direnç	11
2.2.4.1. Doğal (yapısal) direnç	11
2.2.4.2. Kazanılmış direnç.....	11
2.3. <i>L. garvieae</i> İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antimikrobiyal Duyarlılığının Tespiti ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. <i>L. garvieae</i> İzolasyonu	16
3.2. <i>L. garvieae</i> 'nın Geleneksel Yöntemlerle İdentifikasyonu	18
3.3. <i>L. garvieae</i> 'nın Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu	18
3.3.1. DNA izolasyonu.....	18
3.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	18
3.3.3. Dizi analizi	20
3.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	20
4. BULGULAR	22
4.1. <i>L. garvieae</i> Suşları	22
4.2. <i>L. garvieae</i> Suşlarının Fenotipik Özellikleri	22
4.3. <i>L. garvieae</i> Suşlarının Moleküler Yöntemle Karakterizasyonu.....	23
4.3.1. DNA izolatları ve PCR ürünlerinin moleküler karakterizasyonu	23
4.3.2. PCR ürünlerinin dizi analizi.....	24
4.3.3. Bakterilerin moleküler tanılamaları	26
4.4. <i>L. garvieae</i> Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	47

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EŞEN ÇAYI KÜLTÜR GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) *Lactococcus garvieae* İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE ANTİBAKTERİYEL DUYARLILIĞININ TESPİTİ

Sabahat Selmin ÇETİNKAYA

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

II. Danışman: Araş. Gör. Dr. Mesut YILMAZ

Lactococcus garvieae, farklı coğrafik bölgelerde tatlı ve deniz balığı türlerinde yaygın olarak bildirilen en önemli patojen türlerinden biridir. Bu çalışma da; Eşen çayında faaliyet gösteren gökkuşağı alabalığı işletmelerinden *Lactococcus garvieae* balık patojeni izole edilmesi, fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak identifiye edilmesi ve antibakteriyel duyarlılıklarının ticari antibiyotik diskleri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Eşen Çayı bölgesindeki 3 ayrı işletmeden izole edilen 16 suş geleneksel mikrobiyolojik, API 20 STREP testleri ve moleküler yöntemlerle identifiye edilmiştir. Suşlarının antibakteriyel duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla Muller Hinton Agar üzerinde toplam 32 farklı antibiyotik diski kullanılmıştır. Suşların; ampisilin, trimetoprim / sülfometoksazol, eritromisin, lincomisin, enrofloksasin, gentamisin, oksolinik asit, siprofloksasin, kanamisin, kolistin, ofloksasin, streptomisin, klindamisin, oksitetrasiklin, sefoperazon, flumekuin, tilosin, seftriakson, spektinomisin, norfloksasin, sefalotin, oksasilin, apramisine karşı dirençli, vankomisin, tetrasiklin, nitrofurantoin, kloramfenikol, doksisisiklin, penisilin, efuroksim, pristinamisin, amoksilin'e duyarlı olduğu görülmüştür. Antibiyotik grupları arasında örneğin; sülfanomidlere, makrolitlere, aminoglikozidlere %100 dirençli, kinolonlardan nitrofurantoin dışındaki antibiyotiklere dirençli, β -lactam grubundan; penisilin, sefuroksim, amoksilin dışındaki antibiyotiklere dirençli, tetrasiklinlerden; oksitetrasikline dirençli, diğer grubundan kolistine dirençli bulunurken amfenikollere karşı tüm suşlar duyarlı bulunmuştur. Çalışma sonuçları gökkuşağı alabalığı işletmelerinde, bakteriyel patojenlerin ve antimikrobiyal direncin yayılımını önlemek için biyogüvenlik önlemlerin alınması gerektiğini, mikrobiyolojik izlemelerin yapılmasının son derece önemli olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca su ürünleri yetiştiriciliğinde balık hastalıklarına karşı antibiyogram sonuçlarına göre tedaviye başlanması gerektiğini ve antibiyotiklerin kontrollü kullanımının önemini bir kez daha vurgulamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Lactococcus garvieae*, Fenotipik özellikler, Moleküler identifikasyon, PCR, Antibakteriyel duyarlılık

2019, 47 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

***Lactococcus garvieae* ISOLATION, IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF ANTIBACTERIAL SENSITIVITY FROM CULTURED RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) IN EŞEN STREAM**

Sabahat Selmin ÇETİNKAYA

**Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Aquaculture**

Supervisor: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Co-Supervisor: Res. Ass. Dr. Mesut YILMAZ

Lactococcus garvieae is one of the most important pathogen species commonly reported in freshwater and marine fish species from different geographical regions. In this study; *Lactococcus garvieae* fish pathogens were isolated from rainbow trouts in farms which located on Eşen Stream. They were identified by using phenotypic and genotypic methods and determined their antibacterial susceptibility using commercial antibiotic discs. For this purpose; the total 16 strains were isolated from 3 farms and identified by using conventional microbiological methods, API 20 STREP tests and molecular methods. To obtain the antibacterial susceptibility of the strains in total 32 antibiotic discs were used on the Muller Hilton Agar. The strains showed resistance against ampicillin, trimethoprim/sulfomethoxazole, erythromycin, lincomycin, enrofloxacin, gentamicin, oxolinic acid, ciprofloxacin, kanamycin, colistin, ofloxacin, streptomycin, clindamycin, oxytetracycline, cefoperazone, flumecuin, tylosin, ceftriaxone, spectinomycin, cefoperazone, norfloxacin, cephalothin, oxacillin and apramycin, but sensitive to vancomycin, tetracycline, nitrofurantoin, chloramphenicol, doxycycline, penicillin, efuroxime, pristinamycin, amoxicillin. Among the antibiotic groups such as sulfanomides, macrolides, aminoglycosides were showed 100% resistance, in quinolone groups other than nitrofurantoin displayed resistant, in β -lactam group antibiotics obtained as resistance except penicillin, cefuroxime, amoxicillin, also in tetracycline groups; oxytetracycline showed resistance and in other groups; while colistin was presented resistance, amphenicols was showed sensitivity on the all strains. The results of the study revealed that the biosecurity measurements should be taken to prevent the spread of bacterial pathogens and antimicrobial resistance and also microbiological monitoring is very important issues in rainbow trout farms. Also this study emphasized that the antibiogram tests should be applied onto isolated fish pathogens before the treatment and the importance of using of antibiotics under control one more time.

Key Words: *Lactococcus garvieae*, Phenotypic characterisation, Molecular identification, PCR, Antibacterial susceptibility

2019, 47 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, bilgi ve tecrübeleri ile bana yardımlarını esirgemeyen değerli Danışman Hocalarım Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a, Araş. Gör. Dr. Mesut YILMAZ'a proje kapsamında birlikte çalışma fırsatı bulduğumuz, suşları elde etmemde katkı sağlayan Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü'nden değerli hocam Doç. Dr. Tülin ARSLAN'a ve laboratuvar çalışmalarında her zaman yardımlarını ve destekleriyle yanımda olan Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü'nden Doç. Dr. Seçil METİN'e ve Araş. Gör. Dr. Öznur GÖRMEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını FBA-2018-3797 nolu araştırma projesi ile destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmamda hep yanımda olup beni destekleyen kıymetli eşime sevgi ve saygılarımı sunarım.

Sabahat Selmin ÇETİNKAYA
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Balık yetiştiriciliğinde kullanılan antibakteriyel ilaç grupları	9
Şekil 3.1. Eşen Çayı Havzasının konumu	16
Şekil 4.1. <i>L. garvieae</i> suşlarına ait DNA izolatlarının agaroz jel görüntüsü	23
Şekil 4.2. 16S rDNA dizisine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	24
Şekil 4.3. 16S rDNA dizisine ait bir kromatogram örneği	25
Şekil 4.4. BLASTN eşleşme sonucu	26
Şekil 4.5. <i>L. garvieae</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri	29
Şekil 4.6. <i>L. garvieae</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri	29
Şekil 4.7. <i>L. garvieae</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri	30
Şekil 4.8. Kullanılan antibiyotiklerin sınıflandırılması	31
Şekil 4.9. Antibiyotik gruplarının direnç yüzdeleri	32



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Bakteriyostatik ve bakterisit antibiyotikler	7
Çizelge 2.2. Sahada sıklıkla kullanılan antibiyotik grupları	8
Çizelge 3.1. Çalışma sırasında kullanılan katı ve sıvı besiyeri solüsyonlarının konsantrasyonları	17
Çizelge 3.2. 16S rDNA dizisinin çoğaltımı için uygulanacak PCR protokolü	19
Çizelge 4.1. <i>L. garvieae</i> suşlarının (LG-1-LG16) fenotipik özellikleri	22
Çizelge 4.2. <i>L. garvieae</i> 'nin tanımlanması için API 20 STREP sonuçları.....	23
Çizelge 4.3. <i>L. garvieae</i> suşlarının disk diffüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları.....	27
Çizelge 4.4. Antibiyotik duyarlılık yüzdeleri.....	30
Çizelge 5.1. <i>L. garvieae</i> ile ilgili antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarının karşılaştırılması.....	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AM	Ampicillin
APR	Apramycin
AX	Amoxicillin
BHIA	Brain Heart InfüzyonAgar
C	Chloramphenicol
CEP	Cefoperazone
CIP	Ciprofloxacin
CN	Gentamicin,
CRO	Ceftriaxone
CT10	Colistin
CXM	Efuroxime
DA	Clindamycin
DO30	Doxycycline
E	Erythromycin
ENR	Enrofloxacin
F	Nitrofurantoin
FLM	Flumequine
gr	Gram
I	Orta derecede duyarlı
K	Kanamycin
KF	Cephalothin
L	Lincomycin
l	Litre
ml	Mililitre
MS222	Tricaine Methanesulfonate
NA	Nutrient Agar
NOR	Norfloxacin
OA	Oxolinic
OFX	Ofloxacin
OX	Oxacillin
P	Penicillin G 10 U
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PT	Pristinamycin
RR	Dirençli
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
S	Duyarlı
SPT	Spectinomycin
SXT	Trimethoprim/Sulphamethoxazole
T	Oxytetracycline
TE	Tetracycline
TSA	Triptik Soy Agar
TSB	Triptik Soy Broth
TY	Tylosin
VA	Vancomycin

1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği hızla gelişen bir sektördür. Bu hızlı büyüme ile birlikte çevresel etkileşim sonucu viral, bakteriyel, paraziter ve fungal hastalıklarda artış ortaya çıkmıştır. Kültür balıkçılığı yapılan işletmelerde en önemli problemlerin başında infeksiyöz hastalıklar ile bunların yol açtığı sağlık sorunları ve ekonomik zararlar yer almaktadır. Koruyucu önlemlerin tam, ciddi ve devamlı uygulanmadığı yerlerde hastalık sorunu her zaman bulunmaktadır. Bazı özel durumlarda da konakçı, patojen, çevre dengesinin korunmasına karşın yine de infeksiyonlara rastlanılabilmektedir. Kültür koşullarında birçok balığın birlikte ve temas halinde bulunması ile doğada serbest yaşayanlara oranla daha fazla hastalanma riski yaratmaktadır. Balıklar buldukları ortamdaki optimal yaşam koşullarının olumsuz yönde değişmesi ile bağışıklık sistemi zayıflatmakta ve böylece infeksiyöz hastalıklara yakalanması kolaylaşmaktadır. Yüksek oranda ölümlere sebep olabilen infeksiyonlar nedeniyle balık işletmeleri ağır ekonomik kayıplara uğramaktadır.

Lactococcus garvieae 1974 yılında Japonya'da sarıkuyruk balıklarında epizootikler oluşturarak yüksek oranda ölümlere sebep olmuştur (Ksuda vd., 1991; Ksuda ve Salati, 1999; Austin ve Austin, 1999). Daha sonraları *L. garvieae* (Synonime *Entereococcus seriolicida*)'nin etken olduğu enfeksiyonlar (Streptokokkozis veya Laktokokkozis) dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki tatlı su ve deniz balığı türlerinde yaygın olarak bildirilmiştir (Ksuda ve Salati, 1999; Chen vd., 2001; Eldar ve Ghittino, 1999; Toranzo vd., 1994; Nieto vd., 1995; Salati vd., 1996; Muzkuiz vd., 1999; Austin ve Austin, 1999).

Gökkuşığı alabalıklarında *L. garvieae* enfeksiyonları; İspanya, İtalya, Portekiz, İngiltere, Güney Afrika, Avustralya, Fransa ve Asya ülkelerinde rapor edilmiştir (Bragg ve Brroero, 1986; Ceschia, 1992; Carson vd., 1993; Eldar ve Ghittino, 1999; Chang vd., 2002; Ravelo vd., 2003). Ülkemizde ilk kez 2001 yılında Ege bölgesindeki gökkuşığı alabalığı işletmelerinde görülmüş ve yüksek ölümlere sebep olmuştur (Diler vd., 2002). Ciddi ekonomik kayıplara ve karakteristik olarak hemorojik septisemiye neden olan hastalık sistemik bir enfeksiyondur ve hızlı bir yayılım göstermektedir. (Çağırğan ve Tanrıku, 1997; Ksuda ve Salati, 1999; Austin ve Austin, 1999). Hastalığın kontrolünde profilaktif tedbirlerin alınması oldukça

önem taşımaktadır. Ancak hastalığın ortaya çıktığı işletmelerde hastalığın sağlığını amacıyla antimikrobiyal maddelerin kullanılması gereklidir. Özellikle porsiyonluk balıklarda bu enfeksiyonun görülmesi halinde enfeksiyona karşı zamanında uygun dozda antibiyotik kullanımı önem taşımaktadır. Çünkü balık etinde oluşacak kalıntı ve bakterinin direnç geliştirebileceği unutulmamalıdır. Bu hastalığa karşı koruyucu amaçla kullanılacak antimikrobiyal ilaçların spesifik hastalık etmenine karşı olan etkisinin çok iyi belirlenmesi ve uygun antibiyotiğin seçilerek yeterli zaman ve miktarda bir sistem dahilinde kullanılması gereklidir. Bu sebeple ülkemizde sıklıkla ortaya çıkan *L. garvieae*'nin sebep olduğu Streptokokkozis vakalarına karşı antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi ve uygun tedavinin uygulanması çok önemlidir. *L. garvieae*'nin ülkemizden izole edilen değişik suşlarına karşı etkili antibiyotiğin belirlenmesi üzerine daha önce araştırmalar yapılmıştır. Fakat bölgesel farklılıklar ve antimikrobiyal direnç gelişiminin sürekliliği hastalığın başarı bir şekilde sağlığını için uygun tedaviyi (antibiyotik türü ve dozunu) değiştirebildiğinden, antibiyogram çalışmalarının devamlılığı yüksek önem arz etmektedir (Kum vd., 2004).

Balık yetiştiriciliğinde, hastalığın antibiyotik ile tedavisi sonrası oluşan stres koşulları enfeksiyonların yeniden tekrarlanması ile beklenen etkinin sınırlı kalmasına ve antibiyotiklere karşı direnç gelişimine sebep olmaktadır. İşletmelerde hastalıklara karşı profilaktif tedbirler alınması gittikçe önem kazanmıştır. Ayrıca hastalıkların tedavisi amacıyla aşırı antibiyotik ve kemoterapotik madde kullanımı, bu kimyasalların balıkta ve çevre de yüksek düzeylerde birikmesine sebep olmakta ve balığın bağışıklık sistemini baskılayarak patojene karşı direncini zayıflatmaktadır (Lunden vd., 2002).

Enfeksiyon hastalıklarında antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz bir şekilde kullanımı bakterilerde bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimine neden olmaktadır (Karayakar ve Ay, 2006).

Antibiyotikler bilinçsizce kullanıldığında; zararlı yan etkiler (karsinojenik, allerjik), bakteriyel direnç gelişimi, kalıntı sorunu, çevre kirliliği, maliyet artışı, iş ve zaman kaybı gibi çeşitli olumsuzluklara yol açar (Türk, 2008). Ayrıca antibiyotik kullanımı, bağışıklık sisteminin baskılanmasına sebep olur. Bu nedenle işletmelerde

hastalıklardan korunmak için en etkili yol; optimum yetiştiricilik şartlarını sağlamak, gerekli hijyenik ve profektik tedbirler almaktır. Hastalık ortaya çıktıktan sonra ise yapılacak tek şey balıkların antibiyogram sonuçlarına göre etkin antibiyotikler ile tedavi edilmesidir. Fakat antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımının antimikrobiyal direnç gelişimine, balık etinde kalıntı oluşumuna ve sucul mikroflora üzerinde etkilere yol açacaktır. Bu nedenle antibiyotikler izole ve identifiye edilen bakteriye yapılan antibiyogram test sonucuna göre kullanılmalıdır.

Antibiyotiklerin keşfinden önce stoklanan bakterilerde direnç bulunmadığı ve şuan mevcut bütün antibiyotiklere karşı bu bakterilerin duyarlı oldukları görülmüştür (Doğancı, 2001). Bakteriler çevresel değişikliklere hemen yanıt verebildikleri için, bu yetenekleri su ekosisteminde ciddi değişikliklere sebep olabilmektedir (Giuliano, 2003). Ayrıca bu yetenekleri sayesinde bakteriler yeni antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmekte ve antibiyotik direnci infeksiyonal hastalıklar ile mücadelede en önemli engel sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Vahaboğlu, 2004). Son zamanlarda antibiyotiklere karşı giderek artan direnç sorunu tüm dünya için tehdit oluşturmaktadır (Akçam vd., 2004). Öte yandan antibiyotik direnci yayılabilir bir özelliktir. İlk defa oluştuktan sonra, hızla plazmid ve transpozonlar gibi aktarılabılır genetik elementler ile aynı veya farklı tür ve cinslere ait diğer bakterilere de geçebilmektedir (Doğancı, 2001).

L. garvieae'nin neden olduğu Laktokokkozis enfeksiyonları gökkuşağı alabalığında her boyda (porsiyonluk ve anaç boylar dahil) yüksek ölümlere sebep olduğundan işletmelerin büyük ekonomik kayıplar yaşamasına yol açmaktadır. Hastalık başladıktan sonra en etkin tedavi yöntemi ise hastalık etmeni *L. garvieae* suşuna karşı antibiyogram yaparak en etkili antibiyotiği tespit etmek ve kullanılmaktadır. Fakat hastalığın sağaltımı amacıyla antimikrobiyal maddelerin aşırı kullanımının balık etinde kalıntı problemleri yaratacağı ve bakteri suşunun kullanılan antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesine sebep olacağı her zaman göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu çalışmada, Eşen Çay'ındaki 3 işletmeden *L. garvieae* suşlarının izole edilerek geleneksel mikrobiyolojik yöntemler ve moleküler yöntemlerle identifikasyonunun yapılarak antimikrobiyal duyarlılığının disk difüzyon tekniği ile belirlenmesi, suşların duyarlı ve dirençli olduğu antibiyotiklerin saptanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Laktokokkozis

Balıklarda Laktokokkozis enfeksiyonu etmeni olan *Lactacoccus garvieae* ilk kez Japonya'da izole edilmiştir (Ksuda vd., 1991). Türkiye'de ise ilk kez 2001 de görülen *L. garvieae*, Diler ve arkadaşları tarafından 2002 yılında rapor edilmiştir. Etmenin özellikle uzak doğuda yaşanan birkaç vakada insanlardan da izole edilmesiyle potansiyel zoonoz olabileceği görüşünü güçlenmiştir. Nitekim Amerika'da yapılan bir çalışmada bu patojen insan kanından, üriner kanalından, solunum sisteminden ve derisinden izole edilmiştir (Elliot vd., 1991).

2.1.1. *Lactacoccus garvieae*'nin izolasyonu ve identifikasyonu

2.1.1.1. *Lactacoccus garvieae*'nin izolasyonu

L. garvieae, Gram pozitif, hareketsiz, çift ya da kısa zincirler oluşturabilen, oval kok, oksidaz ve katalaz negatif, endospor üretmeyen, kanlı agarda alfa hemolitik, fakültatif anaerobiktir. Hasta balıkların ön böbrek, dalak, karaciğer, kan, beyin ve gözlerinden *L. garvieae* izole edilebilir (Austin, 2019). *L. garvieae*'yi izole etmek için NA, BHIA, TSA gibi besi yerleri kullanılmaktadır (Kusuda vd., 1991; Austin, 2019). Optimum üreme sıcaklığı 30-37°C olan ve pH 7-8 olduğu durumlarda 4 ile 45°C aralığında üreyebilmektedir (Ksuda vd., 1991; Austin, 2019). Hastalık özellikle su sıcaklığının 16°C üzerine çıktığı aylarda görülmekte ve çoğu balık türünde ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Austin ve Austin, 1999).

2.1.1.2. İdentifikasyon

2.1.1.2.1. Konvansiyonel yöntemlerle identifikasyon

Balıklarda görülen ve karakteristik hastalık semptomları ve lezyonlar diğer hastalıklarda da görülebildiği için kesin teşhiste yeterli olmamaktadır. Bu sebep ile bakteriyel etmenin laboratuvar metotları ile tanımlanması gerekmektedir (Vendrell vd., 2006).

Bakterinin fenotipik karakterizasyonunda genelde konvansiyonel mikrobiyolojik metotlar ile API 20 STREP, API 32 STREP ve API 50 CH sistemleri kullanılmaktadır (Austin, 2019).

37°C'lik sıcaklıkta 24 saat *L. garvieae*'nin gelişimi için optimum şartları sağlarken balıklarda hastalık yapan diğer bakterilerin üremesi engellediği için *L. garvieae*'nin de önemlidir (Prieta vd., 1993).

Fenotipik identifikasyon; geleneksel biyokimyasal testlerden, hareketlilik, Sitokromoksidaz, Gram boyama, katalaz ve O/F testleriyle yapılmaktadır. (Austin, 2019).

2.1.1.2.2. Moleküler yöntemlerle identifikasyon

Son zamanlarda geliştirilen PCR protokolü ile spesifik primerler yardımıyla çoğaltılan 16S rDNA diziliminin analizi sayesinde *L. garvieae*'nin tür bazında tayini kolayca yapılabilmektedir (Zlotkin vd., 1998; Altinok, 2011). Yine son yıllarda balıklarda bulunan birden fazla patojeni aynı anda tespit için çoklu PCR metodu geliştirilmiştir. Bu teknik ile saf kültürlerden ve doğal infekte balık dokusundan *L. garvieae* yanında farklı etmenlerinde eş zamanlı olarak ve kısa sürede tespitini sağlamaktadır (Mata vd., 2004; Altinok, 2011).

2.1.2. Tedavi

Gökkuşaağı alabalığında ortaya çıkan Laktokokkozis enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotikler kullanılmaktadır. Laktokokkozis tedavisi için çoğunlukla eritromisin, oksitetrasiklin, amoksisilin ve doksasiklin gibi antibiyotiklerin kullanıldığı bildirilmiştir (Munday vd., 1994). Fakat su ürünleri yetiştiriciliğinde bilinçsiz ve aşırı antimikrobiyal madde kullanımına bağlı olarak bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimi rapor edilmiştir (Katao, 1982). Bununla birlikte, bazı antimikrobiyal ajanların in vitro çalışmalarda *L. garvieae*'ye karşı etkili sonuçlar vermesine rağmen sahada aynı başarıyı göstermediği bildirilmektedir (Bercovier vd., 1997). Yapılan bir araştırmada coğrafik orijinleri farklı olan *L. garvieae* izolatlarının enrofloksasin ve nitrofurantoin'e duyarlı, oksalinik asit ve sulfamethoksazol-trimetoprim

kombinasyonlarına ise dirençli oldukları bildirilmiştir (Ravelove vd., 2001). Sarıkuyruk balıklarından (*Seriola dumerili*) izole edilen *L. garvieae* üzerine yapılan diğer bir araştırmada ise izolatların %44'ünün eritromisin, linkomisin ve oksitetrasikline direnç geliştirmiş tespit edilmiştir (Kawanishi vd., 2005). Ülkemizde bu konuda yapılan araştırmalarda *L. garvieae* izolatlarının eritromisin, ofloksasin, ampisillin ve kloramfenikol'e duyarlı, penisilin ve klindamisin'e ise dirençli olduğu bildirilmiştir (Ture vd., 2015).

Farklı coğrafyalardan izole edilen *L. garvieae* ile yapılan çalışmalarda, suşların hepsinin nitrofurantoin'e ve enrofloksasin'e karşı duyarlı olduğu, sulfametoksazol-trimetoprim ve oksolinik asit'e ise dirençli olduğu bildirilirken eritromisin, kloramfenikol, ampisilin'e ve oksitetrasiklin'e karşı duyarlılıkların suşların orijine göre değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (Ravelo vd., 2001).

Son yıllarda Türkiye'de ki salgınlarda *L. garvieae* izolatlarının ofloksasin eritromisin, kloramfenikol ve ampisilin karşı duyarlı, penisilin ve klindamisine karşı ise dirençli oldukları saptanmıştır (Diler vd., 2002). *L. garvieae* ile mücadelede bakteriyofajlar denenmiş ve fajların oral yolla alındıklarında mortaliteyi düşürmeye yardımcı oldukları saptanmıştır (Nakai vd., 1999).

2.1.3. Koruma ve kontrol

Bakteriyel hastalık etmenlerinin, kara ekosistemine ve insanlara yayılmamasını önlemek için su ürünleri yetiştiricilik işletmelerinde biyogüvenlik sistemlerinin kurulması, çalıştırılması ve işletmelerden belirli periyotlarda mikrobiyolojik örnekleme yapılması gerekmektedir.

Laktokokkozis'i kontrol altına almak için inaktif aşılar kullanılmaktadır (Eldar vd., 1995). Aşılanmanın Laktokokkozis ile mücadelede etkin bir yol olduğu düşünülse de aşılanmanın başarısı uygulama dozuna ve yoluna, konakçının türüne ve adjuvantın tipine göre değişmektedir. Genel olarak alabalıklarda Laktokokkozis hastalığına karşı yapılan aşılamalarda, aşılardan koruyucu etkisinin düşük olduğu ve koruma sürelerinin kısıtlı (3-6 ay) olduğu bildirilmiştir (Afonso vd., 2003). Düşük koruyucu etki ve

kısıtlı koruma süreleri yanında, aşı uygulamalarının pahalı uygulamalar olması bu korunma yolunun işletmeler tarafından etkin bir şekilde kullanımını engellemektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar probiyotiklerin de Laktokokkozis enfeksiyonlarını engellediğini ortaya koymuştur (Brunt vd., 2005). Günümüzde Laktokokkozis ile mücadelede de çeşitli yollar denense de antibiyotik kullanımı en tercih edilen yöntemlerden biridir.

Laktokokkozis ile mücadelede antibiyogramlar yapılarak, etkin antibiyotik tespit edilerek, kontrollü bir şekilde işletmelerde uygulamak gerekmektedir

2.2. Antibiyotik Kullanımı

Antibiyotikler, çeşitli mikroorganizmalar tarafından salgılanan ve Çizelge 2.1’de verildiği gibi diğer mikroorganizmaların gelişmesini durduran(bakteriyostatik) ya da öldüren(bakterisit) maddelerdir (Traş vd., 2018).

Çizelge 2.1. Bakteriyostatik ve bakterisit antibiyotikler (Traş vd., 2018)

Bakterisitler	Bakteriyostatik
Betalaktamlar (Penisilinler, sefalosporinler)	Tetrasiklinler (Oksitetrasiklin, minosiklin, doksisisiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin)
Florokinolonlar (Enrofloksasin, danofloksasin, siprofloksasin, marbofloksasin, difloksasin, pradofloksasin, ibafloksasin)	Amfenikoller (Florfenikol, tiamfenikol, kloramfenikol)
Sulfonamid+diaminopirimidin kombinasyonları	Makrolidler (Eritromisin, tilozin, tilmikosin, tulatromisin Tilvalosin, spiramisin, gamitromisin, tildipirosin)
Aminoglikozitler (Amikasin, gentamisin, kanamisin, neomisin, spektinomisin, dihidrodtreptomisin, streptomisin)	Linkozamidler (Linkomisin, klindamisin, pirlimisin) Sulfonamidler

Su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe bakteriyel hastalıklar yaygın olarak görülmekte ve sektörün önemli problemlerinden birini oluşturmaktadır. Akuakültürde bakteriyel infeksiyonların tedavisi için antibakteriyel maddelerin kullanımı 1930'lu yılların sonunda ABD'de sulfamerazin'in kullanımıyla başlamıştır. 1950'li yıllarda oksitetrasiklin ABD'de ve Avrupa'da, 1970'lerde oksolinik asit Japonya'da balık yetiştiriciliği endüstrisine girmiştir. ABD'de yapılan araştırmalar güçlendirilmiş sulfonamidlere yoğunlaşmış, ancak balıklarda kullanımı için yasal izni 1985'de verilmiştir. Güçlendirilmiş sulfonamidlerin kullanımı frunkulosis'in tedavisi için yarar sağlamıştır. Sulfonamidlerin girmesini takiben, sulfonamidlere karşı dirençli bakterilerin görülmesinden dolayı akuakültürde diğer antimikrobiyal bileşikler (kloramfenikol, oksitetrasiklin, kanamisin, nifurprazine, oksolinik asit, sodyum nifurstyrenata ve flumekuoin) hızlı bir şekilde yaygınlaşmıştır (Austin ve Austin, 2007).

2.2.1. Antibiyotik grupları

Günümüzde sahada sıklıkla kullanılan antibiyotik grupları Çizelge 2.2'de, balık yetiştiriciliğinde kullanılan antibakteriyel ilaç grupları Şekil 2.1'de verilmiştir (Treves-Brown, 2000). Bu antibiyotiklerden; furazolidon, furaldaton, nitro-furazon, kloramfenikol, tiamfenikol, ronidazol ve dapson 2377/90 Sayılı AB Yönetmeliğinin EK-2'sinde kültür balıkçılığında kullanımı yasaklanmıştır.

Çizelge 2.2. Sahada sıklıkla kullanılan antibiyotik grupları (Traş vd., 2018)

1-Betalaktamlar	Penisilinler	Benzil penisilin tuzları	Sodyum veya Potasyum penisilin G
		Benzil penisilin Esterleri	Klemizol, prokalin, benzatin, penethamat veya benethamin penisilin G
		Fenoksipenisilinler	Fenoksimetilpenisilin, fenoksietilpenisilin, fenoksipropilpenisilin
		Penisilinaza dayanıklı penisilinler	Nafsilin, metisilin, oksasilin, dikloksasilin, kloksasilin, flukoksasilin
		Aminopenisilinler	Ampisilin, amoksisilin
		Etkisi güçlendirilmiş penisilinler	Ampisilin+sulbaktam, amoksisili+klavulanik asit, tikarsilin+klavulanik asit
		Karbenisilinler	Tikarsilin, karbenisilin, karfenisilin
		Asilüroidopenisilinler	Azlosilin, mezlosilin, piperasilin
		Diğer penisilinler	Mesilinam, temosilin

Çizelge 2.2. Sahada sıklıkla kullanılan antibiyotik grupları (Traş vd., 2018) (Devam)

1-Betalaktamlar	Sefalosp orinler	Birinci Kuşak	Sefaleksim, sefasetril, sefapirin, sfelonium, sefazolin, vs
		İkinci Kuşak	Sefalor, sefuroksim oksetil vs
		Üçüncü Kuşak	Sefaperazon, seftiofur, sefovesin, seftriakson, vs
		Dördüncü Kuşak	Sefkuinom
	Diğerleri	Aztreonam, imipenem+silastatin	
2-Florokinolonlar	Enrofloksasin, danofloksasin, siprofloksasin, makrofloksasin, pradofloksasin, difloksasin, ibafloksasin, flumekuın		
3-Aminoglikozitler	Amikasin, gentamisin, kanamisin, neomisin, streptomisin, dihidrostreptomisin, spektinomisin, paromomisin, framisetin, viomisin, apramisin, sissomisin, netilmisin		
4-Sulfonamid +diaminopirimidin kombinasyonları	Sülfadoksin+trimetoprim, sülfadiazin+trimetoprim, sülfametaksazol+trimetoprim, sulfokloropridazin+ trimetoprim, sülfadimetoksin+ormetoprim, sulfadimidin+baquiloprim		
5-Tetrasiklinler	Oksitetrasiklin, tetrasiklin, doksisiklin, minosiklin, klortetrasiklin		
6-Amfenikoller	Florfenikol, kloramfenikol, tiamfenikol		
7-Makrolidler	Eritromisin, tilozin, tilmikosin, tulatromisin, spiramisin, tilvalosin, gamitromisin, tildipirosin, jasomisin, azitromisin, klaritromisin		
8-Linkozamidler	Linkomisin, klindamisin, pirlimisin		

Tetrasiklinler	Oksitetrasiklin Klorotetrasiklin Tetrasiklin Doksiklin
Penisilinler	Ampicillin Amoksilin
Makrolidler	Eritromisin
Sulfonamidler	Sulfamerazin Sulfadimidin Sulfadimethoksin Sulfamonomethoksin
Güçlendirilmiş sulfonamidler	Tribrisen (Trimethoprin: Sulfadiazine (1/5)) Romet-30 (Ormetoprim: Sulfadimethoksine (1/5))
Kinolonlar ve Fluorkinolonlar	Nalidiksik asit Oksolinik asit
Nitrofuraneler	Furazolidone Nitrofurantoin

Şekil 2.1. Balık yetiştiriciliğinde kullanılan antibakteriyel ilaç grupları (Treves-Brown, 2000)

2.2.2. Antibiyotik kullanımının olumsuz etkileri

İntensif balık yetiştiriciliğinde yüksek kalitede ürün elde edilmesi canlı için optimum şartların sağlanması ve canlının sağlığının korunmasıyla mümkündür.

Balık yetiştiriciliğinde artan üretimle birlikte hastalık problemleri sıklıkla yaşanmaktadır. Aşırı stok, su kalitesindeki değişimler vd. bakteriyel hastalıkların oldukça sık ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Eğer tedavi yapılmazsa, büyümenin

yavaşlaması ve balık ölümlerinin görülmesi gibi büyük ekonomik kayıplara neden olabilmektedir.

Ülkemizde yetiştiricilik endüstrisinde ekonomik olarak değerli bir tür olan gökkuşacağı alabalığında (Anonim, 2009) epizootilere neden olan bakteriyel hastalık etmenleri sıklıkla izole edilmiştir (Diler vd., 2002). Ülkemizde gökkuşacağı alabalığı üretiminde en sık görülen hastalıklar; *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* ve *Vibrio anguillarum* gibi patojenlerin neden olduğu bakteriyel hastalıklardır (Çağırğan ve Yürekli Türk, 1991; Diler vd., 2002) ve işletme açısından çok büyük ekonomik kayıplara neden olabilmektedirler. Bu bağlamda özellikle yaz aylarında her boy balıkta görülen *Lactococcus* enfeksiyonları yetiştiriciliği sekteye uğratmaktadır. *L. garvieae*'nin ülkemizde 2001 yılında ilk izolasyonundan sonra bu patojenle ilgili çok sayıda bildiriş ve çalışma yapılmıştır (Diler vd., 2002; Altun vd., 2004; Kubilay vd., 2005; Altun vd., 2013). Bu hastalık etmenine karşı aşı uygulamaları yapılmasına rağmen, hastalık işletmelerde hala görülmekte ve çok fazla antibiyotik kullanılmaktadır.

Balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan bazı antimikrobiyal maddeler hem su hem de balıkta kalıntı oluşmasına neden olabilmektedir. Ayrıca bazı balık patojenlerinde bulunan direnç genlerinin insanlarda patojeniteye yol açan bakterilere aktarılabildikleri ve bu yüzden bazı antibiyotiklerin insan patojenlerine karşı oldukça etkisiz olduğu tespit edilmiş ve kullanımları sınırlandırılmıştır (Schnick vd., 1997; Daly vd., 1999; Dos Santos, 2000). Bu nedenle bu patojenin varlığı ve bu suşlarda antimikrobiyal maddelere karşı direnç gelişiminin belirlenmesi önem arz etmektedir.

2.2.3. Antibakteriyel tedavide başarısızlık nedenleri

- Teşhis yanlış konulmuştur.
- Canlıda ikinci bir enfeksiyon vardır.
- İlacın canlıda biyo-yararlanımı düşüktür.
- Canlının bağışıklık sistemi yetersizdir.
- İlaç enfeksiyon bölgesine yeterli oranda ulaşmıyordur.
- Enfeksiyonun bulunduğu bölgede ilaç etkisizdir.
- Yanlış kombinasyonlar yapılmıştır.

- Etmen antibiyotiğe dirançlidir.
- İlaç etkili dozda, uygulama şeklinde, uygun sürede kullanılmamıştır.
- İşletme reçeteyi tam uygulamamıştır.
- İlacın hazırlanması ve formülasyonu ile ilgili problemler olabilir.
- Destekleyici tedavi yeterli oranda yapılmamıştır (Traş vd., 2018).

2.2.4. Antibiyotiklere direnç

Klinik direnç, bir antibiyotiğin kullanıldığı tedavi dozlarında oluşturduğu plazma konsantrasyonunda duyarlı olduğu bilinen bakterilerin yaşama ve çoğalma kabiliyetlerini devam ettirebilmeleridir. Bu durumda hastalığın tedavisi için antibiyotiğin dozunun artırılması gerekebilir. Bir antibiyotiğe direnç kazanan bakterinin kimyasal yapısı (penisilin-sefalosporin gibi) veya etki şekli (tetrasiklin-kloramfenikol gibi) benzer başka bir antibiyotiğe direnç kazanmasına, çapraz direnç adı verilir. Birden fazla antibiyotiğe dirençli bakteriler ise çoğul dirençli bakteriler olarak adlandırılır (Traş vd., 2018).

2.2.4.1. Doğal (yapısal) direnç

Antibiyotiğin bakteriye girememesi ya da etkileyebileceği nokta olmamasından kaynaklanır. Durağan dönemdeki bakteriler, betalaktamlara doğal direnç gösterirler (Traş vd., 2018).

2.2.4.2. Kazanılmış direnç

Bakteriler ilaca karşı ilk temasta duyarlıdır, ancak ilerleyen zaman içinde duyarlılıkları azalmaktadır. Kazanılmış direnç mutasyonel ve aktarılabılır direnç; genlerin aynı veya farklı türdeki bakterilere transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon aracılığı ile aktarılmasıyla gerçekleşen direnç, olmak üzere iki şekilde gelişmektedir (Traş vd., 2018). Bakteriler; antibiyotiği parçalayan enzimleri (betalaktamaz vb.) sentezleyerek, antibiyotiğin bakteri içine girişini engelleyerek, bakteri içine giren antibiyotiği yeniden hücre dışına atarak, ilaç molekülünün bakteri de etki noktasına bağlanmasını azaltarak veya etki noktasını değiştirerek ve sentezi

engellenmiş bir maddeyi (folik asit gibi) başka yollardan sentezleyerek ya da ortamdan alarak direnç gösterir (Traş vd., 2018).

Sonuç olarak her antibiyotiğe direnç gelişeceği, gelişen direncin ilaç kullanım sıklığı ile artabileceği, antibiyotik kullanılmaması kaydı ile zaman içinde gelişen direncin kaybolma ihtimalinin olabileceği ve aktarılabilir direncin klinik olarak daha önemli olduğu unutulmamalıdır. Ayrıca her ülkede satışa sunulan antibiyotiklerin farklılığı ve kullanım sıklığı değiştiği için antibiyotik duyarlılık-dirençlerinin ülkeden ülkeye, bölgeden bölgeye bazen işletmeden işletmeye de değişebileceği akılda tutulmalıdır. Direnç oluşumunu engellemek için antibiyotikler etkili dozda ve sürede kullanılmalıdır. Bu amaçla antibiyogram testi yapıp uygun antibiyotikler kullanılmalı ve kontrolsüz şekilde antibiyotik kullanımından kaçınılmalıdır. Antibiyogram yapılamadığı durumlarda ise kombine antibiyotikler kullanılmalıdır (Traş vd., 2018).

2.3. *L. garvieae* İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antimikrobiyal Duyarlılığının Tespiti ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Elliott ve Facklam (1996), insandan izole edilen *L. garvieae* patojeninin klindamisin antibiyotiğine dirençli olduğunu bildirmişlerdir (Elliot vd., 1996).

Diler vd. (2002), *L. garvieae* suşları için yaptıkları antibiyogram testi sonucunda, suşların penisilin, klindamisin, sefriakon antibiyotiklerine dirençli ve eritromisin, tetrasiklin, oflokasin, ampisilin ve kloromfenikol antibiyotiklerine duyarlı olduğunu saptamışlardır (Diler vd., 2002).

Mazzolini vd. (2003), Kuzey İtalya'daki klinik izolatlardan elde edilen *L. garvieae* suşlarının ampisilin, amoksilin, oksitetrasiklin ve eritromisin'e karşı duyarlı olduğunu, flumequin, oksolonik asit, steptomisin, trimetoprim ve sulfadiazin'e dirençli olduğunu saptamıştır (Mazzolini vd., 2003).

Kubilay vd. (2005), 9 farklı *L. garvieae* suşunun antimikrobiyal duyarlılığını Mueller-Hinton agar ve disk diffüzyon tekniği ATB VET (Biomerieux 14 289) strip sistemi kullanarak incelemiştir. Ayrıca E testi (AB BIODISK) ile de Eritromisin

antibiyotiğinin MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyon) değerlerini belirlemiştir. *L. garvieae* suşları disk diffüzyon testi ve ATB VET sistemine göre Amokisilin+klavulanikasit, ampisilin, enrofloksasin, vankomisin, tetrasiklin, doksisisiklin, kloramfenikol, eritromisin, nitrofurantoin, sefalotin, amokisisillin, sefoperazon, spektinomisin, pristinamisin, kotrimokazol antibiyotiklerine duyarlı ve kanamisin, sefuroksime, lincomisin, penisilin, oflokasin, norfloksasin, siprofloksasin, seftriazone, klindamisin, oksasilin, streptomisin, trimetoprim / sülfometoksazol, gentamisin, apramisin, tilosin, kolistin, sulfamethizol, flumequin, oksolinik asit antibiyotiklerine karşı dirençli bulunmuştur (Kubilay vd., 2005). MİK değerleride (0,032-0,125 µg/mL) *L. garvieae* suşlarının eritromisine duyarlı olduğu göstermiştir (Kubilay vd., 2005).

Kav vd. (2008)'nin Konya bölgesindeki gökkuşığı alabalığı işletmelerinde Haziran 2002 ve Ağustos 2004 yılları arasında yaptığı bir araştırmada, izole edilen *L. garvieae* suşları penisilin-G, ampisilin, amokisilin, ampisilin+sulbaktam, amokisilin/klavulanikasit, vankomisin, siprofloksasin, marbofloksasin, kloramfenikol, florfenikol, eritromisin, oksitetrasiklin, sefoperazon, sulbaktam/sefoperazon ve novobiosin'e duyarlı bulunmuştur. Gökkuşığı alabalık çiftliklerinde *L. garvieae* enfeksiyonunun tedavisi için β -lactam grubu antibiyotiklerinin tercih edilmelisi sonucuna ulaşmıştır (Kav vd., 2008).

Altun vd. (2013), ülkemiz gökkuşığı alabalığı işletmelerinden izole edilen 10 farklı *L. garvieae* suşunun fenotipik ve genotipik özelliklerini 3 farklı referans suş ile (İspanya, İngiltere ve ATCC 43921) karşılaştırmıştır. Suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde, geleneksel mikrobiyolojik ve Rapid 32 STREP tanı testleri kullanmıştır. Rapid 32 STREP tanı testi suşlar arasında β -Glucuronidaz, D-riboz, sorbitol, laktoz, alanyl-phenylalanyl-proline, raffinose, pyrrolidonyl arylamidase, arylamidase, hippurate hidrolizi, üreaz açısından farklılıklar olmasına rağmen tüm suşları *L. garvieae* olarak tanımlanmıştır (Altun vd., 2013). ERIC2 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR analizinde *L. garvieae* izolatları %70 benzerlik katsayısına göre 3 farklı genotipe ayrılmış ve Türkiye kökenli izolatların büyük bir bölümünün (8 izolatın) predominant tip olan LG1 genotipine dahil olduğu belirlenmiştir (Altun vd., 2013). Ayrıca incelenen *L. garvieae* suşlarının ülkemizde alabalık yetiştiricilik sektöründe sıklıkla kullanılan neomisin, linkomisin,

gentamisin, sulphamethokazol, etrimetoprim, oksitetrasiklin, eritromisin, amoksisilin, doksisisiklin ve florfenikol'e karşı direnç geliştirmiş olduğu belirlenmiştir (Altun vd., 2013).

Raissy vd. (2015), yaptığı araştırmada; Batı İran'da kültür gökkuşağı alabalığından izole edilen *L. garvieae*'deki tetrasiklin direnç genlerinin varlığını değerlendirilmiştir. İzolatlar, disk difüzyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal direnç açısından incelenmiş, test edilen 49 suşun 19'unun tetrasikline (%38,7), 32'sinin enrofloksasine (%65,3), 21'inin eritromisine (%42,8), 20'si kloramfenikole (%40,8) ve trimetoprim-sülfametoksazole (%40,8) dirençli olduğu bulunmuştur. Suşlar daha sonra genotipik direnç profilleri için karakterize edilmiş ve 49 izolatın hepsinin de tetrasiklin direnç genlerinden en az birini içerdiği ortaya konulmuştur (Raissy vd., 2015). Direnç geni izolatların %89,4'ünde rapor edilmiştir (Raissy vd., 2015). Sonuçta, alabalık kültürü ve insan sağlığı açılarından potansiyel bir tehlike olan *L. garvieae* suşlarında yüksek düzeyde antibiyotik direncinin olduğu ortaya konulmuştur (Raissy vd., 2015).

Duman (2017), *L. garvieae* izolatlarının fenotipik tanısında, klasik biyokimyasal testler ve hızlı teşhis kitleri (API 32 STREP) kullanmıştır. *L. garvieae* izolatlarının genetik tanısı için ise pLG/ITS primerleri ile RAPD-PCR analizi yapmıştır. Ayrıca incelenen tüm izolatların sulfanomid, tetrasiklin, florfenikol ile sulfametoksazol-trimetoprim için MİK değerlerini belirlemiş ve bu antibiyotiklere karşı geliştirilen direnç genlerinin dizilerini analiz etmiştir (Duman, 2017). Dizi analiz sonuçları 5 farklı *L. garvieae* genotipi olduğunu, tüm izolatların sulfonamid ve florfenikol'e direnç geliştirdiğini, *ermA* ve *tetS* direnç genlerinin yaygın olduğunu göstermiştir (Duman, 2017).

Hancı (2018), Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş 25 farklı *L. garvieae* izolatının 14 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılığını disk difüzyon yöntemiyle belirlemiştir. İzolatların sahip olduğu direnç genlerini spesifik primerler ve PCR metodu kullanarak çoğaltmış ve izolatlar arasındaki olası klonal ilişkileri RAPD-PCR metodu ile ortaya koymuştur (Hancı, 2018). Çalışılan izolatların tamamının en az 4 farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlenmiş, izolatlardan birinin (%4) *suII* direnç genine, altısının (%24) *suIII* direnç genine ve bir izolatın (%4) *tetD* direnç genine sahip olduğunu belirlemiştir. İzolatların ERIC2 primeri ile 3 farklı genotipe

ayrıldığı ve izolatların büyük bir bölümünün (16 izolatın) baskın tip olan LG2 genotipine dahil olduğunu belirlemiştir (Hancı, 2018).

Korun vd. (2018), Fethiye bölgesinde üretim yapan bazı gökkuşığı alabalığı işletmelerindeki hasta yavrulardan *L. garvieae* suşları izole edilerek identifikasyonu yapılmıştır. Suşların eritromisin, sülfametoksazol, ampisilin oksitetrasiklin, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim'e duyarlı, flumekuın, basitrasın, furazolidon, nalidiksik asit, oksalinik asit, kanamisin ve streptomisin'e dirençli olduğu tespit edilmiştir. Plazmit analizi suşların farklı boyutlarda plazmitleri içerdiğini ortaya koymuştur (Korun vd., 2018).

Balta vd. (2019), dokuz farklı gökkuşığı alabalığı işletmesinden 24 bakteri izole etmiştir. Tüm izolatların identifikasyonlarını geleneksel biyokimyasal testler ve API 20 STREP test kiti ve PCR testi kullanarak yapmışlardır. *L. garvieae* türleri için 16S rDNA'ya spesifik pLG-1 ve pLG-2 referans genleri kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, hastalıklı gökkuşığı alabalığı gözlerinden izole edilen 22 farklı izolatın tamamının *L. garvieae* olduğu PCR ile doğrulanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre, tüm *L. garvieae* izolatlarının streptomisin, sulfametoksazol ve sulfametoksazol/trimetoprim'e dirençli olduğu tespit edilmiştir (Balta vd., 2019). Aynı izolatların ampisiline %94.2, oksitetrasikline %72.5, eritromisine %55.07, oksolinik asite %43.5, enrofloksasine %26.09, doksisisiklin %20.3, amoksisilin ve florfenikole %8.7 oranında dirençli olduğunu belirlemişlerdir (Balta vd., 2019). *L. garvieae* suşları için en etkili antibiyotiklerin florfenikol, amoksisilin, doksisisiklin ve enrofloksasin olduğu bulunmuştur (Balta vd., 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *L. garvieae* İzolasyonu

Bakteri izolasyonu Muğla ili, Seydikemer ilçesi, Eşen Çayı Havzasında üretim yapan 3 farklı gökkuşacağı alabalığı işletmesinden, su sıcaklığının 12,6-13,6 °C olduğu Ekim, Kasım ve Aralık aylarında yapılmıştır (Şekil 3.1). MS222 kullanılarak anestezi altına alınan balıklar dış parazit muayenesi yapıldıktan sonra tüm vücut yüzeyleri %70 etil alkol ile dezenfekte edilip otopsi yapılmıştır. İç ve dış bakı muayeneleri yapılarak hastalık bulguları kaydedilmiştir. Her bir işletmeden alınan ortalama 165-216 gr ağırlığında 16 balık anestezi altında ötenazisi yapıldıktan sonra bakteriyel izolasyon için aseptik koşullarda balıkların steril organlarından; ön böbrek, karaciğer, dalaktan TSA'ya ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan petripler 22°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İzole edilen bakterileri suşları saflaştırıldıktan sonra geleneksel ve moleküler yöntemler ile identifikasyonları yapılmıştır. Bakteriyolojik incelemeler Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarında, moleküler çalışmalar ise Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Laboratuvarında yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Eşen Çayı Havzasının konumu

Çalışma süresince kullanılan tüm besiyerleri ve solüsyonlar saf su kullanılarak hazırlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

Antibiyotik hassasiyet testleri için MHA kullanılmıştır. Bu besiyeri talimatına uygun olarak hazırlanmış ve 121°C’de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Daha sonra steril edilen besiyeri petrilere dökülmüştür. Sonra oda sıcaklığında katılaşması için beklenmiştir. Kontaminasyon kontrolü için, içinde besiyeri bulunan petri kapları bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hiç bakteri üremesi olmayan petrilere hassasiyet testleri için kullanılmıştır.

Testlerde kullanılacak suşlar için TSA kullanılmıştır. Daha sonra besiyeri otoklavlanmış ve uygun sıcaklıktayken petri kaplarına dökülmüştür. Oda sıcaklığında katılaşması beklenmiştir. Katılaştıran besiyeri yerlerine, test edilecek mikroorganizma suşlarının çizgi ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan petri kapları 25°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonucunda, petri kaplarında üreyen suşlar kullanılıncaya kadar 4°C’de muhafaza edilmiştir. Çalışma sırasında kullanılan katı ve sıvı besiyeri solüsyonlarının konsantrasyonları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma sırasında kullanılan katı ve sıvı besiyeri solüsyonlarının konsantrasyonları

Besiyeri	Konsantrasyon (gram/l)
MHA	34 g
TSB	30 g
TSA	40 g

Bakteriyel izolatlar TSB (Merck)’ye %20 oranında steril gliserin (Sigma) eklenerek -80°C’de stoklanmıştır.

Araştırmada kullanılan *L. garvieae* izolatları TSB kullanılarak 25°C’de 24 saatte inkübe edilerek üretilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ortama %1 Gliserin eklenmiştir. Kültür ortamı 2 ml olacak şekilde steril tüplere dağıtılmış ve uzun süreli (6 ay) saklama amacıyla -80°C’de derin dondurucuya alınmıştır.

Depolanan bakterilerin testlerde kullanımı için -80°C’den alınan stok oda sıcaklığında bekletildikten sonra TSA besiyerlerine ekilerek 25°C’de 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra *L. garvieae* suşları yatık TSA tüplerine ekilmiş

ve 25°C'de 24-48 saat süreyle üretim amacıyla inkübasyona alınmıştır. +4°C'de günlük kullanım amacıyla saklanmıştır

3.2. *L. garvieae*'nın Geleneksel Yöntemlerle İdentifikasyonu

İzole edilen bakteriler saflaştırıldıktan sonra geleneksel yöntemler ile identifikasyonları yapılmıştır. Balıklardan izole edilen bakterilerin önce koloni morfolojileri, renkleri ve diğer karakteristik özellikleri kaydedilmiş, sonra fenotipik özellikleri belirlemek amacı ile Gram boyama, hareket testi, sitokrom oksidaz, katalaz, oksidasyon/fermentasyon (O/F) testleri yapılmıştır. Diğer biyokimyasal testler ise API 20 STREP (Biomerieux, France) ile yapılmıştır. Bu test kiti firmanın önerisi doğrultusunda uygun şartlarda yapılmıştır.

3.3. *L. garvieae*'nin Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu

3.3.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için NA içindeki bir gece inkübe edilen kültürler 5 ml olarak hazırlanmıştır. Öncelikle uygulanacak DNA izolasyon protokolünü belirlemek amacıyla bakteri izolatları Gram boyama ile tanımlanmıştır. Daha sonra total genomik DNA izolasyon kiti (ThermoScientific) protokolünde belirtilen sayıda (McFarland 0.5 bulanıklığına denk olacak şekilde yaklaşık $1,5 \times 10^9$ hücre) hücre kültürden alınmıştır. Kiti üreten firmanın önerdiği gibi gram + bakterilere özel protokol kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen total genomik DNA 10 mM Tris-EDTA tamponuyla 200 µl hacime kadar seyreltilmiş ve kullanılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Bakterilerin tür bazında tanısı için 16S rDNA nükleotid dizileri kullanılmıştır. Total genomik DNA'dan hedeflenen dizinin çoğaltılması için PCR reaksiyonunda B27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') ve U1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') primerleri kullanılmıştır. PCR reaksiyon karışımı 12,5 µl 2X master PCR karışımına (Qiagen) kitin protokolünde önerildiği üzere 2 ng

total genomik DNA (5 µl Tris-EDTA tamponu ile seyreltilmiş), her bir primerden 1 µl (10 nmol/µl) ve toplam reaksiyon hacmini 25 µl'ye tamamlayacak miktarda steril su eklenerek hazırlanmıştır. 16S rDNA genlerinin çoğaltımında uygulanan PCR koşulları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. 16S rDNA dizisinin çoğaltımı için uygulanacak PCR protokolü

Sıcaklık (°C)	Süre	
95 (Başlangıç denatürasyonu)	10 dk	} 35 döngü
95 (Denatürasyon)	45 sn	
60 (Primerlerin bağlanması)	45 sn	
72 (DNA sentezi)	2,5 dk	
72 (son uzatma)	10 dk	

DNA izolatlarının PCR'de kullanılabilir kadar saf olup olmadığı spektrofotometrede analiz edilerek değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede tüm DNA izolatlarının 260 ve 280 nm dalga boylarında absorpsiyon değeri (A) oranlarına bakılmıştır. DNA 260 nm, proteinler ise 280 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon vermektedir. Temiz bir DNA'da 260 /280 A oranı 1.80 ile 2.00 arasında olmalıdır. 1.8'in altında elde edilen 260 /280 A oranı protein kontaminasyonunu, 2.00'nin üzerinde elde edilen A oranı ise RNA kontaminasyonunu işaret etmektedir (Kennedy ve Oswald, 2011). Her iki durumda PCR performansını olumsuz etkilediğinden iyi kalitede PCR ürünü elde edebilmek için mutlaka kontaminasyonu mümkün olduğunca az kalıp DNA kullanılması gerekmektedir.

DNA izolasyonu ve PCR reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin tespiti için agaroz jel elektroforezinden yararlanılmıştır. Bu amaç için TAE tampon çözeltisinden (50X) yararlanılmıştır. Bu çözelti saf su ile 1X'e seyreltilerek kullanılmıştır. Jel hazırlanırken %0.8 ve %2 konsantrasyonlarında agaroz kullanılarak jeller hazırlanmıştır (Brody ve Kern, 2004). Agaroz jelle 6X yükleme tamponu 1/6 oranında örnek ile karıştırılarak 6 µl toplam hacimde yüklenmiştir. Total genomik DNA izolatları için %0,8'lik, PCR ürünleri için %2'lik agaroz jeller kullanılmıştır. Her iki jel de 8 volt/cm² elektrik alanda yürütülmüştür (Brody ve Kern, 2004). Moleküler büyüklüklerinin tespitinde 1kb DNA büyüklük belirteci (Ladder) kullanılmıştır.

3.3.3. Dizi analizi

Moleküler identifikasyonda 16S rDNA bölgesinden yararlanılmıştır. Bu DNA dizisi türlere göre değişiklik göstermekle birlikte yaklaşık 1400 bp büyüklüğe sahiptir ve moleküler tanılamada yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 16S rDNA dizisinin saflaştırılması ve nükleotid dizi analizi hizmet alımı yoluyla ticari bir firmaya (BM Labosis) yaptırılmıştır. Analizler ileri ve geri yönde çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen nükleotid dizileri BioEdit V7.2.5. programı ile birleştirilerek bütün diziye ulaşılmıştır. Dizi analizi sonuçları değerlendirildikten sonra GenBank veri tabanında yer alan 16S rDNA dizileriyle BlastN algoritmasından yararlanarak kıyaslama yapılmış ve tür tanılması gerçekleştirilmiştir (Chu ve Lu, 2005; Liu vd., 2013; Liu vd., 2014). Ayrıca bulunan bakteriyel patojenlerin teşhisi amacıyla yapılan biyokimyasal ve morfolojik analiz sonuçlarıyla beraber tüm veriler birlikte değerlendirilerek patojen identifikasyonu güçlendirilmiştir.

3.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

L. garvieae suşları için belirli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş hazır disklerle uygulanan disk difüzyon metodu kullanılmıştır (NCCLS, 2001).

Suşların antimikrobiyal duyarlılıklarını belirlemek için antibiyotik içeren ampisilin 10 mcg (AM10), vankomisin 30 mcg (VA30), trimetoprim / sülfometoksazol 1.25/23.75 mcg (SXT25), eritromisin 15 mcg (E15), linkomisin (L2), enrofloksin 5 mcg (ENR5), gentamisin 10 mcg (CN10), tetrasiklin 30 mcg (TE30), oksolinik asit 2 mcg (OA2), siprofloksin (CIP5), kanamsin 30 mcg (K30), nitrofurantoin 300 mcg (F300), kloramfenikol 300 mcg (C30), kolistin (CT10), doksisiklin 30 mcg (DO30), ofloksasin (OFX5), penisilin G 10 U (P10), streptomisin 10 mcg (S10), klindamisin 2 mcg (DA2), sefuroksim (CXM30), oksitetrasiklin (T30), sefoperazon (CEP75), pristinamisin (PT15), flumekuoin (FLM30), tilosin (TY15), seftriakzon (CRO30), spektinomisin (SPT100), norfloksasin (NOR10), sefalotin (KF30), amoksisilin (AX25), oksasilin (OX1), apramisin (APR15) antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

İnkübasyon sonucunda inhibisyonzonlarının çapı milimetrik cetvel ile ölçülerek ve NCCLS 2001 kriterlerine göre suşlar duyarlı (S) ve dirençli (R) olarak ayrılmıştır.

TSB hazırlanarak yatık tüplerden alınan suşlardan ekim yapılmıştır. Sonra 24 saat 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ticari McFarland (Biomerieuxsa 70 900) 0.5 bulanıklığına denk olacak şekilde, bakteri süspansiyonunun bulanıklığı serum fizyolojik (%0.9) ile ayarlanmıştır.

Daha sonra hazırlanan bakteri süspansiyonundan MHA besiyerine 0,1 ml miktarında konularak yayılmıştır. Süspansiyonun tüm besiyeri üzerini kaplayacak şekilde steril eküvyon ile dağılması sağlanmıştır. Petrilerin kuruması için 5-10 dk laminar flowda bırakılmıştır. Daha sonra agarın yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda değişik antibiyotikleri içeren diskler steril pens ile yerleştirilerek 25°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *L. garvieae* Suşları

Tez çalışmasında toplamda 16 adet *L. garvieae* suşu kullanılmıştır.

4.2. *L. garvieae* Suşlarının Fenotipik Özellikleri

L. garvieae suşları Gram pozitif, hareketsiz, katalaz ve sitokromoksidaz negatif, O/F testine fermantatif özellik göstermektedir (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. *L. garvieae* suşlarının (LG-1-LG16) fenotipik özellikleri

Biyokimyasal karakterler LG-1--LG16		Biyokimyasal karakterler LG-1--LG16	
Gram	+	Dekarboksilasyon	
Koloni büyüklüğü	<1 mm	Lisin	-
Hareketlilik	-	Ornitin	-
Pigment üretimi	-	Arjinin	+
Katalaz	-	Nişasta	-
Sitokrom Oksidaz	-	Jelatin	-
O-F	F	Eskulin	+
Hemoliz	A		
Sitrat	-	Büyüme	
Nitrat Üretimi	-	4°C	+
Methyl Red	+	10°C	+
Voges-Proskauer	+	22 °C	+
Indol	-	30°C	+
H ₂ S	-	37°C	+
O/129	S	45°C	+
Brain heart insusion agar	+		
Bile esculin azide agar	+	Asit oluşumu	
Triple sugar iron agar	+	Laktoz	-
Mac Conkey agar	+	Glukoz	+
Tripticase soy agar	+	Fruktoz	+
Nutriend agar	+	Galaktoz	+
pH 9.6	+	Mannitol	+
pH 6	+	Sakkaroz	+
pH 5	+	Sorbitol	-
0% NaCl	+	Ramnoz	-
3 % NaCl	+	Inositol	-
6 % NaCl	+		
6,5 % NaCl	+		
8 % NaCl	-		

Çizelge 4.2. *L. garvieae*'nin tanımlanması için API 20 STREP sonuçları

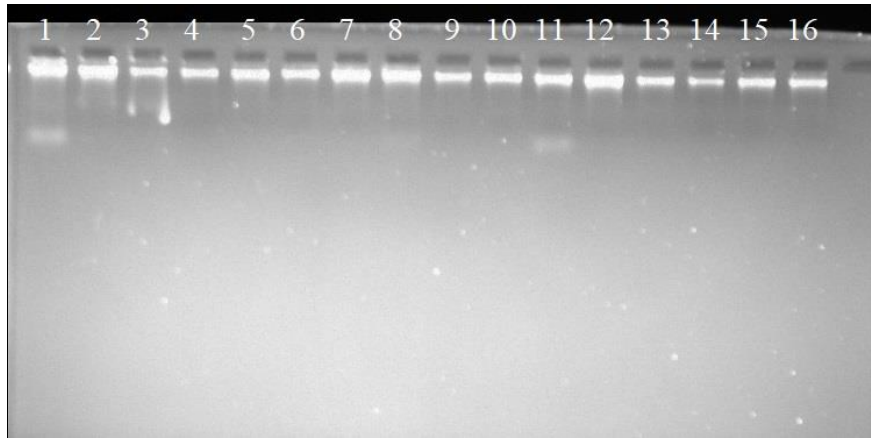
İzolatno	VP	HIP	ESC	PYRA	α GAL	β GUR	β GAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG
R	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
3	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
4	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
5	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
6	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
7	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
9	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
10	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
11	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
12	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
13	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
14	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
15	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
16	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-

VP: Piruvat, HIP: Hipurat hidrolizi, ESC: Esculin, PYRA: Pirodonilarilamidaz, α GAL: α -galaktosidaz, β GUR: β -glukuronidaz, β GAL: Galaktoz, PAL: Alkalın Feulselamilli, Dilail: Riboz, ARA: L-Arabinoz, MAN: Mannitol, SOR: Sorbitol, LAC: Laktoz, TRE: Trehaloz, İNÜ: İnülin, RAF: Raffinoz, AMD: Nişasta, GLYG: Glikojen,

4.3. *L. garvieae* Suşlarının Moleküler Yöntemle Karakterizasyonu

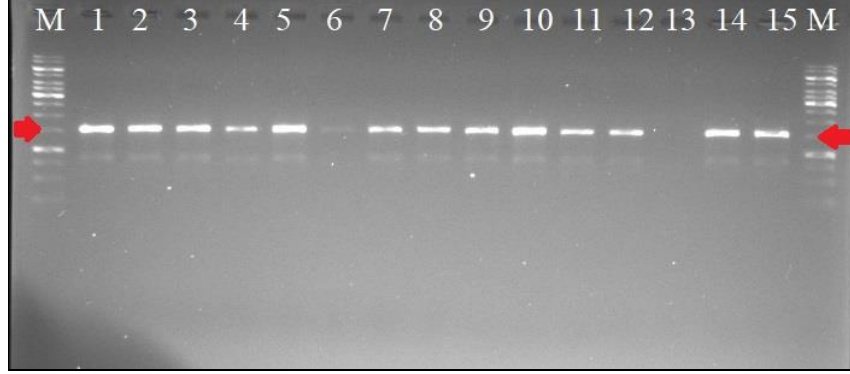
4.3.1. DNA izolatları ve PCR ürünlerinin moleküler karakterizasyonu

Tek hücre kolonileri elde edilen suşlara ait, tek bir koloni TSB besi yerine ekilerek bir gecelik kültürler elde edilmiştir. DNA izolasyonu için kullanılan kitte (ThermoScientific) belirtilen miktarda hücre alınmış ve üretici firmanın önerdiği gram – bakteriler için uygun izolasyon protokolü uygulanmıştır. İzolatlar %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde 8V/cm² elektrik alanda yürütülmüştür. Elde edilen izolatlara ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. *L. garvieae* suşlarına ait DNA izolatlarının agaroz jel görüntüsü

16S rDNA dizisini hedefleyen B27F ve U1492R üniversal primerleri ile gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünlerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2'de sunulmuştur.

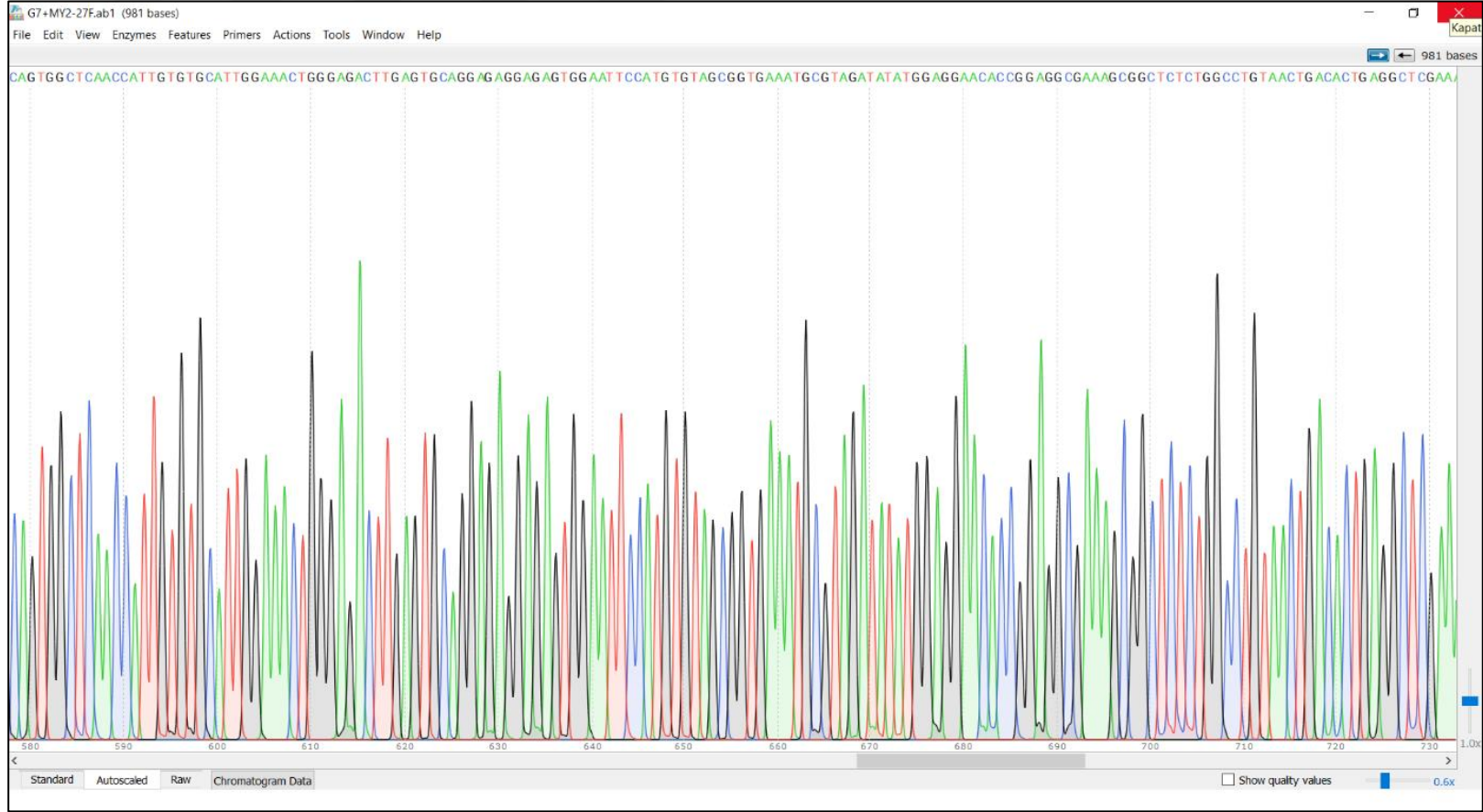


* M: DNA büyüklük belirteci, Oklar 1500 baz çiftini göstermektedir.

Şekil 4.2. 16S rDNA dizisine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

4.3.2. PCR ürünlerinin dizi analizi

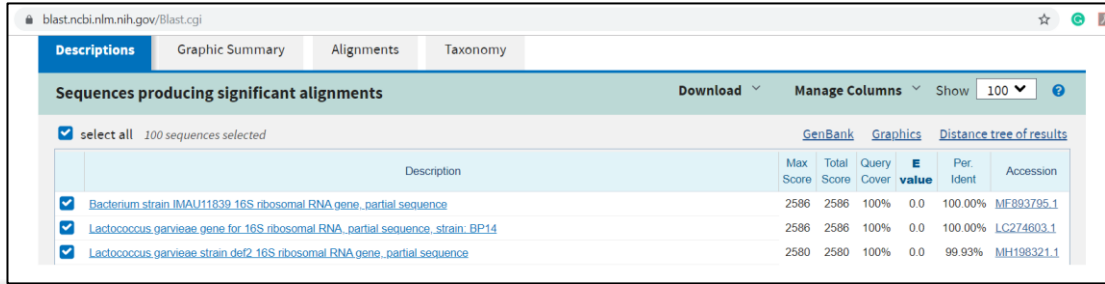
Elde edilen PCR ürünlerinde 16S rDNA dizisine ait bir kromatogram örneği Şekil 4.3'de sunulmuştur. Grafikte sinyallerin temiz, düzenli ve değerlendirmede kullanılabilir olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3. 16S rDNA dizisine ait bir kromatogram örneği

4.3.3. Bakterilerin moleküler tanımları

Bakteri suşlarına ait 16S rDNA baz dizisi, BLASTN algoritması kullanılarak GenBank veri tabanında karşılaştırılmıştır. GenBank veri tabanında en çok eşleşen ilk 3 diziyeye ait ekran görüntüsü Şeki 4.4'te sunulmuştur.



The screenshot shows the BLASTN search results page. The top navigation bar includes 'Descriptions', 'Graphic Summary', 'Alignments', and 'Taxonomy'. The main heading is 'Sequences producing significant alignments'. Below this, there are options for 'Download', 'Manage Columns', and 'Show 100'. A table lists the top three results:

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
Bacterium strain JMAU11839_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2586	2586	100%	0.0	100.00%	MF893795.1
Lactococcus garvieae gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: BP14	2586	2586	100%	0.0	100.00%	LC274603.1
Lactococcus garvieae strain def2_16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2580	2580	100%	0.0	99.93%	MH198321.1

Şekil 4.4. BLASTN eşleşme sonucu

Sorgulanan diziyeye en yakın eşleşme *L. garvieae* GenBank veri tabanında yer alan erişim numarası LC274603.1 olan *L. garvieae* ile 100% benzerlik elde edilmiştir.

4.4. *L. garvieae* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Çalışmada kullanılan *L. garvieae* suşlarının disk diffüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. *L. garvieae* suşlarının disk diffüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotikler	Suşlar															
	LG1	LG2	LG3	LG4	LG5	LG6	LG7	LG8	LG9	LG10	LG11	LG12	LG13	LG14	LG15	LG16
AM10,	R(13)	R(13)	I(15)	R(13)	R(14)	R(0)	S(25)	R(14)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	S(35)	R(0)	R(0)	S(33)
VA30	S(24)	S(20)	S(18)	S(20)	I(16)	R(0)	I(15)	S(22)	I(15)	R(10)	R(0)	I(16)	S(25)	R(0)	R(15)	S(25)
SXT25,	I(16)	R(13)	R(0)	R(11)	R(13)	R(0)	R(0)	R(13)	S(24)	I(15)	R(0)	R(0)	S(20)	R(0)	R(0)	R(0)
E15	S(28)	R(0)	R(0)	S(24)	S(24)	S(26)	S(26)	R(11)	R(8)	R(0)	R(0)	R(0)	S(30)	R(0)	I(15)	S(30)
L2	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(8)	R(0)	R(0)	R(0)	I(16)	R(0)	R(0)	R(0)
ENR5	S(23)	S(22)	I(16)	S(23)	S(21)	R(13)	S(20)	R(0)	R(12)	R(12)	R(0)	R(8)	S(25)	R(0)	R(0)	S(25)
CN10	I(16)	R(14)	I(16)	S(22)	R(13)	R(12)	R(13)	R(0)	I(15)	R(0)	R(0)	R(0)	S(20)	R(0)	R(11)	S(17)
TE30	S(25)	S(21)	S(22)	S(22)	S(20)	R(0)	R(0)	R(12)	S(19)	R(14)	R(0)	S(20)	S(23)	R(0)	R(13)	S(25)
OA2	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(7)	R(9)	R(0)	R(0)	R(12)	R(0)	R(0)	R(0)
CIP5	R(13)	R(12)	R(12)	R(13)	R(14)	R(0)	R(0)	I(15)	R(13)	S(22)	R(0)	R(18)	S(22)	R(0)	R(0)	S(24)
K30	S(17)	I(15)	I(15)	R(12)	R(13)	R(0)	R(0)	R(12)	R(13)	R(11)	R(0)	R(0)	I(15)	R(0)	R(0)	S(20)
F300	S(23)	S(20)	S(17)	S(20)	S(21)	I(15)	I(15)	R(13)	R(12)	S(22)	R(0)	R(0)	S(21)	R(0)	R(11)	S(22)
C30	S(30)	S(25)	S(20)	S(22)	S(23)	S(23)	R(0)	R(0)	R(14)	R(13)	R(0)	S(28)	S(30)	R(0)	S(20)	S(34)
CT10	I(16)	S(17)	S(18)	I(16)	I(15)	R(0)	R(0)	R(10)	R(0)	R(11)	R(0)	I(16)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
DO30	S(30)	S(25)	S(19)	S(25)	S(26)	S(25)	S(25)	R(13)	S(22)	R(12)	R(0)	R(0)	S(31)	R(0)	I(16)	S(32)
OFX5	S(23)	S(22)	R(0)	R(13)	S(22)	R(0)	R(0)	R(13)	R(13)	S(22)	R(0)	R(0)	S(20)	R(0)	R(0)	S(20)
P10	S(27)	S(20)	S(22)	S(20)	S(22)	R(0)	S(22)	R(0)	I(15)	R(12)	R(0)	R(0)	S(30)	R(0)	R(0)	S(28)
S10	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(7)	I(16)	R(10)	R(14)	R(0)	R(0)	I(16)	R(0)	R(0)	S(17)
DA2	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(12)	R(12)	R(0)	R(13)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
CXM30	S(20)	S(21)	S(26)	S(25)	S(23)	S(28)	S(27)	R(12)	R(7)	R(8)	R(0)	S(20)	S(40)	R(0)	R(0)	S(36)
T30	S(21)	S(17)	R(0)	I(16)	R(0)	R(0)	S(22)	R(0)	R(7)	I(16)	R(0)	I(16)	S(25)	R(0)	R(0)	S(24)
CEP75	R(0)	I(16)	R(14)	R(14)	R(0)	S(22)	R(0)	R(14)	R(0)	S(17)	R(0)	R(0)	S(32)	R(0)	S(19)	S(30)
PT15	S(23)	S(19)	S(20)	S(23)	S(21)	S(20)	S20	R(9)	R(13)	R(0)	R(0)	R(0)	S(23)	R(0)	R(0)	S(23)
FLM30	R(0)	S(17)	R(12)	R(7)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(7)	R(12)	R(0)	S(17)	R(12)	R(0)	R(0)	R(0)

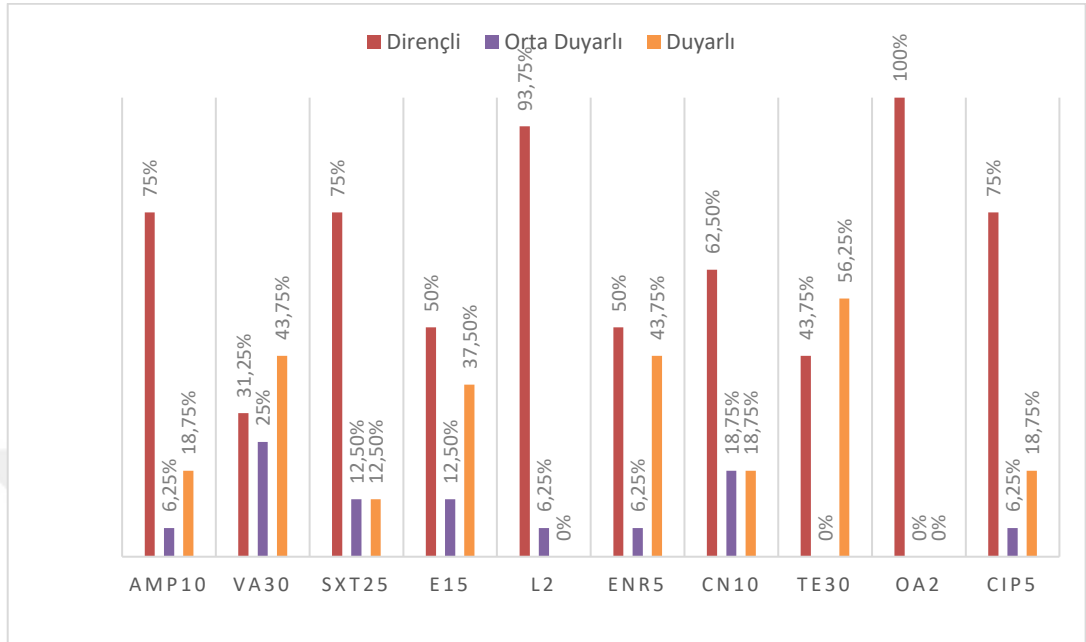
Çizelge 4.3. *L. garvieae* suşlarının disk diffüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları (Devam)

TY15	R(0)	R(0)	R(0)	R(13)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(13)	R(11)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
CRO30	S(21)	S(20)	R(14)	R(13)	R(0)	R(23)	R(28)	R(13)	R(14)	R(11)	R(0)	R(0)	S(35)	R(0)	R(0)	S(30)
SPT100	R(14)	R(0)	R(14)	R(12)	R(0)	R(0)	R(14)	R(12)	R(8)	R(14)	R(0)	S(32)	S(21)	R(0)	R(0)	S(20)
NOR10	R(12)	R(10)	R(0)	R(8)	R(0)	R(0)	R(0)	R(12)	R(0)	R(10)	R(0)	R(0)	R(12)	R(0)	R(0)	I(15)
KF30	I(16)	I(15)	R(0)	R(12)	S(18)	R(0)	R(0)	S(18)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	S(30)	R(0)	R(0)	S(27)
AX25	S(19)	S(20)	S(17)	S(21)	S(20)	R(0)	S(23)	S(23)	R(0)	S(17)	R(0)	R(0)	S(35)	R(0)	R(0)	S(35)
OX1	I(16)	R(0)	R(12)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(14)	R(0)	R(12)	R(0)	I(16)	R(10)	R(0)	R(0)	R(0)
APR15	R(12)	R(0)	R(0)	R(0)	R10	R(13)	R(11)	R(13)	R(0)	R(0)	R(0)	I(16)	R(14)	R(0)	R(0)	I(16)

R: resistant; dirençli, S: sensitive; duyarlı, I: intermediate: orta duyarlı

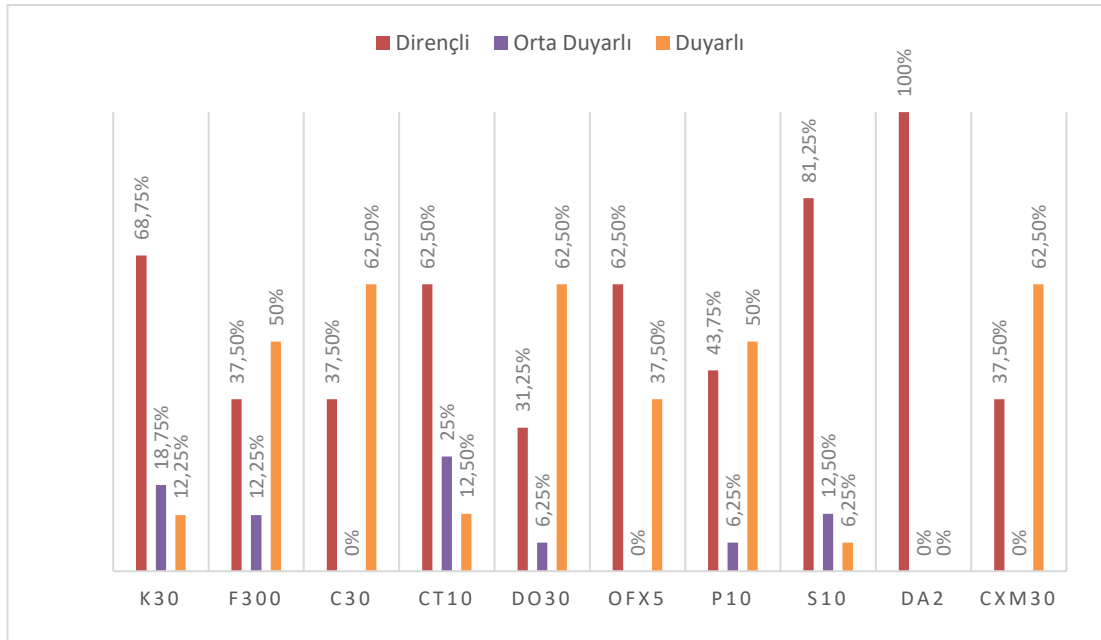
AM10: ampisilin, VA30: vankomisin, SXT25: trimetoprim / sülfometoksazol, E15: eritromisin, L2: lincomisin, ENR5: enrofloksasin, CN10: gentamisin, TE30: tetrasiklin, OA2: oksolinik asit, CIP5: siprofloksasin, K30: kanamisin, F300: nitrofurantoin, C30: kloramfenikol, CT10: kolistin, DO30: doksisisiklin, OFX5: ofloksasin, P10: penisilin, S10: streptomisin, DA2: klindamisin, CXM30: efuroksim, T30: oksitetrasiklin, CEP75: sefoperazon, PT15: pristinamisin, FLM30: flumequin, TY15: tilosin, CRO30: seftriakson, SPT100: spektinomisin, NOR10: norfloksasin, KF30: sefalotin, AX25: amoksisilin, OX1: oksasilin, APR15: apramisin

Çalışmada kullanılan *L. garvieae* suşlarının disk diffüzyon testine göre antibiyotik duyarlılık yüzdeleri Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7’de verilmiştir.



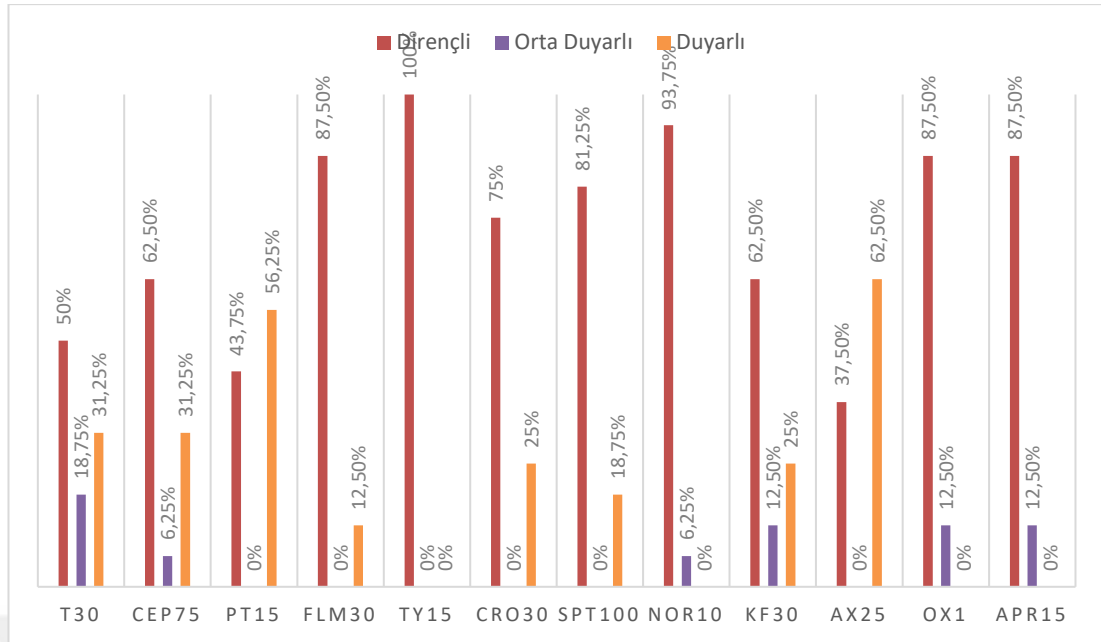
AM10: ampisilin, VA30: vankomisin, SXT25: trimetoprim / sülfometoksazol, E15: eritromisin, L2: lincomisin, ENR5: enrofloksasin, CN10: gentamisin, TE30: tetrasiklin, OA2: oksolinik asit, CIP5: siprofloksasin

Şekil 4.5. *L. garvieae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri



K30: kanamisin, F300: nitrofurantoin, C30: kloramfenikol, CT10: kolistin, DO30: doksisisiklin, OFX5: ofloksasin, P10: penisilin, S10: streptomisin, DA2: klindamisin, CXM30: efuroksim

Şekil 4.6. *L. garvieae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri



T30: oksitetrasiklin, CEP75: sefoperazon, PT15: pristinamisin, FLM30: flumekuın, TY15: tilosin, CRO30: seftriakson, SPT100: spektinomisin, NOR10: norfloksasin, KF30: sefalotin, AX25: amoksisilin, OX1: oksasilin, APR15: apramisin

Şekil 4.7. *L. garvieae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

Özetle çalışma sonucunda antibiyotik duyarlılık yüzdeleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Antibiyotik duyarlılık yüzdeleri

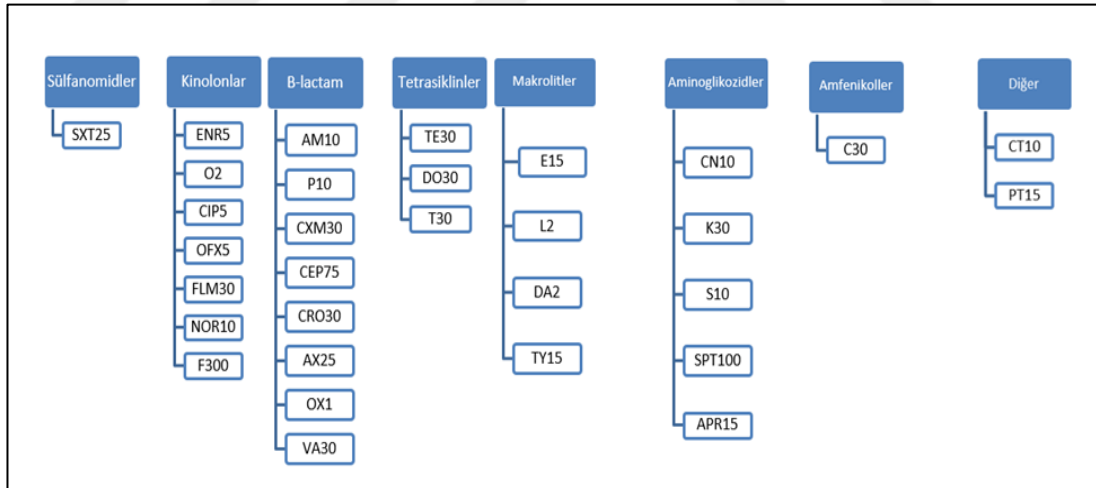
ANTİBİYOTİK	DİRENÇLİLİK (%)	ORTA DUYARLILIK (%)	DUYARLILIK (%)
oksolinik asit	%100	%0	%0
tilosin	%100	%0	%0
klindamisin	%100	%0	%0
linkomisin	%93.75	%6.25	%0
norfloksasin	%93.75	%6.25	%0
flumekuın	%87.5	%0	%12.5
oksasilin	%87.5	%12.5	%0
apramisin	%87.5	%12.5	%0
spektinomisin	%81.25	%0	%18.75
streptomisin	%81.25	%12.5	%6.25
siprofloksasin	%75	%6.25	%18.75
ampisilin	%75	%6.25	%18.75
seftriakson	%75	%0	%25
trimetoprim / sülfometoksazol	%75	%12.5	%12.5
kanamisin	%68.75	%18.75	%12.25
sefoperazon	%62.5	%6.25	%31.25
kolistin	%62.5	%25	%12.5

Çizelge 4.4. Antibiyotik duyarlılık yüzdeleri

ANTİBİYOTİK	DİRENÇLİLİK (%)	ORTA DUYARLILIK (%)	DUYARLILIK (%)
gentamisin	%62.5	%18.75	%18.75
ofloksasin	%62.5	%0	%37.5
sephalothin	%62.5	%12.5	%25
enrofloksasin	%50	%6.25	%43.75
eritromisin	%50	%12.5	%37.5
oksitetrasiklin	%50	%18.75	%31.25
penisilin	%43.75	%6.25	%50
tetrasiklin	%43.75	%0	%56.25
pristinamisin	%43.75	%0	%56.25
kloramfenikol	%37.5	%0	%62.5
amoksisilin	%37.5	%0	%62.5
nitrofurantoin	%37.5	%12.25	%50
efuroksim	%37.5	%0	%62.5
doksisiklin	%31.25	%6.25	%62.5
vankomisin	%31.25	%25	%43.75

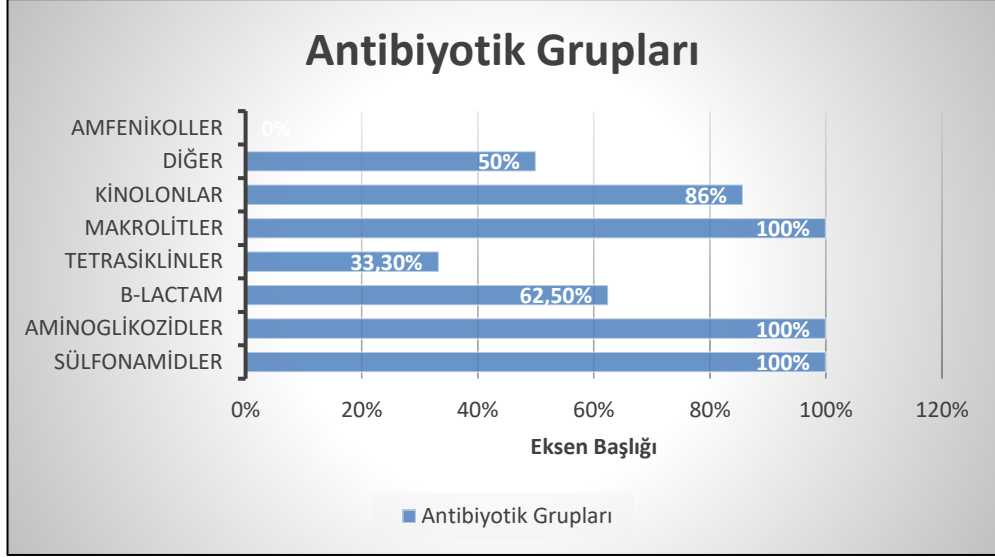
Kullanılan antibiyotik diskleri gruplarına göre Şekil 4.8’de ki gibi sınıflandırılarak değerlendirilmiş ve Şekil 4.9’da gruplarına göre dirençlilik yüzdeleri verilmiştir.

ANTİBİYOTİK GRUPLARI



AM10: ampisilin, VA30: vankomisin, SXT25: trimetoprim / sülfometoksazol, E15: eritromisin, L2: lincomisin, ENR5: enrofloksasin, CN10: gentamisin, TE30: tetrasiklin, OA2: oksolinik asit, CIP5: siprofloksasin, K30: kanamisin, F300: nitrofurantoin, C30: kloramfenikol, CT10: kolistin, DO30: doksisiklin, OFX5: ofloksasin, P10: penisilin, S10: streptomisin, DA2: klindamisin, CXM30: efuroksim, T30: oksitetrasiklin, CEP75: sefoperazon, PT15: pristinamisin, FLM30: flumekuini, TY15: tilosin, CRO30: seftriakson, SPT100: spektinomisin, NOR10: norfloksasin, KF30: sefalotin, AX25: amoksisilin, OX1: oksasilin, APR15: apramisin

Şekil 4.8. Kullanılan antibiyotiklerin sınıflandırılması



Şekil 4.9. Antibiyotik gruplarının direnç yüzdeleri

Suşlar; antibiyotik gruplarından sülfanomidler'e, makrolitler'e, aminoglikozidler'e %100 dirençli, kinolonlar'a %85.7, β -lactam grubuna %62.5, tetrasiklinlere %33.3 ve diğer antibiyotik gruplarına karşı %50 dirençli, amfenikoller'e karşı %100 duyarlıdır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yetiştiricilikte bakteriyel hastalıkların kontrolü için iyi yönetim ve çevresel şartlar önemlidir. Bununla birlikte koruyucu önlemlere de ihtiyaç vardır. Bunlardan birisi de hastalıklara karşı aşılama fakat bazı hastalıklara karşı etkili aşı mevcut değildir. Bu nedenle balık hastalıklarının kontrolünde hala antimikrobiyal bileşenler önemli bir yer tutmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde ilaçların yoğun kullanımı ise balık patojenlerinde antibiyotik direnç yoğunluğunun artmasına neden olmaktadır.

L. garvieae tatlısu ve deniz balıklarında meningocephalitis ve sepsisemiye neden olan aynı zaman da zoonotik, Gram pozitif özellikte bir patojendir (Eldar vd., 1996; Barnes vd., 2002) ve sebep olduğu Streptokokkozis gökkuşığı alabalığı çiftliklerinde önemli bir problemdir. Su sıcaklığının 16°C ve üzerinde olduğu alabalık işletmelerinde *L. garvieae*'nin yaygın olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Yesiltas vd., 2019). Bu hastalık işletmelerde büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır.

Laktokokkozisten korunma için enjeksiyon aşılama kullanımlarına rağmen dört aydan daha uzun süreli bir koruma elde edilemediği bildirilmektedir (Vendrell vd., 2006). Laktokokkozis enfeksiyonunun görülmesi halinde antibiyotik tedavisi gerekmektedir. Ancak sucul ortamda dirençli bakterilerin su ile çevreye ve nihai olarak insanlara yayılma potansiyeli yüksek olmasından dolayı akuatik ortama yönelik antimikrobiyal direnç çalışmalarının önemi artmıştır (Carvalho vd., 2012).

Bu enfeksiyon etmeninin işletmelerde durumunu belirlemek açısından bu çalışma önem arz etmektedir.

Çalışmada, gökkuşığı alabalığından izole edilen 16 *L. garvieae* suşu geleneksel bakteriyolojik yöntemler, API 20 STREP kitleri ile moleküler yöntemler kullanılarak *L. garvieae* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada enfekte gökkuşığı alabalığının dalak, karaciğer ve ön böbreğinden izole edilen *L. garvieae*'nin suşlarının kültürel, biyokimyasal ve fizyolojik karakterleri önceki çalışmalara (Austin ve Austin, 1999; Eldar vd., 1999; Ravelo vd., 2001; Diler vd., 2002; Vendrell vd., 2006; Korun vd., 2018) benzerlik göstermiştir.

PCR çeşitli balık patojenlerinin tanısında yaygın olarak kullanılan bir tespit yöntemidir. *L. garvieae*'nin PCR bazlı tanısında 16S rDNA gen dizisi kullanılmaktadır (Zlotkin vd., 1998). Bu çalışmada, gökkuşacağı alabalığı dalak, karaciğer ve ön böbreğinden izole edilen 16 adet *L. garvieae* suşu önce geleneksel bakteriyolojik yöntemler, API 20 STREP kiti ve 16S rDNA gen dizisi kullanılarak tanılanmıştır.

Şimdiye kadar farklı ülkelerde yapılan çalışmalar *L. garvieae* izolatlarında antimikrobiyal direncin yaygınlaştığını rapor etmişlerdir (Schmidt vd., 2000; Soltani vd., 2008; Nawaz vd., 2011; Raissy ve Ansari, 2011; Altun vd., 2013; Raissy vd., 2015; Türe ve Alp, 2016). Yapılan bir araştırmada; su ürünleri yetiştiriciliğinde son on yıldır yaygın olarak kullanılan florfenikolün, Türkiye'de *L. garvieae* enfeksiyonlarına karşı etkili bir şekilde kullanılabileceğini ifade etmişlerdir (Kayis vd., 2009). Ancak izole edilen *L. garvieae* suşlarının çoğu, gökkuşacağı alabalık yetiştiriciliğinde en yaygın kullanılan streptomisin, sulfametoksazol, trimetoprim / sulfametoksazol, ampisilin ve oksitetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç kazanmıştır. *L. garvieae* izolatlarının enrofloksasin ve nitrofurantoin'e duyarlı, oksalinik asit ve sulfamethoksazol-trimetoprim kombinasyonuna ise dirençli olduğu bildirilmiştir (Ravelo vd., 2001). Laktokokkozis'in tedavisinde yaygın kullanıldığı bilinen eritromisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin ve ampisilin antimikrobiallerine duyarlılığının ise farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (Ravelo vd., 2001). Gerek ülkemizde gerekse farklı ülkelerde yapılan araştırmalarda *L. garvieae* izolatlarının eritromisin, ofloksasin, ampisilin, kloramfenikol'e duyarlı, penisilin ve klindamisin'e ise dirençli olduğu bildirilmiştir (Soltani vd., 2008; Raissy ve Ansari, 2011; Altun vd., 2013; Raissy vd., 2015).

Yapılan çalışmalarda *L. garvieae*'nin amokisillin+clavulanik acid, ampisillin, enrofloksasin vankomisin, tetrasiklin, doksisisiklin, kloramfenikol, eritromisin, nitrofurantoin, cephalotin, amoksilin, sefoperazon, spectinomisin, pristinamisin, kotrimokazol antibiyotiklerine duyarlı, kanamisin, sefuroksime, lincomycin, penicillin, enrofloksasin, ofloxacin, norfloksasin, siprofloksasin seftriakon, klindamisin, oksasillin streptomycin, trimetoprim+ sulfamethoxazole, gentamicin, apramisin, tilosin, colistin, sulfamethizol, oksolinik asit ve flumequin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğunu göstermiştir. (Kubilay vd., 2005; Öztürk vd., 2013; Didinen vd.,

2014, Türe ve Cimakil, 2018) Ampisilin *L. garvieae* suşlarına karşı en aktif antimikrobiyal ajan olarak bildirilmiştir (Türe ve Boran, 2015). Başka bir çalışmada, tüm izolatların gentamisin, linkomisin, neomisin, sülfametoksazol-trimetoprim'e karşı dirençli olduğu, bazı suşların ise amoksisilin, doksisisiklin ve florfenikole karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Altun vd., 2013). Sonuç olarak, antibiyotiklerin rastgele uygulanması *L. garvieae*'nin dirençli suşlarının oluşmasına neden olmuştur. Son yirmi yıldır, farklı antibiyotikler balıklarda Laktokokkozis enfeksiyonlarını kontrol etmede etkili bir yöntem olarak kullanılmıştır (Balta vd., 2019). Bu maddelerin bazılarının *L. garvieae*'ye karşı *in vitro* aktivite göstermiş olmasına rağmen, balıklarda aşırı zayıflık ve dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle saha koşullarında kullanıldığında genellikle etkisiz oldukları bildirilmiştir (Vendrell vd., 2006).

Austin ve Austin (1999)'de *L. garvieae*'nin ampisilin, sefuroksim, sefalotin, kloromfenikol, siprofloksasin, eritromisin, fusidik asit, metisilin, mezlosilin, nitrofurantoin, penisilin, güçlendirilmiş sülfanamit, tetrasiklin ve vankomisine duyarlı, amikasin, kolistin, gentamisin nalidiksik aside karşı dirençli olduğunu bildirmiştir.

Diler vd. (2002)'nin çalışmada, *L. garvieae* suşlarının penisilin, klindamisin, seftriakson gibi antibiyotiklere karşı dirençli, eritromisin, tetrasiklin, ofloksasin, ampisilin ve kloramfenikol gibi antibiyotiklerine duyarlı olduğu saptanmıştır.

Kum vd. (2004), deneysel olarak yaptıkları *L. garvieae* sağültiminde, ampisilin'in eritromisin, oksitetrasiklin ve amaksisilinden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, disk diffüzyon testleri *L. garvieae* suşlarının ampisilin (%75), trimetoprim / sülfametoksazol (%75), eritromisin (%50), lincomisin (%93.75), enrofloksasin (%50), gentamisin (%62.5), oksolinik asit (%100), siprofloksasin (%75), kanamisin (%68.75), kolistin (%62.5), ofloksasin (%62.5), streptomisin (%81.25), klindamisin (%100), oksitetrasiklin (%50), sefoperazon (%62.5), flumekuın (%87.5), tilosin (%100), seftriakson (%75), spektinomisin (%81.25), norfloksasin (%93.75), sefalotin (%62.5) oksasilin (%87.5), apramisin (%87.5)'e karşı dirençli oldukları göstermiştir. *L. garvieae* suşlarının vankomisin (%43.75),

tetrasiklin (%56.25), nitrofurantoin (%50), kloramfenikol (%62.5), doksisisiklin (%62.5), penisilin (%50), efuroksim (%62.5), pristinamisin (%56.25), amoksisilin (%62.25)'e duyarlı oldukları bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada; 16 *L. garvieae* izolatının 32 farklı antibiyotik kullanılarak yapılan antimikrobiyal duyarlılıkları test sonuçları incelendiğinde, suşların antibiyotik duyarlılıklarının farklı olduğu tespit edilmiştir. *L. garvieae* suşlarının; uygulanan 32 antibiyotiğin, 9 tanesine duyarlı olduğu bulunurken 23 tanesine karşı direnç geliştirdiği ve suşlar antibiyotik gruplarından; sülfanomidler'e, makrolitler'e, aminoglikozidler'e %100 dirençli, kinolonlardan (F300) nitrofurantoin dışındaki antibiyotiklere dirençli, β -lactam grubundan; (P10) penisilin, (CXM30) sefuroksim, (AX25) amoksilin dışındaki antibiyotiklere dirençli, tetrasiklinlerden; (T30) oksitetrasiklin'e dirençli, diğer grubundan (CT10) kolistin'e dirençli bulunurken, amfenikollere karşı tüm suşların duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 5.1'de ülkemizde izole edilen *L. garvieae* ile ilgili antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarının karşılaştırılması verilmiştir.

Çizelge 5.1. *L. garvieae* ile ilgili antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarının karşılaştırılması

Antibiyotikler	Diler vd. (2002)	Kav vd. (2008)	Korun vd. (2018)	Balta vd. (2019)	Mevcut Çalışma
AM10,	S	S	S	R	R
VA30		S			S
SXT25	R		S	R	R
E15	S	S	S	R	R
L2	R				R
ENR5	R				R
CN10	R				R
TE30	S		S	S	S
OA2	R		R	S	R
CIP5	R	S			R
K30	R		R		R
F300	S				S
C30	S	S	S		S
CT10	R				R
DO30	S			S	S
OFX5	R				R
P10	R				S

Çizelge 5.1. *L. garvieae* ile ilgili antimikrobiyal duyarlılık çalışmalarının karşılaştırılması (Devam)

Antibiyotikler	Diler vd. (2002)	Kav vd. (2008)	Korun vd. (2018)	Balta vd. (2019)	Mevcut Çalışma
S10	R		R	R	R
DA2	R				R
CXM30	R				S
T30		S	S	R	R
CEP75	S	S			R
PT15	S				S
FLM30	R		R		R
TY15	R				R
CRO30	R				R
SPT100	S				R
NOR10	R				R
KF30	S				R
AX25	S	S		S	S
OX1	R				R
APR15	R				R

R: resistant; dirençli, S: sensitive; duyarlı

AM10: ampicilin, VA30: vankomisin, SXT25: trimetoprim / sülfometoksazol, E15: eritromisin, L2: lincomisin, ENR5: enrofloksasin, CN10: gentamisin, TE30: tetrasiklin, OA2: oksolinik asit, CIP5: siprofloksasin, K30: kanamisin, F300: nitrofurantoin, C30: kloramfenikol, CT10: kolistin, DO30: doksisiklin, OFX5: ofloksasin, P10: penisilin, S10: streptomisin, DA2: klindamisin, CXM30: efuroksim, T30: oksitetrasiklin, CEP75: sefoperazon, PT15: pristinamisin, FLM30: flumekuini, TY15: tilosin, CRO30: seftriakson, SPT100: spektinomisin, NOR10: norfloksasin, KF30: sefalotin, AX25: amoksisilin, OX1: oksasilin, APR15: apramisin

Çizelge 5.1’de görüldüğü gibi 2002 yılından beri ampicilin ve eritromisin’e karşı direnç gözlenmezken, yapılan bu tez çalışmasında *L. garvieae* suşlarının %50’si eritromisine karşı direnç göstermiştir. Balta vd. (2019)’de ampicilin ve eritromisine karşı direnç bildirmişlerdir. Diler vd. (2002), Kav vd. (2008) ve Korun vd. (2018)’in de sefoperazon, spektinomisin, sefalotin antibiyotiklerine karşı direnç gözlemezken, mevcut çalışmada bu antibiyotiklere karşı direnç gelişimi gözlenmiştir. Balta vd., (2019) yaptıkları çalışma ve mevcut çalışmamız da tamamen benzer veriler elde edilmiş sadece direnç yüzdeleri arasında bazı farklılıklar görülmüştür. Bu durumun çalışılan *L. garvieae* suşlarının bölgesel orjinlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmadaki farklı ya da aynı işletmelerden aynı tür olarak tanımlanan suşlar arasında bile antibiyotik direnç yüzde oranlarının farklı olabileceği gözlenmiştir. Bunun nedeninin işletmeye farklı tesislerden gelen balıklar, işletme de kullanılan antibiyotik grubu, antibiyotiğin miktarı, kullanıldığı zaman, kullanım süresi, işletmeye giriş ve çıkış suları etkili olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlarla daha önce yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında, direnç gelişiminde son yıllarda ciddi bir artış gözlenirken, Laktokokkozis tedavisinde yaygın kullanıldığı bilinen antimikrobiallerin direnç profillerinin birçok faktöre bağlı olarak da farklılık gösterebileceği ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak;

- *Lactococcus garvieae* suşlarının (n:16) teşhisinde biyokimyasal testler ve 16S rDNA geni dizisi kullanılarak identifikasyon yapılmıştır.
- Çalışmanın yapıldığı Eşen Çayı havzasında üretim yapan, örnekleme yapılan işletmelerde Ekim, Kasım ve Aralık (2018) döneminde *L. garvieae* patojeni tespit edilmiştir. Bu bağlamda Laktokokkozis 'e karşı koruma-kontrol programlarının oluşturulması önem arz etmektedir.
- *L. garvieae* etmenine bağlı enfeksiyon görülmesi halinde, mutlaka antibiyogram testi yapılarak uygun tedaviye geçilmelidir. Balık hastalıklarında antibakteriyel sağlığının etkenin izolasyonu ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin hızla yapılarak tedavinin erken ve etkili antibiyotikle yapılması gerekmektedir. İlaç dirençliliğini önlemek için gelişmiş güzel antibiyotik kullanımına izin verilmemelidir.
- Gökkuşluğu alabalığı işletmelerinde bakteriyel hastalık etmenlerin çevreye ve insanlara yayılmasının önlenmesi için işletmelerde biyogüvenlik önlemleri olarak hijyen ve profilaktif tedbirlerin alınması ve işletmelerden belirli periyotlarda mikrobiyolojik örnekleme yapılması gerekmektedir.

Bu araştırma ile gökkuşluğu alabalığı *L. garvieae*'nin izolasyonu, klasik mikrobiyolojik ve biyokimyasal testlerle fenotipik tanımlanması ve 16S rDNA gen dizilimi üzerinde moleküler genetik tanımlama yapılmış ve Eşen Çayı Havzası'nda üretim yapan birbirinden uzak 3 işletmede de Laktokokkozis varlığı tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları, *L. garvieae*'nin bazı suşlarında antibiyotiklere karşı direncin arttığını göstermiştir. Laktokokkozis enfeksiyonuna karşı gerekli koruma ve kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir. Antibiyotik kullanılırken hastalık etmeni

patojenin duyarlı olduğu antibiyotik belirlenerek etkili bir tedavi için uygun zaman ve sürede uygulanması sağlanmalıdır. Direnç gelişiminin önlenmesi için işletmelerde direnç tarama çalışmalarının rutin olarak yapılması, tedaviye uygun doz ve sürede antibiyotik kullanılması ve kullanılan antibiyotiklerin kayıt altına alınması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Akçam, F. Z., Gönen, İ., Kaya, O. & Yaylı, G. (2004). Hastane İnfeksiyonu Etkeni Enterobakterilerde Beta-laktam Antibiyotiklere Duyarlılık ve ESBL Sıklığının Araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dergisi*, 11(1), 6-9.
- Altınok, I. (2011). Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout disease. *Diseases of aquatic organisms*, 93(3), 199-206.
- Altun, S., Diler, O. & Adiloğlu, A.K. (2004). Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16S rDNA sequencing. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24, 119-125.
- Altun, S., Onuk, E.E., Ciftci, A., Büyükekiz, A.G. & Duman, M. (2013). Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 19(3), 375-381.
- Anonim (2019). *Su Ürünleri İstatistikleri*. Türkiye İstatistik Kurumu, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id:1005 (Son erişim tarihi: 22 Kasım 2019)
- Arda, M., (1997). *Temel Mikrobiyoloji*. Medisan yayın seri No :25. Ankara. 490s.
- Austin, B. & Austin, D.A. (1999). *Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish Third (Revised) Edition*. Praxis Publishing Chichester, U.K., 457p.
- Austin, B., Austin, D.A. 2007. *Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish*, Praxis Publishing, Fourth Edition. 363p
- Austin, B. (2019). Methods for the diagnosis of bacterial fish diseases. *Marine Life Science & Technology*, 1-9.
- Balta, F. & Balta, Z.D. (2019). The Isolation of *Lactococcus garvieae* from Eyes of Diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with Exophthalmia. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(1), 27-33.
- Barnes, A.C., Guyot, C., Hansen, B.G., Horne, M.T. & Ellis, A.E. (2002). Antibody increases phagocytosis and killing of *Lactococcus garvieae* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) macrophages. *Fish & shellfish immunology*, 12(2), 181-186.
- Bragg, R.R. & Broere, J.S.E. (1986). Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 6, 89-91.
- Brunt, J. & Austin, B. (2005). Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 28(12), 693-701.

- Bercovier, H., Ghittino, C. & Eldar, A. (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Developments in biological standardization*, 90, 153-160.
- Carson, J., Gudkovs, N. & Austin, B. (1993) Characteristic of an Enterococcus-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 16, 381-388.
- Carvalho, T.R. (2012). A new species of *Pseudopaludicola* MirandaRibeiro (Leiuperinae: Leptodactylidae: Anura) from the 252 Carvalho, T.R. et al.: Intraspecific variation and distribution of *Pseudopaludicola giarettai* Cerrado of southeastern Brazil with a distinctive advertisement call pattern. *Zootaxa*, 3328, 47-54.
- Ceschia, G., Girgetti, G., Giavenni, R. & Sarti, M. (1992). A new problem for Italian trout farms: Streptococcosis in rainbow (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 12, 71-72.
- 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45, 45-52.
- Çağırğan, H. & Yürekli Türk, O. (1991). *First isolation of Yersinia ruckeri from rainbow trout in Turkey*. Fifth International Conference, Disease of Fish and Shellfish Book of Abstracts, 131.
- Çağırğan, H. & Tanrıkul, T.T. (1997). *A Lactococcus in a trout farm*. Mediterranean Fisheries Congress. 9-11 April Izmir, Turkey, 40p.
- Daly, J.G. (1999). *Other Bacterial Pathogens*, pp: 577-584, Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Wallingford, Oxon, 0 85199, 194, 7.
- Didinen, B. I., Yardimci, B., Onuk, E., Metin, S. & Yildirim, P. (2014). Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (Walbaum, 1792): new histopathological observations, phenotypic and molecular identification. *Revue Med Vet*, 165(1-2), 12-19.
- 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.
- Doğancı, L. (2001). Antibiyotik Direncinin Sıklığı Üzerine Antibiyotik Kullanımının Etkisi. *Klinik Dergisi*, 14(2), 57-61.

- Dos Santos, N.M.S. (2000). *Development of Immunity in Sea Bass: A study Towards Vaccination Against Pseudotuberculosis*. PhD thesis, Cell Biology and Immunology Group, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University, P.O. Box 338, 6700 AH Wageningen, The Netherlands.
- Duman, M., Saticioglu, I. B., Buyukekiz, A.G., Balta, F. & Altun, S. (2017). Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of atypical *Citrobacter gillenii* and *Citrobacter* sp. isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of global antimicrobial resistance*, 10, 136-142.
- 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.
- Eldar, A., Ghittino, C., Zlotkin, A. & Bercovier, H. (1999) Biodiversity of *Lactococcus garvieae* isolated from fish in Europe, Asia and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1005-1008.
- Eldar, A.C., Ghittino, C., Asanta, L., Bvozzetz, E. & Gorla, M. (1996). *Enterococcus seriolicida* is a Junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Current microbiology*, 32, 85-88.
- Elliott, J.A., Collins, M.D., Pigott, N.E. & Facklam, R.R. (1991). Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Current microbiology*, 32, 85-88.
- Elliott, J.A. & Facklam, R.R., (1996). Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and proposed method to discriminate between them. *Journal of clinical microbiology*, 1296-1298.
- Giuliano, L. (2003). *Bacterial diversity in the Mediterranean and the Black seas: a comparative approach*. International Conference on the Sustainable Development of the Mediterranean and Black Sea Environment, 1-3, Greece.
- Hancı, H., Ayyıldız, A., Baltacı, M.Ö., İgan, H., Uyanık, M.H. & Adıgüzel, A. (2018). *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direncinin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. *Klinik Journal/Klinik Dergisi*, 31(1).
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A. & Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*. Nigth Edition. Williams&Wilkins, 787.
- Karayakar, F. & Ay, Ö. (2006). Mersin Balıkçı Barınağından Yakalanan *Sparus aurata* (Linnaeus 1758)'dan İzole Edilen Enterobacteriaceae Grubu Bakterilerin Bazı III. Kuşak Sefalosporinlere Karşı Plasmid Kökenli Dirençliliğin Saptanması. *Ekoloji*, 15, 59, 32-36.

- Kato, H., Ichinose, E., Yoshioka, F., Takechi, T., Matsunaga, S., Suzuki, K. & Rikitake, N. (1982). Fate of coronary aneurysms in Kawasaki disease: serial coronary angiography and long-term follow-up study. *The American journal of cardiology*, 49(7), 1758-1766.
- Kav, K. & Erganis, O.S.M.A.N. (2008). Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Farms. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52, 223-226.
- Kayis, S., Capkin, E., Fikri, B. and Altinok, I. 2009. Bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Black Sea Region of Turkey a survey. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 61(4), 339- 344.
- Kawanishi, M., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M., Takahashi, T. & Tamura, Y. (2005). Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Letters in applied microbiology*, 40(5), 322-328.
- Kennedy, S. & Oswald, N. (2011). (Eds.). PCR troubleshooting and optimization: the essential guide. Horizon Scientific Press.
- Kim, Y.G. & Lee, K.K. (1994). Isolation Characterisation and Pathogenicity of a Streptococcus Strain in the Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Cultured in Korea. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 14(1), 8.
- Korun, J. & Kurtođlu, M. (2018). Yavru Gökkuşuğı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, W.)'ndan *Lactococcus garvieae*'nin İzolasyonu ve Plazmit Profilleri Üzerine Bir Çalışma. *Journal of Advances in Vet Bio Science and Techniques*, 3(1), 11-22.
- Ksuda, 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, 303-317.
- Kusuda, R., 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.
- Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G. & Diler, Ö. (2005). *Lactococcus garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1(1).
- Kum, C., Gökbulut, C., Akar, F., Kırkan, Ş. & Sekkin, S. (2004). Gökkuşuğı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* izolasyonu ve etkili antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi. *Veteriner Hekimleri Derneđi Dergisi*, 75, 47-53.

- Lundén, T., Lilius, E. M. & Bylund, G. (2002). Respiratory burst activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes is modulated by antimicrobial drugs. *Aquaculture*, 207(3-4), 203-212.
- Mata, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M., Domínguez, L. & Fernández-Garayzábal, J.F. (2004). Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(5), 3183-3187.
- Mazzolini E., Vismara D., Ceschia G., Malvisi J., Fabris A., Passera A., Danielis L., Giorgetti G., *In vitro* activity of several chemiantibiotics against clinical isolates of fresh and marine fish pathogens.
- Munday B.L. (1994) Fish. In: Antimicrobial Prescribing Guidelines for Veterinarians: A Post Graduate Foundation Publication, University of Sydney, Australia (ed. by S.B. Coopert), pp. 305– 325. In association with the National Health and Medical Research Council, Canberra, Australia.
- Mustafa, T.Ü.R.E., & Çimagil, R. (2018). Bilateral exophthalmos: The most important sign of lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 3(2), 91-93.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing) performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Eleventh information Supplement. NCCLS document M100-S11 NCCLS, West Walley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898.USA, 2001.
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K. H., Matsuoka, S., Mori, K. I., Nishioka, T. & Maruyama, K. (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases of aquatic organisms*, 37(1), 33-41.
- Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J. E. & Xu, J. (2011). Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*, 62(3), 1081-1089.doi: 10.1007/s00284-010-9856-2
- Nieto, J.M. Devesa, S., Quiroga, I., Toranzo, A.E. (1995). Pathology of *Enterococcus sp.* Infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L., J. Fish Dis. 18(1), 21-30p.
- Onuk, E.E. & Fındık, A. (2015). Balıklarda Antibiyotik Direnci. *Turkiye Klinikleri Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, 1(2), 35-41.

- Onuk, E.E., Tanrıverdi, Ç.Y., Çoban, A.Y., Çiftci, A., Balta, F., Didinen, B.I. & Altun, S. (2017). Balık ve yetiştirme suyu kökenli *Aeromonas* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64(1), 69-73.
- Raissy, M. & Ansari, M. (2011). Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran fish farms. *African Journal of Biotechnology*, 10(8), 1473-1476.
- Ravelo, C., Magariños, B., Romalde, J.L. & Toranzo, A.E. (2001). Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 21(4), 136-144.
- Raissy, M., & Shahrani, M. (2015). Detection of Tetracycline Resistance Genes in *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Rainbow Trout. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 9(2), 126-129.
- Ravelo, C., Magarinos, B., López-Romalde, S., Toranzo, A.E. & Romalde, J.L. (2003). Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of clinical microbiology*, 41(2), 751-756.
- Salati, F., Tassi, P. & Bronzi, P. (1996). Isolation of an Enterococcus-like bacterium from diseased Adriatic sturgeon, *Acipenser naccarii*, farmed in Italy. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16(3), 96-100.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K. & Larsen, J.L. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(11), 4908-4915.
- Schnick, R. A., Alderman, D. J., Armstrong, R., Le Gouvello, R., Ishihara, S., Lacierda, E. C. & Roth, M. (1997). World wide aquaculture drug and vaccine registration progress. *European Association of Fish Pathologists Bulletin*, 17(6), 251-260.
- Soltani, M., Nikbakht, G., Ebrahimzadeh Moussavi, H.A. & Ahmadzadeh, N. (2008). Epizootic outbreak of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 28(5), 95-106.
- Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, P., Ríaza, A., Nunez, S. & Barja, J.I. (1994). Streptococcosis in Cultured Turbot Caused by Enterococcus-like bacterium. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 14(1), 19-23.

- Türk, N. (2008). *Balık Hastalıkları Konya Semineri*. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü http://bornova.vet.gov.tr/PDF/sunular/Bakteriyel_Hastaliklar.pdf (Son erişim tarihi: 10.01.2010)
- Türe, M. & Alp, H. (2016). Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. *Journal of Veterinary Research*, 60(2), 141-146.
- Vahaboğlu, H. (2004). Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. *Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel*, 2, 92-96.
- Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O. & Múzquiz, J.L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 29(4), 177-198.
- Vendrell, D., Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O. & Múzquiz, J.L. (2008). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 31(4), 337-345.
- Tıraş, B., Yazar, E. & Elmas, M. (2018). *Kemoterapötikler*. Veteriner İlaç Rehberi Tedavi El Kitabı, 86-90.
- Treves-Brown, K.M. (2000). *Applied Fish Pharmacology*, Aquacultures series 3, Kluwer Academic Publishers, 309pp.
- Türe, M. & Boran, H. (2015). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of *Lactococcus sp.* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59(1), 37-42.
- Yesiltas, M.C., Altinok, I., & Ozturk, R.C. (2019). Determination of virulence associated immunogenic proteins in some of *Lactococcus garvieae* strains. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 10, No. 2, p. 101). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. & Bercovier, H. (1998). Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 36(4), 983-985.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sabahat Selmin ÇETİNKAYA

Doğum Yeri ve Yılı : Isparta, 1989

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce, İtalyanca

E-posta : sselminsezgin@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Isparta Anadolu Lisesi, 2008

Lisans : Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Mühendisliği, 2014

Mesleki Deneyim

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (Stajyer) (2013)

Eko Teknik İş Sağlığı ve Güvenliği Çevre Ölçüm Laboratuvarı (ÇARE İSG. LTD. ŞTİ) (2015)

Medplast Sağlık Araç ve Gereçleri Üretim ve Pazarlama A.Ş. (ÇARE İSG. LTD. ŞTİ) (2015-2016)

Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. (2016-2017)

Yayınlar

Meriç, İ., Genç, E. & Sezgin, S.S. (2015). Histopathological Changes In Hepatopancreas Of Carp Due To Tannin Intake. Aquaculture Europe 2015, 20-23 October 2015, Rotterdam, Holland. (Poster sunum)

Yılmaz, M., Arslan, T., Çetinkaya, S.S. & Kubilay A. (2019). "Ören Havzasında Yetiştiriciliği Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Görülen Patojen Bakterilerin Antibiyotik Dirençleri", 3. HASAT Uluslararası Tarım ve Orman Kongresi, ANKARA, TÜRKİYE, 21-23 Haziran 2019, cilt .1, no.1, s.108-108. (Sözlü sunum)