

T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDAN (*Oncorhynchus mykiss*) İZOLE  
EDİLEN *Lactococcus garvieae* İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL  
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

İSMAİL KARATAY

TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. FİKRİ BALTA  
TEZ JÜRİLERİ  
PROF. DR. CEMALETTİN ŞAHİN  
DOÇ. DR. ERTAN EMEK ONUK

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

RİZE-2019

Her Hakkı Saklıdır

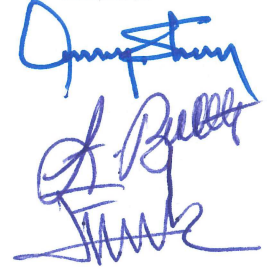
T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

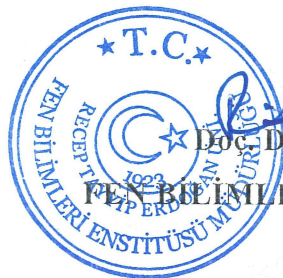
**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDAN (*Oncorhynchus mykiss*) İZOLE EDİLEN  
*Lactococcus garvieae* İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL PROFİLLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Fikri BALTA danışmanlığında, İsmail KARATAY tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 09/08/2019 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı
Başkan	: Prof. Dr. Cemalettin ŞAHİN
Üye	: Prof. Dr. Fikri BALTA
Üye	: Doç. Dr. Ertan Emek ONUK

İmzası





  
Doç. Dr. Ferhat KALAYCI

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

## ÖNSÖZ

Bu araştırma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak üretilmiştir. Bu tez çalışmasının konusu “Gökkuşığı Alabalığından (*Oncorhynchus mykiss*) İzole Edilen *Lactococcus garvieae* İzolatlarının Antimikrobiyal Profillerinin Belirlenmesi” üzerine olup Doğu Karadeniz Bölgesi’nde kültürü yapılan gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde yaz aylarında suyun sıcaklığına bağlı olarak termal stres sonucu ortaya çıkan enfeksiyonlardan izole edilen kok etkenlerinin farklı yöntemler ile tanımlanması yapıldıktan sonra, hastalığın tedavisinde kullanılabilecek antimikrobiyel maddelerin tespiti için disk diffüzyon yöntemi ile antimikrobiyal hassasiyetinin belirlenmesi amaçlanılmıştır.

Kültür balıkçılığında üretimi sınırlandıran en önemli etkenlerden bir hastalık problemleridir. Balıklarda görülen enfeksiyonların çoğunluğunu çevresel şartlara bağlı strese nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Çevresel şartlarda meydana gelen olumsuzluklar özellikle yaz aylarında su sıcaklığında meydana gelen artış sonucu oluşan stres nedeniyle yetiştiriciliği yapılan havuz ve kafes sistemlerinde toplu ölümler çoğunlukla kok enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu da sürdürülebilir üretimde düşüslere neden olmaktadır. Bu çalışmada yaz aylarında kitlesel ölümlere neden olan hastalık etkeni *Lactococcus garvieae* etkeninin varlığı tespit edilmeye çalışılmış ve hastalığın bertaraf edilmesi için uygun antibiyotiklerin kullanılması için antibiyogram testleri yapılmıştır. En etkili olduğu tespit edilen antibiyotikler üreticiye tavsiye edilmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmalarım esnasında yardım ve bilgi birikimini benden esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Fikri BALTA’ya, Zeynep DENGİZ BALTA’ya ve bu süreçte manevi desteklerinden dolayı annem Nuriye KARATAY ve babam Süleyman KARATAY’a teşekkür ederim.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezi Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2014.103.02.3 nolu proje ile desteklenmiştir.

**İsmail KARATAY**

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Gökkuşağı Alabalığından (*Oncorhynchus mykiss*) İzole Edilen *Lactococcus garvieae* İzolatlarının Antimikrobiyal Profillerinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 20/06/2019.



İsmail KARATAY

**Uyarı:** Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDAN (*Oncorhynchus mykiss*) İZOLE EDİLEN *Lactococcus garvieae* İZOLATLARININ ANTİMİKROBİYAL PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

İsmail KARATAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı: Prof. Dr. Fikri BALTA

Bu çalışmada, 2014 Ocak ve 2017 Eylül tarihleri arasında Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki 12 farklı gökkuşağı alabalık çiftliklerinden balıklar toplanmıştır. Hastalıklı gökkuşağı alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) 100 adet bakteri suşu izole edilmiştir. Tüm izolatların tanımlanması geleneksel testler, APİ 20 strep testi ve PZR testi kullanılarak gerçekleştirilerek yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak ATCC 43921 referans suşu kullanılmıştır. APİ 20 strep test sonuçlarına göre izole edilen 100 bakteriden 65 tanesi *Lactococcus garvieae* olduğu belirlenmiştir. PZR testi *L. garvieae* türü için spesifik olan pLG-1 ve pLG-2 referans genleri (16S rRNA) kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, gökkuşağı alabalıklardan izole edilen 100 suştan 68 adet *L. garvieae* olduğu teyit edilmiştir. *Lactococcus garvieae* suşlarına yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre sulfamethoksazol, streptomisin ve sulfametoksazol+trimetoprim'e %100, ampisilin'e % 94.2, oksitetrasiklin %72.5, eritromisin'e % 55.07 ve oksolinik asit % 43.5 dirençli olduğu, fakat enrofloksasin % 26.09, doksisisikline %20,3, amoksiklin ve florfenikol % 8.7 daha az düzeyde direnç tespit edilmiştir. Hastalığın tedavisinde üreticiye antibiyogram test sonuçlarına göre en etkili olan antibiyotiklerden florfenikol amoksiklin ve doksisisiklinden birinin kullanılması önerilmiştir.

2019, 35 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Alabalık, *L. garvieae*'nın tanımlanması, antimikrobiyal hassasiyet.

## ABSTRACT

### ANTIMICROBIAL PROFILES DETERMINATION OF *Lactococcus garvieae* STRAINS ISOLATED FROM RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

İsmail KARATAY

Recep Tayyip Erdogan University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Fisheries  
Master Thesis  
Supervisor: Prof. Dr. Fikri BALTA

In this study, fish were sampled from 12 different fish farms in Eastern Black Sea Region between January 2014 and September 2017. It was isolated hundred bacteria isolates from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). All isolates identification were carried out using conventional tests, API 20 strep tests and PCR tests. ATCC 43921 reference strain was used as a positive control. According to results of the API 20 strep test, it was determined that 65 isolates from 100 bacterial isolates were *Lactococcus garvieae*. The PCR assay was determined using the reference genes pLG-1 and pLG-2 (16S rRNA) specific for the *L. garvieae* species. As a result of the study, it was confirmed that there were 68 *L. garvieae* from 100 strains isolated from rainbow trout. The antibiotic susceptibility test results showed that *L. garvieae* isolates were resistant %100 to streptomycin, sulfamethoxazole and sulfamethoxazole+trimethoprim, 94.2% to ampicillin, 72.5% to oxytetracycline, 55.07% to erythromycin and 43.5% to oxolinic acid, 26.09% to enrofloxacin, % 20.3 doxycycline, 8,7% to amoxicillin and florphenicol. According to the antibiogram test results, one of the most effective antibiotics florfenicol, amoxyciline and doxycycline was recommended to the fish farmers for the treatment of the disease.

**2019, 35 pages**

**Key words:** Rainbow trout, identification of *L. garvieae*, antimicrobial susceptibility.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Balık Hastalıkları.....	1
1.2.1 Bakteriyel Balık Hastalıkları.....	2
1.2.2. Gökkuşığı Alabalığı Çiftliklerinde <i>Lactococcus garvieae</i> Enfeksiyonu.....	3
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	6
2.1. Balık Örnekleri .....	6
2.2. Hastalık Etkenin İzolasyonu.....	6
2.2.1. Gram Boyama Testi.....	8
2.2.2. Oksidaz Testi.....	9
2.2.3. Katalaz Testi.....	9
2.3. Hastalık Etkenin Tanımlanması.....	10
2.4. Bakteri Genomik DNA'ların Elde Edilmesi.....	10
2.5. <i>L. garvieae</i> izolatlarının PZR'la Doğrulanması.....	12
2.6. Disk Diffüzyon Testi.....	13
3. BULGULAR.....	15
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	27
KAYNAKLAR.....	31
ÖZGEÇMİŞ.....	35

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>L. garvieae</i> 'nin api20 strep kitine inokülasyondan hemen sonraki görünümü...	10
Şekil 2. İnhibisyon zon çaplarının dijital kumpasla ölçümü.....	14
Şekil 3. Gökkuşuğu alabalıklarında görülen dış semptomları.....	16
Şekil 4. Hastalıklı balıkların deri, göz ve iç organlarındaki makroskopik semptomlar...	16
Şekil 5. <i>L. garvieae</i> 'nin Gram boyama sonucu mikroskopik görünümü .....	17
Şekil 6. <i>L. garvieae</i> referans suşuna ait api 20 strep kiti biyokimyasal test sonuçları....	20
Şekil 7. <i>L. garvieae</i> 'nin api 20 strep kitine ayıraçlar dökülmeden önceki görünümü....	21
Şekil 8. <i>L. garvieae</i> 'nin api 20 strep kitine ayıraçlar dökülmeden sonraki görünümü...21	
Şekil 9. <i>L. garvieae</i> suşlarına ait PZR ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	22
Şekil 10. <i>L. garvieae</i> suşlarına ait PZR ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	22
Şekil 11. <i>L. garvieae</i> suşlarının farklı antibiyotiklere gösterdiği direnç profili.....	25

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Gökkuşuğı alabalıklarından izole edilen bakteri suşlarına ait menşei bilgileri....	7
<b>Tablo 2.</b> PZR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.....	12
<b>Tablo 3.</b> Kullanılan primerler için uygulanan PZR döngü koşulları.....	13
<b>Tablo 4.</b> Antibiyotik disk konsantrasyonları ve ölçülen inhibisyon zon çapı aralıkları.....	14
<b>Tablo 5.</b> <i>L. garvieae</i> suşlarına ait geleneksel fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları.....	18
<b>Tablo 5.</b> <i>L. garvieae</i> suşlarına ait geleneksel fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları.....	19
<b>Tablo 6.</b> İzolatlara yapılan api 20 strep test kitleri ile yapılan testlerin sonuçlar.....	23
<b>Tablo 6.</b> İzolatlara yapılan api 20 strep test kitleri ile yapılan testlerin sonuçlar.....	24
<b>Tablo 7.</b> <i>L. garvieae</i> suşlarına ait antibiyogram testi hassasiyet profilleri.....	26

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Prof. Dr.	Profesör Doktor
Doç. Dr.	Doçent Doktor
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR	Polymerase Chain Reaction
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ATCC	American Type Culture Collection
AT	Avrupa Topluluğu
kg	Kilogram
vd.,	Ve Diğerleri
PFGE	Pulsed-Field Jel Elektroforez
°C	Santigrat Derece
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
bp	Base Pair (Baz Çifti)
dk.	Dakika
µg	Mikrogram
<i>O. mykiss</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
<i>L. garvieae</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>
<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>V. anguillarum</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
Ref.	Referans

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Ülkemizde nüfus artışına paralel olarak hayvansal protein ihtiyacı her geçen gün artmaktadır. Büyük baş hayvan üretiminin bu talebi karşılayamaması nedeniyle, kanatlı üretimine eğilim artmıştır. Fakat tüketici taleplerindeki eğilimler nedeniyle bu üretiminde protein ihtiyacını tamamen karşılayamadığı bir gerçektir. Ülkemizde özellikle 1980'li yıllardan sonra üreticilerin akuakültüre gönül vermesi, bilimsel araştırmaların artması, akuakültürde sürdürülebilirliği sağlamak için devlet desteği ve tüketici taleplerinin sürekli artması son yıllarda akuakültür sektörünün hızlı büyümesine neden olmuştur. Ülkemizde gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*; *O. mykiss*) kültürü yapılan önemli bir tür olup özellikle iç su balık üretiminin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Ülkemizde 1970'li yıllarda yurtdışından yumurta getirilmesi ile başlayan alabalık üretimi, son yıllarda ülkemiz geneline yayılmış ve sayıları 1000'i aşkın işletme ile devam etmektedir. Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki baraj göllerinde ve denizel ortamda yüzer ağ kafeslerde kış aylarında su sıcaklığının gökkuşacağı alabalıklarının büyümesine uygun olması ile 1-2 kg ağırlığa ulaşan balıklar iç piyasadaki talebi karşılamada büyük önem arz etmektedir. Ayrıca, son 3-5 yıl içinde 2-5 kg ağırlığına ulaştırılan balıklar ile de dış piyasadaki (Japonya, Rusya, AT Ülkeleri ve Bazı Arap ülkeleri vs.) talepler karşılanmaya çalışılmaktadır. Bu büyümeye paralel olarak balıkların metabolitleri ve çevresel kirleticilerin etkileri, yoğun kültür şartlarında içinde yaşayan balıklarda stres faktörü ile birlikte immun sistemin baskılanmasına, dolayısıyla hastalık problemlerini de beraberinde getirmiştir.

### 1.2. Balık Hastalıkları

Balıklar akuatik ortamda yaşayan canlılardır. Akuatik ortamda meydana gelen değişimler, etki eden maddenin miktarına göre balıklarda toplu ölümlere neden olabileceği gibi düşük dozlarda sürekli maruz kalınan durumlarında ise balıkların strese maruz kalmalarına neden olmaktadır. Balıklar içinde buldukları sucul ortamın olumsuz etkilerinden doğal durumlarda kaçarak kurtulurken, yetiştiricilik sistemlerinde (akvaryum, havuz veya kafes) hapis edildiklerinden kirleticilerin etkilerinden kaçıp kurtulamazlar. Bu durum balıklarda çeşitli biyokimyasal maddelerin salgılanmasına neden olmaktadır.

Salgılanan en önemli kimyasal maddelerin başında kortikosteroidler ve kateşolaminler gelmektedir. Bu maddelerin salgılanması (stresin primer etkisi) vücuddaki çeşitli organ ve doku hücrelerine etki ederek birçok biyokimyasal olay (stresin ikincil etkisi) meydana getirmektedir. Buda balıklarda bağışıklık sistemi organları üzerine etki ederek immunosupresyona (immun baskı) neden olarak balıkların hastalanmasına sebep olmaktadır. Bu gibi durumlarda balıklar hastalıklara duyarlı hale gelmektedir. Balıklar, insanlar ve omurgalı hayvanlarda olduğu gibi bakteriyel, viral, praziter ve fungal hastalıklara maruz kalmaktadır. Ayrıca, beslenmeye (amino asit, vitamin ve mineral eksiklikleri) bağlı balık hastalıklarında görülmektedir (Dengiz Balta, 2010).

### 1.2.1. Bakteriyel Balık Hastalıkları

Akuakültürde birim hacimden karı maksimize etmek için havuz ve kafes sistemlerinde balıkların yoğun bir şekilde stoklaması hedeflenilmektedir. Bu durum balıkların beslenmesi için kullanılan yemlerin, yenilmeden havuzun dip kısmında veya kafes dibindeki sedimentte birikmesine, balıkların yoğun yemlenmeye bağlı olarak tam sindirmeden yemleri dışkılanmasına ve diğer metabolitlerin sucul ortamdaki bakterilerin üremesi için uygun ortam hazırlanmasına neden olmaktadır. Akuakültür yapılan ortamın su sıcaklığındaki artış, kafes veya havuzlardaki su sirkülasyonunun yeterli olmaması bakterilerin hızlı bir şekilde üremesine neden olmaktadır. Böyle ortamlardaki balıklarda su sıcaklığına bağlı olarak suyun oksijen değerlerindeki düşüş, suyun pH değerlerindeki artış nedeniyle (alkolozis) veya azalış nedeniyle (asidozis) ani ölümler meydana gelebilmektedir. Bu durum, balık yetiştiriciliği sürdürülebilirliğini etkileyerek büyük ekonomik kayıplara neden olması yüzünden akuakültürdeki verimliliği düşürmektedir. Balıklarda bakteriyel primer patojen olarak *Aeromonas salmonicida* ve *Renibacterium salmoninarum* etkenlerinin hastalık yapmış olduğu bildirilmiştir. Bunların dışındaki bakteriyel balık patojenleri sekonder etkenlerdir ki, çoğunlukla proteolitik kabiliyete sahip, başka bir hastalığın (parazit, mantar, virüs vs) varlığında balıkta hastalığa neden olabilen bakterilerdir. Proteolitik heterotrof bakteriler, ölmek üzere olan balıklara hücum eden ve bazı balıklara çok miktarda enjekte edildiğinde konakçıda ölümlere sebep olan bakterilerdir. Balığın içerisinde yaşadığı akuatik ortam hemen hemen her türlü mikroorganizmayı içinde barındırdığı, çeşitli faktörlere bağlı balıklarda meydana gelen

stresle birlikte fakültatif veya oportunistik patojenlerin balıklarda hastalık salgınlarının ortaya çıkmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Sindermann, 1990).

### 1.2.2. Gökkuşığı Alabalığı Çiftliklerinde *Lactococcus garvieae* Enfeksiyonu

Dünyada ve ülkemizde son yıllarda özellikle su sıcaklığının yükseldiği yaz aylarında balıklarda kok enfeksiyonunun hastalık oluşturduğu ve kitlesel ölümlere neden olduğu çeşitli kaynaklarda rapor edilmiştir. Hastalık ilk defa 1974 yılında Japonya’da kültürü yapılan sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiat*) balıklarında en önemli hastalık etkenlerinden biri olarak bildirilmiştir (Kusuda vd., 1991; Çağırğan ve Tanrıkul, 1997; Kusuda ve Salati, 1999). Balıklarda kok hastalığı etkeni olan *Lactococcus garvieae* (=Synonim *Enterococcus seriolicida*)’nın neden olduğu enfeksiyonlar (Streptococcosis veya Lactococcosis) dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki tatlı su ve tuzlu su deniz balık türlerinde yaygın olarak hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir (Toranzo vd., 1994; Elder ve Ghittino, 1999; Muzquiz vd., 1999; Chen vd., 2001). *Lactococcus garvieae* (*L. garvieae*) enfeksiyonunun İspanya, İtalya, Portekiz, İngiltere, Fransa, Avustralya, Güney Afrika ve Asya ülkelerindeki gökkuşığı alabalığı (*O. mykiss*) çiftliklerinde görüldüğü rapor edilmiştir (Çağırğan ve Tanrıkul, 1997; Elder ve Ghittino, 1999; Chang vd., 2002; Çağırğan, 2004; Türe vd., 2012). Hastalık etkenin zoonoz karakter gösterdiği ve insanlardaki çeşitli hastalık vakalarından izole edildiği bildirilmiştir (Zlotkin vd., 1998; James vd., 2000; Mofredj vd., 2000; Vela vd., 2000; Yiu vd., 2007). Önceden *Streptococcus garvieae* olarak tanımlanan *L. garvieae*, orjinelinde İngilterede mastitisli ineklerden izole edilmiştir (Collins vd., 1983). İnsanlarda *L. garvieae* ile enfekte çiğ balık tüketilmesiyle sporadik vakalar rapor edilmiştir (Wang vd., 2007). Streptococcosis enfeksiyonlarının ülkemizde ise 2001 yılında Ege Bölgesindeki gökkuşığı alabalığı işletmelerinde ortaya çıktığı ve yüksek mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir (Çağırğan ve Tanrıkul, 1997; Diler vd., 2002; Altun vd., 2004). Ülkemizde gökkuşığı alabalığı işletmelerinde son yıllarda ortaya çıkan *L. garvieae* enfeksiyonları hızlı bir yayılım göstermiş ve büyük ekonomik kayıplara neden olmuştur. Bölgemizde, özellikle yaz aylarında su sıcaklığındaki artışı ile birlikte dere ve baraj göllerinde kültürü yapılan her boy gökkuşığı alabalıklarında kok (*L. garvieae*) enfeksiyonlarına rastlanılmaktadır (Türe vd., 2012; Balta, 2017; Balta ve Dengiz Balta, 2018; Balta ve Dengiz Balta, 2019). Bu araştırma ile hastalık etkeninin izolasyonu, idendifikasyonu, antimikrobiyel hassasiyet testi

ve kontamine çiftliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hastalık etkeni olan bakterinin tanımlamasında klasik biyokimyasal testler yanı sıra API 20 strep kitleri ve PZR test ile tanımlanması planlanmıştır.

Ülkemizde kültürü yapılan gökkuşağı alabalık yavru ve porsiyonluk boydaki balıklarda özellikle su sıcaklığına bağlı olarak yaz aylarında ortaya çıkan ve toplu ölümlere neden olan kok enfeksiyonu etkeni *L. garvieae*, yüksek su sıcaklığı yanı sıra yoğun stoklama, düşük su kalitesi (pH, amonyak, nitrit, vs) ve strese bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bazı enfeksiyonlarda yoğun stoklamaya ve suyun organik yüküne bağlı olarak %90'a varan ölümler nedeni ile büyük ekonomik kayıplar görülmektedir. Gökkuşağı alabalığı çiftliklerindeki hastalık vakalarından %5 koyun kanı ilave edilmiş Kanlı Agarda izole edilen izolatlar API strep test kitleri ile biyokimyasal testleri yapılmıştır. PZR metodu ile doğruluğu teyit edilmiştir. Hangi çiftliklerin kok enfeksiyonu yönünden kontamine olduğu bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışmasında, 6 aylık proje süresince Trabzon, Rize, Artvin, Gümüşhane, Ordu, Sivas ve Erzurum il sınırları içerisinde bulunan gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde her boy balıklarda hastalık etkeni izole edilmiştir. İzole edilen etkenlerinin kok etkeni olan *L. garvieae* olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Enfeksiyonun patlak verdiği çiftliklerde balıkların tedavisi ve meydana gelen ölümleri durdurularak ekonomik kayıpların asgari ölçüde tutulması için antibiyogram testleri yapılmıştır. Antibiyogram test sonucuna göre tedavide kullanılması gereken antibiyotikler belirlenmiştir. Bununla birlikte bölgedeki çiftliklerde kok enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı ne ölçüde direnç gelişip gelişmediği tespit edilmiştir. Bu tez çalışması ile birlikte Trabzon, Rize, Artvin, Gümüşhane, Ordu ve Erzurum il sınırları içerisindeki alabalık çiftliklerindeki kültürü yapılan her boy gökkuşağı alabalıklarının 6 aylık süre içerisinde meydana gelen kok enfeksiyonlarının varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır.

Ülkemizde bu güne kadar; Kubilay vd. (2005), *L. garvieae* suşlarında antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi, Türe vd. (2012), Pulsed-Field Jel Elektroferez (PFGE) metodu kullanılarak *L. garvieae*'nin genetik çeşitliliğinin ve yayılımının belirlenmesi, Öztürk vd., (26) Orta Karadeniz Bölgesinde gökkuşağı alabalıklarında antimikrobiyal hassasiyeti ve hastalık etkenini, Türe vd. (2012), Doğu Karadeniz Bölgesindeki gökkuşağı

alabalıklarında *L. garvieae* etkeni ve antimikrobiyal duyarlılığı, Çağırğan (2004), Türkiye’den izole edilen *L. garvieae*’ların biyotiplendirilmesi, Kav ve Erganiş, (2007) ise Konya Bölgesinde bulunan gökkuşacağı alabalığı (*O. mykiss*) çiftliklerinden *L. garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi, Akşit ve Kum, (2008) gökkuşacağı alabalıklarında sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi gibi çalışmaların yapılmış olmasına rağmen hastalık etkeninin antibiyotiklere karşı çok çabuk direnç kazanması ve hızlı yayılım göstermesi nedeniyle yeni araştırmaların yapılmasını zorunlu hale getirmektedir.

Kok enfeksiyonunun tedavisinde en etkili ve ucuz olan antibiyotiğin belirlenebilmesi için antibiyogram test sonuçlarının yapılması ve bu sonuçlara göre uygun kemoterapotik maddelerin kullanılmasının önerilmesi gereklidir. Eğer hastalık etkeni erken teşhis edilip uygun tedavi yapılmaz, gerekli önlemler alınmaz ve doğru antibiyotik etkin dozda kullanılmaz ise dirençli suşlar ortaya çıkabilir ve buna bağlı olarak büyük ekonomik kayıplar görülebilir. Kok etkeninin balıklarda hastalık oluşturması yanı sıra süt ineklerinde mastitiste neden olduğu bildirilmiş ve kontamine çiğ balık et yemekle insanlarda *L. garvieae*’nın enfeksiyon yaptığı özellikle kemik dokuda ve kalp gibi organlarda hastalık oluşturmasının bildirilmesi patojenin önemini bir kez daha ön plana çıkarmaktadır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Balık Örnekleri

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde karasal havuzlarda ve baraj göllerinde yüzer ağ kafeslerde yetiştiriciliği yapılan 12 farklı gökkuşuğu alabalığı işletmesinden 2012-2017 yılları arasında toplandı. Örneklemeler su sıcaklığının 18°C'nin üzerine çıktığı yaz aylarında haftalık peryotlar halinde yapıldı. Örneklemeler esnasında makroskopik olarak özellikle renkte kararma ve ekzofthalmus gibi semptomlar gösteren balıkların seçilmesine özen gösterildi. Her bir örneklemeler esnasında hastalık olan havuzlardan 5'er adet balık alındı. Bir örneklemede bir çiftlikten en az 10 balık ayda 4 örnekleme yapıldı (12x10x4=480 balık) yapıldı. Balıklar 2-phenoxy ethanol ile derin anestezi altında alınmış ve soğuk zincir altında 8-12 saat içinde laboratuvara getirildi. Yapılan nekropski sonucunda bağırsakların boylu boyuna hemorajik olması, yine hava kesesi üzerinde yaygın kanamaların bulunması, karaciğerde farklı derecede görülen renk değişimleri, karaciğer ve plorik çekumda görülen peteşiyel kanamalar balıklarda kok enfeksiyonu olabileceğini gösteren bulgular olarak kayıt altına alındı. Bununla birlikte işletmelerde görülen mortalite oranları ve tedavi süresince uygulanmış olan protokoller kayıt edildi.

### 2.2. Hastalık Etkenin İzolasyonu

Nekropski sonrası balıkların böreğinden alınan örnekler lam üzerinde bir damla steril FTS ile karıştırılarak mikroskop altında 40'luk objektif altında incelendi. Hareketsiz ve kok olarak görülen bakteriler Gram boyama yöntemiyle boyandı. Boyanan preparatlar kurutulup üzerine bir damla immersiyan yağı damlatıldıktan sonra 100'lük objektifte muayene edildi. Mikroskopik bakıda tek, ikili ve kısa zincirler (5-7 kok) halinde mor rekte Gram pozitif olan bakterilerin *L. garvieae* olabileceği düşünüldü. Doğu Karadeniz Bölgesindeki kültürü yapılan gökkuşuğu alabalık işletmelerinden yapılan örneklemelerin bulunduğu yer (şehir), örneklemenin yapıldığı tarih, izole edilen organa (orjin) ve hastalıklı gökkuşuğu alabalıkların farklı organlarından izole edilen herbir izolata ait ait bilgilere için verilen kodlar Tablo 1'de verildi.

**Tablo 1.** Gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen bakteriyel izolatlarla ait bilgiler.

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

İK: İzolat kodu, Ref.: *L. garviae* (ATCC 43921) referans suş (Collins et.al 1984/Schleifer et. al. 1986).

Yapılan mikroskopik muayene sonuçlarına göre balıkların özellikle böbrek ve dalak ve nadiren karaciğerlerinden ve eğer mevcutsa deri lezyonlarından Tryptone Soy Agara

(TSA) ve Broth (TSB), Brain Heart İnfusion Agar (BHIA) ve Broth (BHIB)'a steril bir öze yardımcı ile ekimler yapıldı. Ayrıca, bu çalışma kapsamında ilk kez intraokuler kanama ve ekzoftalmus semptomu gösteren ve bütünlüğünü koruyan (patlamamış) gözler önce alkol sonra alev yardımcı ile steril edildikten sonra öze veya steril swap yardımcı ile göz içi sıvısından TSB'a ve TSA'ya aseptik olarak ekimler yapıldı. Bu besi yerleri  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  soğutmalı etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. TSA'da 24 ve 48 saat sonunda üreyen küçük beyaz kolonilerin değerlendirilmeye alındı. Bu amaçla izole edilen bakterilere hareket muayenesi, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapıldı. Hareketsiz, Gram pozitif, katalaz ve oksidaz testi negatif olan izolatlar seçildi. Bu çalışma esnasında izole edilen 100 bakteri izolatları TSA'da saf kültürler halinde üretildi. Bakterilere yapılan hareket muayenesinde hareketsiz, katalaz ve oksidaz testi negatif olan Gram boyamada mikroskopik sahada tek, ikili ve kısa zincir tarzında mor renkte olan toplam 65 adet izolatı bu çalışmada kullanılmak üzere belirlendi. Bu izolatların TSB'deki taze kültürleri sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere %20 gliserol içeren 1,5 ml'lik epondorf tüplerde 1 ml hacimde homojenize edildikten sonra etiketlenerek  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda stoklandı.

### **2.2.1. Gram Boyama Testi**

Mikroorganizmaların anatomik yapısı gereği Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan ve lipopolisakkarit yapısının farklı miktarlarda bulundurması nedeniyle Gram boyama testi bakterileri ayırt etmek amacıyla yapıldı. Gram boyama testi, TSA'da üreyen 24 saatlik saf kolonilerden örnek alınarak yapıldı. Bu amaçla; temiz bir lam üzerine steril bir öze yardımcıyla bir loop steril %0,85'lik fizyolojik tuzlu su (FTS) konulmuş ve TSA'da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden steril bir öze yardımcıyla alınarak lam üzerindeki FTS ile karıştırıldı. Hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında kurutulmuş ve kuruyan preparat alev üzerinden üç kez geçirilmekle fiske edildi.

Hazırlanan preparatın soğuması beklendikten sonra üzerine sırasıyla; kristal viyole solüsyonu damlatıldı ve bir dakika bekletildikten sonra saf sudan geçirildi. Hemen ardından lügol solüsyonu damlatıldı ve bir dakika bekletildikten sonra tekrar saf sudan geçirildi. Daha sonra absolut alkolde dekolere edildi ve sonrasında saf sudan geçirildi. En son safran solüsyonu damlatıldı ve bir dakika bekletildikten sonra saf sudan geçirilerek kurutmaya

bırakıldı. Bu işlemden önemli olan basamaklardan biri de kimyasalların hazırlanan preparattaki örneklerin her yerine eşit olarak dağıtılmasıdır. Kuruyan örnekler ışık mikroskobu altında immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifde incelendi ve sonuçlar kaydedildi. Gram boyama testinde kullanılan solüsyonlar ticari bir firmadan gram boyama kiti (bioMérieux, Fransa) olarak satın alındı. Test sonuçlarına ait veriler Tablo 7'da gösterildi.

### **2.2.2. Oksidaz Testi**

Oksidaz testi mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intraselüler olan oksidaz enziminin (sitokrom-C-oksidad) varlığını ortaya koymak için kullanılmaktadır. Testte önce beyaz filtre kâğıdı üzerine oksidaz ayracı (bioMérieux, Fransa) damlatıldı. Daha sonra TSA'da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden steril pasteur pipeti yardımıyla bir miktar taze kültürden alınarak filtre kağıdına yayılarak test sonuçları değerlendirildi. Renk değişimi görülmeyen koloniler negatif, 5-10 sn içerisinde mavi renk oluşturduğu saptanan kolonilerin test sonuçları pozitif olarak değerlendirildi. Uygulamadan 10 sn'den sonra oluşan renk değişimi negatif olarak değerlendirildi. Test sonucunda negatif olan izolatların izolat numaraları kayıt edildi ve oksidaz testi negatif olanlar izolatlar Tablo 6'da verildi.

### **2.2.3. Katalaz Testi**

Katalaz testi mikroorganizmalar tarafından sentezlenen katalaz enzimini (Hidrojen peroksit oksidoredüktaz) saptamak amacıyla yapılmaktadır. Katalaz enzimi sahip olan bakteriler hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ), su ( $H_2O$ ) ve serbest oksijene ( $O_2$ ) ayırabilmektedirler.

Bu test temiz bir lam üzerine bir damla %3'lük  $H_2O_2$  damlatıldıktan sonra TSA'da saf olarak üreyen taze kültürdeki kolonilerinden steril pasteur pipeti yardımıyla bir miktar alınan bakteri %3'lük  $H_2O_2$  karıştırıldı. Bu işlem sonucunda serbest kalan oksijenin ( $O_2$  gazı) kabarcık oluşturması bakterinin katalaz enzimine sahip olduğunu ve dolayısıyla katalaz testinin pozitif olduğunu göstergesi olarak kabul edildi. Kabarcık oluşumunun görülmemesi durumunda test negatif olarak değerlendirildi. Test sonucunda  $O_2$  gazı oluşturmayan izolatlar için katalaz testi negatif olarak değerlendirildi kabarcık oluşup oluşmamasına göre değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 6'de verilmiştir.

### 2.3. Hastalık Etkenin Tanımlanması

Daha önceden izole edilip  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de stoklanan izolatların hepsi çıkarılıp önce TSB'de tekrar canlandırıldı. Bu izolatlar TSA'ya ekilerek saflık kontrolleri yapıldı. Kontamine olanlar suşlar saflaştırıldı. Saflaştırıldıktan sonra suşların hepsi hareket, gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapıldıktan sonra %5 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agara geçildi. Kanlı agara ekimler yapıldı ve  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İzolatlarının kanlı agarda alfa hemoliz oluşturup oluşturmadıkları kontrol edildi. Kanlı agarda üreyen bakteriler APİ 20 strep test kitlerine (bioMérieux, Fransa) talimatlara uygun olarak inoküle edildi ve  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de soğutmalı inkübatörde 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. APİ 20 strep test kitlerine 24 saat sonunda ayıraç dökülerek değerlendirme yapıldı. Şeker testleri için 48 saat sonunda son okuma yapılarak izolatların ait biyokimyasal testlerin sonuçları değerlendirildi. İnokulasyondan hemen sonraki APİ 20 strep test kitlerine ait resimlerin görünümü Şekil 1'de verildi.



Şekil 1. *L. garvieae*'nin APİ 20 strep kitine inokülasyonundan hemen sonraki görünümü.

### 2.4. Bakteri Genomik DNA'ların Elde Edilmesi

Gökkuşığı alabalıklarından izole edilen bakteri izolatların DNA'sını ekstrakte etmek için TSA'daki saf kolonilerden steril 3 ml TSB'ye ekim yapıldı. Bakterilerin üremesi için besiyerleri  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de soğutmalı inkübatörde 18 saat inkübe edildi.

### *Pelet hücreler;*

Üreyen bakteriler 1,5 ml eppendorf tüpe aktarıldı ve 16000 x g'de 3 dk. santrafuj edildi ve bakteriler çöktürülerek pelet hücreler elde edildi. Bu işlem tekrarlanarak bakterilerin tamamı çöktürülerek pelet haline getirildi. Bakterilerin DNA'sı promega mini genomik DNA saflaştırma kiti kullanılarak talimata uygun olarak çıkartıldı.

### *Hücre duvarının eritilmesi;*

1. Pelet haline getirilen bakteri hücrelerinin üzerine 480 µl 50 mM EDTA ilave edilerek pipetle karıştırılarak homojenize edildi.
2. Önceden 100 örnek için hazırlanmış ve -20°C'de stoklanan litik enzimden (lizozim) 120 µl ilave edilerek nazikçe karıştırıldı.
3. Eppendorf tüpler 37 °C'de 45 dk. (30-60 dk.) inkübasyona bırakıldı.
4. Örnekler 16000 x g'de 3 dk. santrifuj edildi ve süpernatnat döküldü. Sonra hücreleri parçalama aşamasına geçildi.

### *Hücreleri parçalaması;*

1. Pelet üzerine 600 µl Nuclei Lisis solüsyonu ilave edildi. Pipetle nazik bir şekilde karıştırıldı.
2. Eppendorf tüpler 80 °C'de 5 dk. inkübe edildi. Daha sonra oda sıcaklığına soğutuldu.
3. Her bir tüpe 3 µl RNase solüsyonu eklendi ve karıştırıldı, 37 °C'de 30 dk. (15-60 dk.) inkübe edildi. Daha sonra oda sıcaklığına soğutuldu.

### *Proteinleri çöktürme;*

4. Tüplere 200 µl protein presipitasyon solüsyonu ilave edildi. Sonrasında 10-20 sn vortekslendi.
5. Tüpler 5 dk. için buzda inkübe edildi.
6. Örnekler 16000 x g'de 3 dk. santrifuj edildi (sıvı kısımda DNA var)

## DNA 'yı çöktürme ve rehidrasyon;

7. Süpernatant temiz tüplere aktarıldı ve üzerine oda sıcaklığında 600 µl isopropanol ilave edilip karıştırıldı.
8. Örnekler 16000 x g'de 3 dk. santrifüj edildi ve süpernatant dikkatlice boşaltıldı.
9. Tüplere oda sıcaklığında 600 µl %70 etanol ilave edilip karıştırıldı.
10. Eppendorf tüpler 16000 x g'de 3 dk. santrifüj edildi.
11. Etanol döküldü ve 37 °C'de 15 dk. etüvde kurutuldu.
12. DNA peleti 100 µl rehidrasyon solüsyon içinde 4°C'de bir gece çözündürüldü.
11. Elde edilen DNA örnekleri tekrar kullanılcaya kadar -20 °C'de saklandı.

## 2.5. *Lactococcus garvieae* İzolatlarının PZR'la Doğrulanması

*L. garvieae* suşlarının tanımlanmasında 16S rRNA geninden yararlanıldı. Bu amaçla izolatların moleküler identifikasyonunda *L. garvieae* oligonukleotid primerleri ile pLG-1 (5'-CATAACAATGAGAATCGC-3') ve pLG-2 (5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3') *L. garvieae* için spesifik olan primerler kullanıldı (Zlotkin vd., 1998). Bu çalışmanın ilk basamağında yapılan klasik geneleksen yöntem ve APİ 20 strep test kitleri kullanılarak tanımlanmaya çalışılan tüm izolatların *L. garvieae* olup olmadığının doğrulanması amacıyla yukarıda belirtilen primerler yardımıyla PZR testleri yapıldı. Bu test sonucunda 1100 bp büyüklüğünde PZR ürününün görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi. PZR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları ait bilgiler Tablo 2'de verildi. Primerlerin erime sıcaklığının (T<sub>m</sub>) önceden yapılan benzer çalışmalar değerlendirildi ve erime sıcaklığı 46 °C olarak belirlendi. Bu çalışmada da aynı bağlanma sıcaklığı kullanıldı. Bu çalışmada uygulanan PZR döngü koşullarına ait bilgiler Tablo 3'de verildi.

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

Kimyasallar	Konsantrasyon	16S rRNA
5X Go Taq Buffer		5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µl
dNTP karışımı	10 mM	4 µl
Primer R	10 pmol	0,5 µl
Primer F	10 pmol	0,5 µl
Total DNA	50 (ng/ml)	2 µl
Taq DNA Polimeraz	5 (U/µl)	0,25 µl
ddH <sub>2</sub> O		9,75 µl
Toplam		25 µl

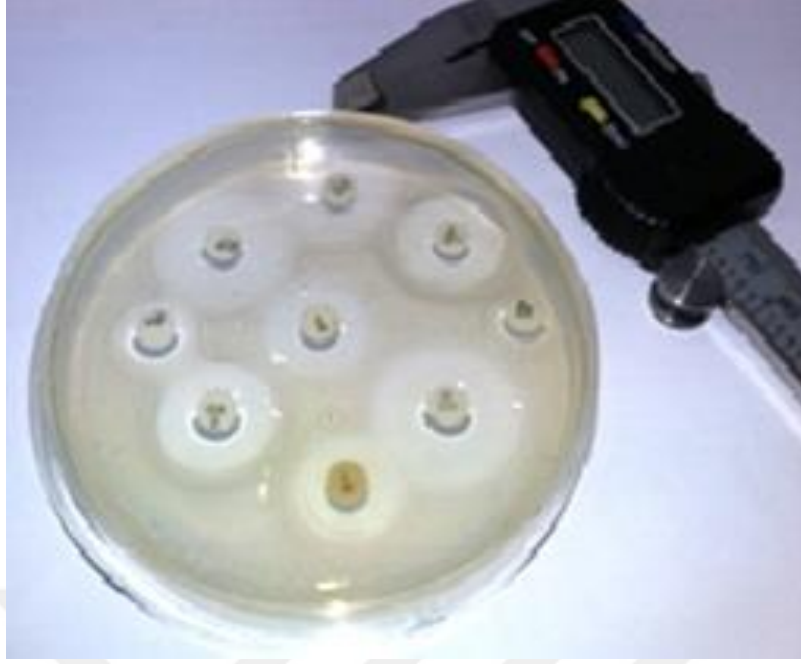
**Tablo 3.** Kullanılan primerler için uygulanan PZR döngü koşulları

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

PZR ürünleri etidiyum bromit içeren % 1'lik agaroz jelde yürütüldü ve sonra UV transillüminatör kullanılarak görüntüledi. Bu nedenle PZR ürünleri 100-3000 bp'lik DNA Leader (Promega) ile belirlendi. *L. garvieae* ATCC 43921 referans suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı. *Aeromonas hydrophila* ve *Vibrio anguillarum* genomik DNA'ları ise negatif kontrol olarak kullanıldı.

## 2.6. Disk Difüzyon Testi

Kok enfeksiyonlarından izole edilen ve TSA'da saf olarak üretilen *L. garvieae* izolatlarının 24 saatlik taze kültürlerinden steril bir öze yardımı ile alınan bir miktar bakteri % 0,85 NaCl içeren 2 ml'lik burgu kapaklı tüplerde McFarland No: 0,5 bulanıklığında vorteks yardımı ile homojenize edilerek ayarlandı. Bu bakteri süspansiyonundan 0,1 ml alınarak 35°C'deki etüvde 30 dk. bekletilerek nemi alınmış Müller Hilton agar'ın (MHA) üzerine yayma tarzında inoküle edildi ve sonrası agar üzerine dispenser yardımı ile antibiyotik diskleri yerleştirildi. Sonrasında petri kutuları 25°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çapları dijital kumpas yardımı ile ölçüldü. Müller Hilton agarda oluşan zon çaplarına ait sonuç Şekil 2'de verildi. Antibiyogram test sonuçları Tablo 4'de verilen standart inhibisyon zon çapı aralıkları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. (NCCLS, 1997)



**Şekil 2.** İnhibisyon zon çaplarının dijital kumpasla ölçümü.

Antimikrobiyal hassasiyet deneyleri National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997) ölçütlerine uygun olarak standart disk difüzyon yöntemi ile yapıldı ve değerlendirildi. Bu tez çalışmasında, Ampisilin (10 µg), Oksitetrasiklin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Sulfadiazin-Trimetoprim (25 µg), Eritromisin (15 µg), Sulfametoksazol (25 µg), Enrofloksasin (5 µg), Florfenikol (30 µg), Oksolinik Asit (2 µg), Amoksiklin (10 µg) ve Streptomisin (10 µg) antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Türkiye) kullanıldı.

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

Antimikrobiyel ajanlar	Disk Konsantrasyonu	Standart inhibisyon zon çapı (mm)			Referanslar
		D	O	H	
Tetrasiklin	T-30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	NCCLS (1997)
Oksolinik asit	OA-2 µg	≤ 10	11-12	≥ 13	NCCLS (1997)
Sülfametoksazol	SMZ 100 µg	≤ 12	13-16	≥ 17	NCCLS (1997)
Ampisilin	AM-10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17	NCCLS (1997)
Amoksisilin	AX	≤13	14-17	≥18	NCCLS (1997)
Florfenicol	FFC-30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	NCCLS (1997)
Streptomisin	S-10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15	NCCLS (1997)
Enrofloksasin	ENR-5 µg	≤ 16	17-20	≥ 21	NCCLS (1997)
Eritromisin	E-15 µg	≤ 13	14-22	≥ 23	NCCLS (1997)
Trimethoprim+Sulfamethaksazol	SXT-25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16	NCCLS (1997)

T: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik asit, SMZ: Sulfamethoksazol, AM: Ampisillin, FFC: Florfenikol, S: Streptomisin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, SXT: Trimethoprim+Sulfamethaksazol.  
D: Dirençli, O: Orta hassas, H: Hassas.

### 3. BULGULAR

Doğu Karadeniz Bölgesindeki Trabzon, Rize, Artvin, Gümüşhane, Ordu, Sivas ve Erzurum illerindeki 12 farklı gökkuşağı alabalığı çiftliklerindeki karasal havuzlardan ve baraj göllerinde yüzer ağ kafeslerdeki hastalıklı balıklardan mevsimlik örneklemeler sonucu toplam 100 izolat elde edildi. Bu 100 izolattan geleneksel biyokimyasal test (Gram pozitif, katalaz ve oksidaz testi negatif) sonuçlarına göre 65 izolata API 20 strep testi yapıldı ve referans suş ile karşılaştırılarak *L. garvieae* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların değerlendirilmesinde *L. garvieae* ATCC 43921 referans suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu çalışmadaki bulgular aşağıdaki başlıklar altında toplanmıştır.

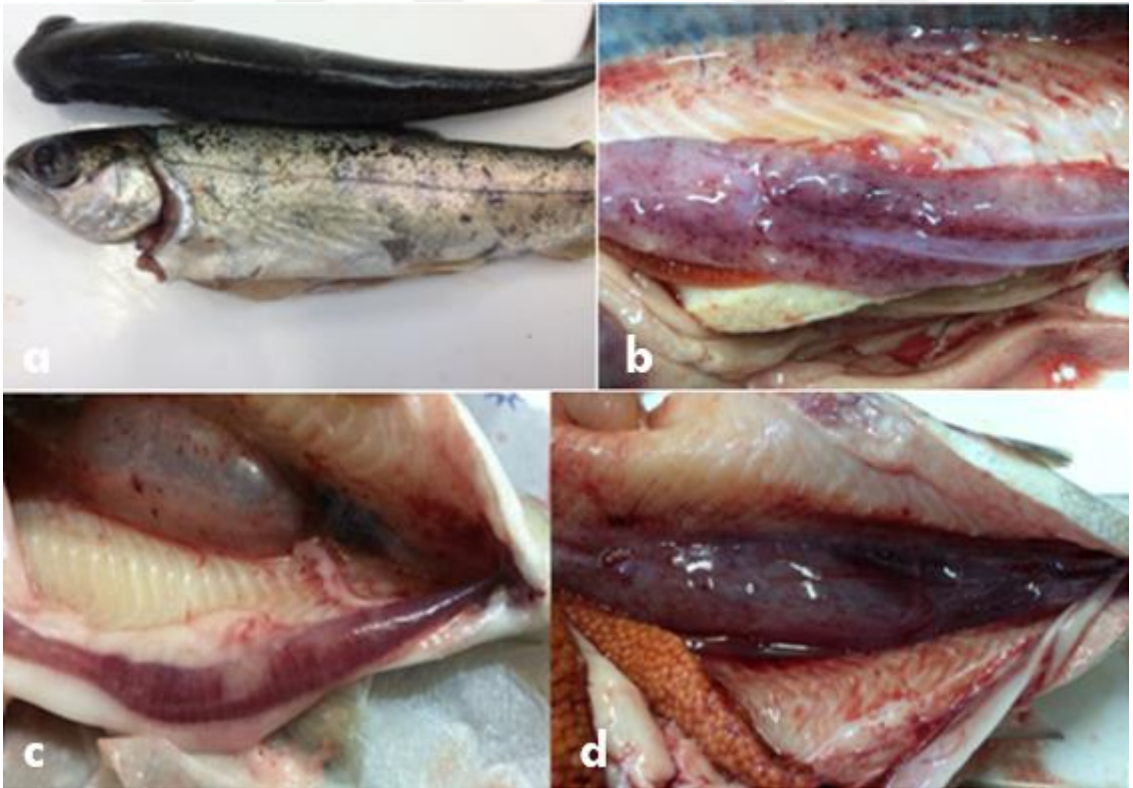
#### *Klinik semptomlar ve otopsi bulguları;*

Bu çalışmada, alabalık çiftliklerindeki havuzlardan örnekleme yapılırken özellikle kok hastalığının tipik makroskobik bulgu (renkte kararma ve eksoftalmus) gösteren hasta balıklar toplandı. Hasta balıkların su yüzeyinde halsiz bir şekilde yüzdüğü gözlemlendi. Bazı balıkların havuz çıkış suyuna toplandığı belirlendi. Bazı balıkların stresli ve su içinde hızlı hareket ettiği görüldü. Hasta gökkuşağı alabalıklarında özellikle renkte kararma ve gözlerde eksoftalmus görüldü. Hastalığın ileri vakalarında özellikle her iki gözünde eksoftalmusun yanı sıra gözün etrafında beyaz bir halka teşkil ettiği görüldü. Hastalığın kronik safasında balıkların gözlerinde tek veya çift taraflı matlık görüldü. Bazı balıklarda gözlerin yerinden çıktığı ve göz çukurunun boş olduğu görüldü. Balıklarda anüs etrafında hafif kızarıklık olduğu tespit edildi. Kok enfeksiyonu görülen balıklara ait tipik makroskobik semptom gösteren balıkların resmi aşağıdaki Şekil 3’de verilmiştir.

Hastalıklı gökkuşağı balıklarına yapılan nekropside karaciğerin solgun olduğu ve bazen üzerinde peteşial kanamaların varlığı tespit edildi. Bu peteşial kanamalar pilorik çekumlarda da tespit edildi. Bağırsakların boylu boyuna şişkin ve hemorajik olduğu görüldü. Bağırsakların içinde beyaz bir içerik olduğu belirlendi. Hava kesesi üzerinde yaygın kanamaların varlığına rastlanıldı. Kok enfeksiyonuna neden olan *L. garvieae*’nin gökkuşağı alabalıklarında oluşturduğu hastalığın iç belirtilerine ait semptomlar özellikle hava kesesi üzerinde ve bağırsaklarda boylu boyunca oluşan hemorajik görünüm Şekil 4’de sunulmuştur.



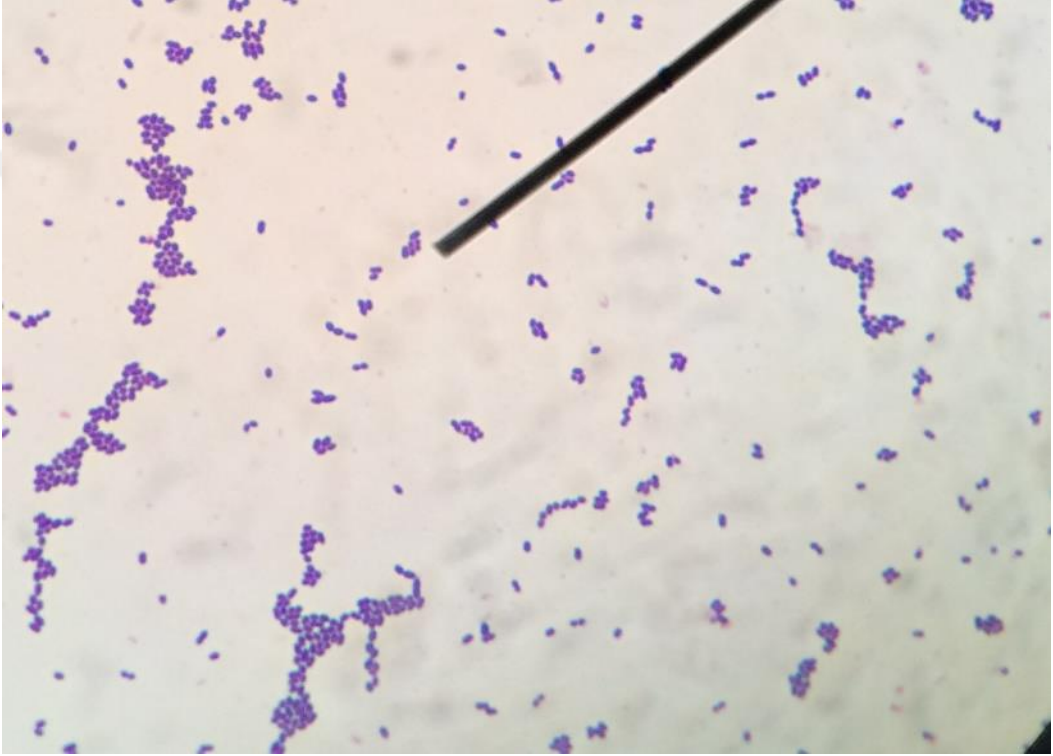
**Şekil 3.** Gökkuşığı alabalıklarında görülen makroskobik semptomlar; renkte kararma çift taraflı ekzoftalmus, göz etrafında beyaz bir halka görünümü.



**Şekil 4.** Hastalıklı balıkların deri, göz ve iç organlarındaki makroskobik bulgular. Renkte kararma ve gözde ekzoftalmus (a), hava kesesinde peteşiyel kanama (b,c,d) ve bağırsakta boylu boyunca yaygın kanama (c).

### *Fiziksel ve Biyokimyasal Test Sonuçları;*

Gökkuşığı alabalıklarındaki ortaya çıkan kok enfeksiyonlarından elde edilen izolatlara yapılan testlerde etkenin hareketsiz olduğu, mikroskopik bakıda bakterilerin Gram pozitif, yuvarlak (kok), ikili oval veya 6-7 koktan oluşan kısa zincirler tarzında görüldüğü tespit edildi (Şekil 5). Bu tez çalışmasında elde edilen izolatlara ait fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 5’de verildi.



**Şekil 5.** Böbrekten izole edilen *L. garvieae*'nin Gram boyama sonucu mikroskopik görünümü.



**Tablo 5.** *L. garvieae* izolatlarına ait geleneksel fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları.

Karakter	Balıklardan İzole Edilen İzolatların Sıra No																																						
	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66						
Şekli	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K				
Hareket	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
OF	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F				
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Lysin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Ornitin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Arjinin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Nitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MR testi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
VP testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
SS testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Hemoliz	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α		
%0 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
+10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
+20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
+25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

K: Kok, F: Fermantatif, MR: Metil Red, VP: Voges-Proskver, SS: Simon-Sitrat, Tuz: NaCl üreme testi.

### API 20 strep test sonuçları;

*L. garvieae* referans suşu (ATCC 43921) ile yapılan API 20 strep test sonuçlarına ait verilerin görünümü Şekil 6'da verildi. Hastalıklı gökkuşığı alabalıklardan elde edilen deilen *L. garvieae* izolatlarının API 20 strep test kitlerine inoküle edildikten 24 saat sonra ayıraç dökülmeden önceki görünüm Şekil 7'de, ayıraçlar döküldükten sonraki görünümü ise Şekil 8'de verildi. API 20 strep test kitine ait biyokimyasal verileri *L. garvieae* referans suşuna ait API 20 strep test kitinin biyokimyasal test sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. *L. garvieae* referans suşunun API 20 strep test kitinde; Voges Proskuer (VP), Hippurat hidroliz (HP), Eskulin hidroliz (ESC), Pirrolidonil arilamidaz (PYRA), lösin arilamidaz (LAP) ve Arjinin dihidrolaz (ADH) pozitif iken  $\alpha$  Galaktosidaz ( $\alpha$  GAL),  $\beta$  Glukuronidaz ( $\beta$ GUR)  $\beta$  Galaktosidaz ( $\beta$ GAL) Alkalın fosfataz (PAL) negatif reaksiyon verdiği belirlendi. Ayrıca aynı kitteki karbonhidrat testlerinden asit üretiminde; Riboz (RİB), Mannitol (MAN), Trehaloz (TRE) ve Amigdalın (AMD) pozitif reaksiyon iken, Arabinoz (ARA), Sorbitol (SOR), Laktoz (LAC), İnulin (INU), Rafinoz (RAF) ve Glikojen (GLYG) negatif reaksiyonlar verdiği tespit edildi. API 20 strep testi sonuçlarına göre gökkuşığı alabalıkların farklı organlarından izole edilen bakteri izolatların çoğu 7143115 profili gösterdiği tespit edildi.



**Şekil 6.** *L. garvieae*'nın referans suşu (ATCC43921) ile yapılan API 20 strep test kitinin 24 saat sonra ayıraçlar dökülmeden önceki ve döküldükten sonraki biyokimyasal testlerin sonuçları. (VP: Voges Proskuer, HP: Hippurat hidroliz, ESC: Eskulin hidroliz, PYRA: Pirrolidonil arilamidaz,  $\alpha$ GAL:  $\alpha$  Galaktosidaz,  $\beta$ GUR:  $\beta$  Glukuronidaz,  $\beta$ GAL:  $\beta$  Galaktosidaz, PAL: Alkalın fosfataz, LAP: Lösin arilamidaz, ADH: Arjinin dihidrolaz, RİB: Riboz, ARA: Arabinoz, MAN: Mannitol, SOR: Sorbitol, LAC: Laktoz, TRE: Trehaloz, INU: İnulin, RAF Rafinoz, AMD: Amigdalın ve GLYG: Glikojen.)

*L. garvieae*'nın referans suşu (ATCC43921) ile yapılan API 20 strep test kitinin 24 saat sonra ayıraçlar dökülmeden eskulin hidroliz ve arjinin dihidrolaz testlerin pozitif

reaksiyon verdiği, şeker testlerinden riboz, manitol, trehaloz ve amigdalin renk değiştirerek sarıya d6nd6đu tespit edildi. Ayrıca test ayıraçları d6k6ld6kten sonra voges proskuer, hippurat hidroliz, pirrolidonil arilamidaz ve l6sin arilamidaz testerinin pozitif sonuç verdiği belirlendi. Renk değiştirmeyen kırmızı renk ise negatif olarak kayıt edildi.



şekil 7. APİ 20 strep test kitinde 24 saat sonra ayıraçlar d6k6lmeden 6nceki *L. garvieae*'nin oluşturduğu biyokimyasal testlerin g6r6n6m6.

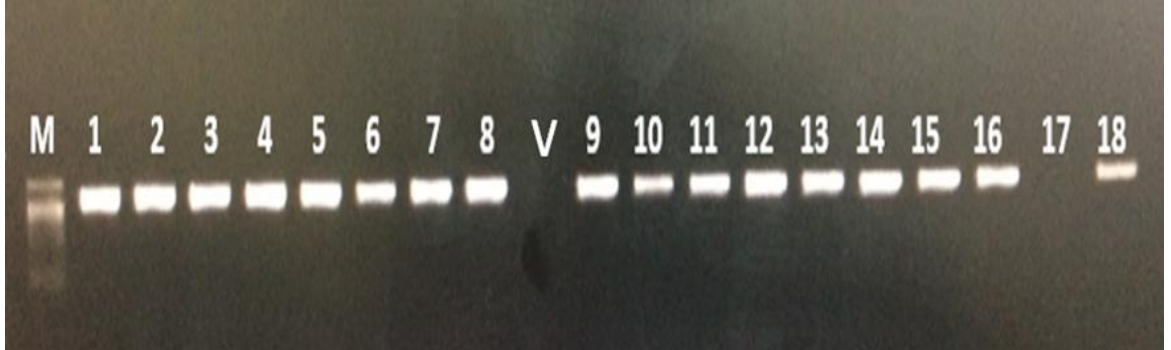


şekil 8. APİ 20 strep test kitinde 24 saat sonra ayıraçlar d6k6ld6kten sonraki *L. garvieae*'nin oluşturduğu biyokimyasal testlerin g6r6n6m6.

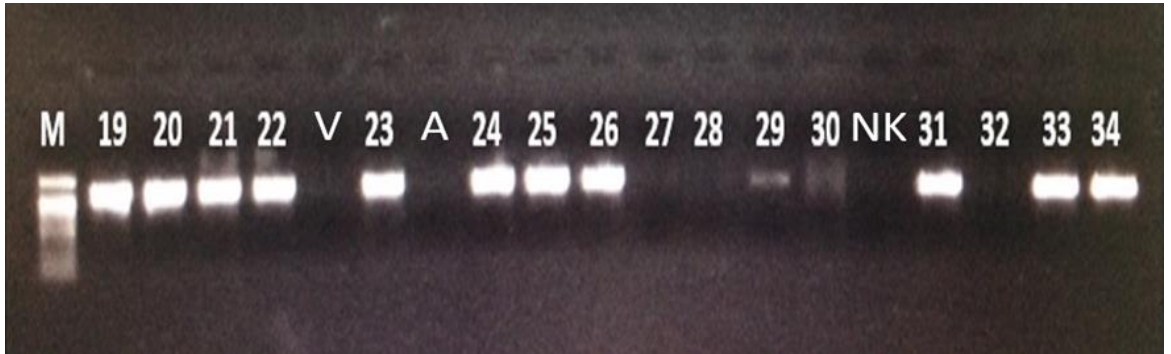
Bu çalışmadaki izolatlar *L. garvieae*'nin referans suşu (ATCC43921) ile yapılan APİ 20 strep test kitinin 24 saat sonraki tesleri ile b6y6k 6l6de benzer olduğu tespit edildi. Bazı izolatlarda karbonhidrat testlerinde (rafinozun sarıya d6nd6đu) farklılık g6sterdiği belirlendi. İzolatlara yapılan APİ 20 strep test kitleri ile yapılan testlerin sonuçları Tablo 6'de verildi.

### PCR test Sonuçları;

Klasik yöntemle identifiye edilen 100 izolattan 65 izolatın *L. garvieae* olduğu düşünülerek bu izolatlara API 20 strep testi yapıldı. API test sonuçları api web sisteminde *L. garvieae* olmadığı ve farklı *Lactococcus* spp., türlerine değişik oranda benzerlik göstermesinden dolayı izolatların tanımlanmasının doğru bir şekilde yapılamadı. Bu yüzden izole edilen bakterilerden elde edilen genomik DNA'ları pLG-1 ve pLG-2 primerleri kullanılarak 16S rRNA gen bölgesi PZR ile çoğaltıldı. Pozitif kontrol olarak referans suş (ATCC 43921)'un kullanıldı ve agaroz jelde yürütülen izolatlara ait RNA'larının büyüklüğü ile karşılaştırılarak *L. garvieae* olup olmadığı tespit edildi. *L. garvieae* referans suşu (ATCC 43921) 1100 bp ebatında olan PZR ürünleri pozitif olduğu kabul edildi. Negatif kontrol olarak *A. hydrophila* ve *V. anguillarum* kullanıldı. Bu çalışmada sonuçta toplam 66 adet izolat *L. garvieae* olduğu teyit edildi. *L. garvieae* izolatlarına ait PZR görüntüleri Şekil 9 ve Şekil 10'da gösterildi.



**Şekil 9.** *L. garvieae* suşlarına ait PZR ürünlerin agaroz jel görüntüsü. (M; Markır (100-1500 bp), 1: *L. garvieae* (ATCC 43921); V: *V. anguillarum*, 17. Negatif kontrol, 2-8, 9-16,18, *L. garvieae* suşları.)



**Şekil 10.** *L. garvieae* suşlarına ait PZR ürünlerin agaroz jel görüntüsü. (M; Markır (100-1500 bp), 19: *L. garvieae* (ATCC 43921); V: *V. anguillarum*, A: *A. hydrophila*, NK: Negatif kontrol, 20-26, 29-31, 33-34: *L. garvieae* saha izolatları, 27,28, 32 DNA tespit edilemedi).

**Tablo 6.** İzolatlara yapılan APİ 20 strep test kitleri ile yapılan testlerin sonuçları.

API 20 Strep Testleri	Balıklardan İzole Edilen <i>Lactococcus garvieae</i> İzolatlar																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33				
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
HIP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
PYRA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
$\alpha$ GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
$\beta$ GUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
$\beta$ GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
LAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
RIB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RAF	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
AMD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HEM	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$			

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

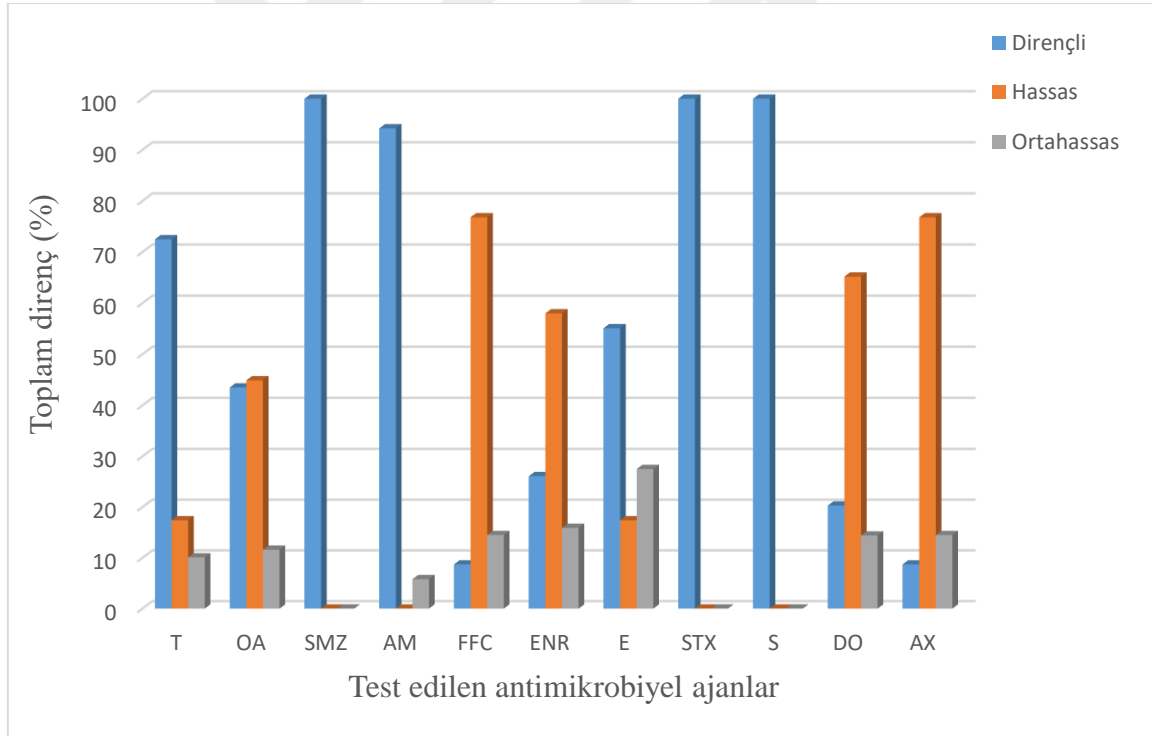
**Tablo 6.** İzolatlara yapılan API 20 strep test kitleri ile yapılan testlerin sonuçları.

API 20 Strep Testleri	Balıklardan İzole Edilen <i>Lactococcus garvieae</i> İzolatlar																																	
	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HIP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PYRA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ GAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
$\beta$ GUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
$\beta$ GAL	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
AMD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLYG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HEM	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$		

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

### Antibiogram test sonuçları;

Bu çalışmada hastalıklı gökkuşağı alabalıkların farklı organlarından izole edilen *L. garvieae* izolatlarına yapılan antibiogram test sonuçlarına göre tüm izolatların sulfamethoksazol, streptomisin ve sulfametoksazol+trimetoprim'e %100 dirençli olduğu tespit edildi. Ampisilin'e %94.2, oksitetrasiklin %72.5 oranında yüksek düzeyde dirençli olduğu, diğer antibiyotiklere karşı sırasıyla; eritromisin'e %55.07, oksolinik asit %43.5, enrofloksasin %26.09, doksisisikline %20,3, amoksiklin ve florfenikol %8.7 düzeyinde direnç gösterdiği tespit edildi. Antibiyotiklere karşı belirlenen hassasiyet ve direnç yüzdeleri ise Şekil 11'da gösterilmiştir. *L. garvieae* izolatlarına karşı amoksisilin ve florfenikol'ün %91.3, doksikline %79.7 oranında etkili olduğu tespit edildi. Her bir *L. garvieae* suşun antimikrobiyellere karşı gösterdiği antibiogram hassasiyet profilleri grafik olarak Şekil 11'de sunulmuş ve Tablo 7'de verilmiştir.



**Şekil 11.** *L. garvieae* suşlarının farklı antibiyotiklere gösterdiği direnç profilleri.

T: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik asit, SMZ: Sulfametoksazol, AM: Ampisilin, FFC: Florfenikol, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, STX: Trimetoprim-Sulfametoksazol, S: Streptomisin.

**Tablo 7. *L. garvieae* izolatlarının antibiyogram test sonuçlarına ait hassasiyet profilleri.**

Antibiyotik	Bahklardan İzole Edilen <i>Lactococcus garvieae</i> İzolatlarının Antimikrobiyal Hassasiyet Profili																																	
Diskleri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
T	D	D	D	D	D	D	O	D	D	D	D	D	D	H	D	H	D	H	D	D	D	D	D	O	D	D	O	D	H	D	D	H	D	
OA	H	H	H	H	H	D	D	D	O	H	H	O	H	H	H	O	D	D	H	H	H	O	H	H	O	H	D	D	D	D	O	O	D	
SMZ	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
AM	O	O	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
FFC	H	H	H	H	O	H	D	H	H	H	H	H	H	O	H	H	H	H	H	H	O	H	H	H	H	H	H	H	D	H	O	H	D	H
S	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
ENR	H	D	H	H	D	H	H	H	D	D	H	H	D	H	H	H	D	H	H	D	H	O	H	H	O	D	H	D	H	H	O	O	H	
E	O	O	O	H	H	H	H	O	H	O	H	O	H	O	O	O	O	O	H	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	O	D
STX	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
DO	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
AX	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

26

Antibiyotik	Bahklardan İzole Edilen <i>Lactococcus garvieae</i> İzolatlarının Antimikrobiyal Hassasiyet Profili																																	
Diskleri	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	
T	D	D	D	O	D	D	D	D	H	D	D	H	H	O	D	H	D	D	D	O	D	D	H	H	D	H	D	D	H	D	D	D	D	
OA	D	D	D	O	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	D	H	D	H	H	D	D	H	H	H	H	D	D	D	H	H	D	H	D	
SMZ	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
AM	D	D	D	D	O	O	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
FFC	H	O	H	H	H	H	H	H	D	H	O	H	H	O	H	H	H	O	H	H	D	H	H	H	O	H	H	H	H	O	H	O	D	
S	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
ENR	D	O	H	H	H	D	D	H	H	O	O	H	D	D	H	H	H	D	H	H	H	O	H	O	D	H	H	D	H	H	H	H	O	
E	D	D	D	D	O	O	O	O	H	H	O	O	H	O	D	D	O	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
STX	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
DO	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	D	D	O	H	D	D	H	H	H	O	H
AX	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	O	H	O	H	H	O	H	H	D	H	H	O	H	H	H	H	D	H	

T: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik asit, SMZ: Sulfamethoksazol, AM: Ampisillin, FFC: Florfenikol, S: Streptomisin, ENR: Enrofloxasin, E: Eritromisin, SXT: Trimethoprim+Sulfamethaksazol. D: Dirençli, O: Orta Hassas, H: Hassas.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçlarına göre hastalıklı gökkuşığı alabalıklardan izole edilen 65 suş ve 1 adet referans suş (ATCC 43921)'a biyokimyasal olarak yapılan API 20 strep testi sonuçlarına göre çoğu 7143115 profili göstermiştir. Aynı izolatların *L. garvieae* ait 1100 bp büyüklüğünde olan pLG-1 ve pLG-2 oligonukleotid primerleri ile genetik olarak yapılan PZR test sonuçlarına göre *L. garvieae* olduğu doğrulanmıştır. Bu izolatların antimikrobiyel ajanlara duyarlılığını belirlemek için diskdiffuzyon yöntemi ile yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre 3 farklı antimikrobiyel ajana %100 dirençli olduğu belirlenmiştir. Gökkuşığı alabalığında *L. garvieae* su sıcaklığının 18°C'nin üzerine çıktığı yaz mevsiminde gerek tatlı su gerek deniz balıklarında septisemiye neden olduğu, gökkuşığı alabalıklarında %50'den daha fazla ölümlere neden olduğu ve bu yüzden önemli ekonomik kayıplara neden olan önemli bir bakteriyel hastalık olduğu bildirilmiştir (Austin ve Austin, 2012). Etkilenen balıklarda gözlenen dış bulgular arasında tek ya da iki taraflı ekzoftalmi, gözde periorbital ve intraoküler bölgede, yüzgeçlerin taban kısımlarında, perianal bölgede hemorajiler, abdominal kısımda şişkinlik ve anal prolapsus yer alır (Altun vd., 2004; Kav ve Erganiş, 2007; Durmaz ve Kılıçoğlu, 2015). Nekropside peritoneal asidik sıvı birikimi, karaciğer, dalak ve böbrek dahil iç organlarda hemoraji, dalak ve karaciğerde fokal nekroz ile barsakta kanlı sıvı birikimi gözlenir (Altun vd., 2004; Kav ve Erganiş, 2007; Durmaz ve Kılıçoğlu, 2015). *L. garvieae*'nin Doğu Karadeniz Bölgesindeki farklı gökkuşığı alabalığı işletmelerinde gözlenen hastalık çıkışlarından sorumlu olup olmadıklarının araştırıldığı bu tez çalışmasında su sıcaklığını 18°C olduğu Haziran-Temmuz aylarında başlayıp su sıcaklığının 15°C'nin altına düştüğü Ekim ayında enfeksiyonun hızla bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Farklı işletmelerden yapılan örnekleme çalışmalarında hastalıktan etkilenen balıklarda genel olarak iştahsızlık, durgunluk, renkte karararma, gözlerde bilateral ekzoftalmusi, hemoraji ve opaklaşma, vücutta abdominal şişkinlik ve anal bölgede prolapsus ile solungaçların ise solgun olduğu tespit edilmiştir. Nekropside, vücut kası ile hava kesesinde yaygın hemorajiler, dalağın renginde koyulaşma, splenomegaly, barsağın boylu boyunca kızarıklık olduğu ve sarımsı renkli kanlı bir sıvı birikimi gözlenmiştir. Hasta balıklarda gözlenen bu bulgular, diğer araştırmacılar (Altun vd., 2004; Kav ve Erganiş, 2007; Durmaz ve Kılıçoğlu, 2015) tarafından *L. garvieae* ile enfekte gökkuşığı alabalıklarından bildirilen bulgulara benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

*L. garvieae* fakültatif anaerobik, hareketsiz, spor oluşturmeyan, Gram-pozitif kok şeklindeki bir bakteridir. Mikroskopik görünümde hücreler, çiftler ve kısa zincirler şeklinde bulunmaktadır. *L. garvieae* kanlı agarda  $\alpha$ -hemoliz oluştururken, sitokrom oksidaz ve katalaz negatiftir (Kav ve Erganiş, 2007; Austin ve Austin, 2012). Altun vd. (2004) gökkuşağı alabalıklarından izole edilen 8 *L. garvieae* suşunun sitokrom oksidaz ve katalaz negatif, VP pozitif olduğunu, 4°C ile 45°C de gelişme gösterdiklerini, glikoz, fruktoz, galaktoz, mannitol ve sakkarozu fermente ettiklerini bildirmiştir. Suşlar  $\alpha$ -hemolitik olup MacConkey agarda koloni oluşturmuştur. 8 *L. garvieae* suşu nişasta ve jelatini hidrolize edemezken, % 6.5 NaCl de gelişme göstermiştir. Kav ve Erganiş (2007) çalışmalarında 30 *L. garvieae* suşunun glikoz, galaktoz, mannitol, sakkaroz, fruktoz ve arabinoz'dan asit üretimlerinin pozitif olduğunu ancak sorbitol ile ksiloz'dan asit üretimlerinin ise negatif olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada *L. garvieae* suşunun Gram-pozitif, fermentatif, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif, VP testin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Suşlar, Anshary vd. (2014), Altun vd. (2004) ile Kav ve Erganiş (2007) tarafından bildirildiği gibi  $\alpha$ -hemolitik olup, 45°C ve % 6.5 NaCl de geliştiği, glikoz, galaktoz, mannitol ve sakkaroz'u fermente ettiği bulunmuştur. Bu çalışmada suşların sorbitol ve ksilozdan asit üretimlerinin pozitif olup Kav ve Erganiş (2007) ise çalıştıkları *L. garvieae* suşlarının sorbitol ve ksilozdan asit üretimlerinin negatif olduğunu bildirmiştir.

Suşların API 20 strep test sonuçları api web sistemnde *L. garvieae*'nin özelliklerine ait bir veri bulunmadığından için sisteme girilen suşların 7143115 kod profili *L. lactis* subsp. *lactis* % 57.9, *Enterococcus faecalis* %24.1, *E. durans* %14.5 ve *E. faecium* %3.3 türlerinin biyokimyasal testlerinin benzerliğinden dolayı bu etkenleri birbirinden kesin olarak ayırt edilemediği ve yanlış identifikasyona neden olunabildiği belirlenmiştir. Bu neden yanlış identifikasyonu önlemek için *L. garvieae*'nin referans suşu (ATCC 43921) ile hem API 20 strep testi yapılarak test sonuçları değerlendirildiği gibi moleküler çalışmada aynı referans suşu genomik DNA'sı çıkartılarak PZR'da pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kav ve Erganiş (2007) 30 *L. garvieae* izolatının API 20 strep testinin 24 saatlik test sonuçlarına göre %90 oranında *L. lactis* subsp. *lactis* ve %6.6 oranında da *E. faecalis*'e benzerlik gösterdiğini bildirilmiştir. Bu çalışmada, API 20 strep test sonuçlarına göre 65 adet *L. garvieae* izolatının, Kav ve Erganiş (2007) tarafından bildirilen test sonuçlarına benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Biyokimyasal özelliklerdeki farklar, bir organizmanın fizyolojik profili

üzerine önemli bir bilgi vermesine karşın, fenotipik özellikler ile tek başına tür seviyesinde yeterli tanımlama yapılamamaktadır.

Moleküler teknikler ile patojenik türleri tanımlama ve tür ile suşlar arasındaki farkı ayırt edebilmek mümkün olduğu rapor edilmiştir (Vale vd., 2000). Ravelo vd. (2003) *L. garvieae* suşları arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek için RAPD (Rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA) tekniğini kullandıkları çalışmalarında, suşların 1100 bp'lik spesifik amplifikasyon ürününü verdiğini tespit ettikleri bildirilmiştir. Bu çalışmadaki 65 *L. garvieae* suşunun identifikasyonu için uygulanan PZR tekniği sonuçlarına göre suşlar 1100 bp'lik amplifikasyon ürününü verdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların Ravelo vd. (2003) ve Zlotkin vd. (1998) tarafından bildirilen sonuçlar ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır. Kav ve Erganiş (2007) çalışmalarında *L. garvieae* izolatlarının ampisilin, oksitetrasiklin ve eritromisin'e hassas olduklarını, Durmaz ve Kılıçoğlu (2015), ise izole ettikleri *L. garvieae* izolatlarının ampisilin, eritromisin'e hassas, trimetoprim'e ise dirençli olduklarını bildirmiştir. Türe ve Boran (2015), ampisilin'in *L. garvieae* izolatlarına karşı en etkili ajanlardan birisi olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada suşların eritromisin'e %45 oranında hassas olmaları, Kav ve Erganiş (2007), Durmaz ve Kılıçoğlu (2015), ile Türe ve Boran (2015)'in sonuçlarına benzerlik göstermekle birlikte, bu araştırmacılar farklı olarak izolatlarının oksitetrasiklin'e %72,5 oranında yüksek düzeyde dirençli oldukları, ampisilin'e karşı ise suşların %100 dirençli olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmanın bulgularına göre, hastalıklı gökkuşuğu alabalıklarından izole edilirken bakteriyel etkenlerin gerek fenotipik tanı test sonuçlarına ve gerekse moleküler PZR teknikleri kullanılarak yapılan çalışmanın sonuçlarına göre *L. garvieae* olarak izole ve identifiye edilmiştir. Bu sonuçlar ile su sıcaklığının 18°C'nin üzerine çıktığı yaz aylarında özellikle *L. garvieae*'nin bölgede örnekleme çalışması yapılan gökkuşuğu alabalık işletmelerindeki görülen hastalık vakalarından sorumlu başlıca etken olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre izolatların en az üç antimikrobiyal ajana %100 dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu durum, işletme şartlarında yanlış doz ve sürede kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı bakterilerde artan direnç ile açıklanması mümkündür. Farklı çalışmalarda bakterideki direnç gelişimi artmakla olduğu ve bu direnç gelişiminin ortamda bulunan diğer bakteri türlerine de değişik yollarla aktarılabilirliğini düşündürmektedir.

Antibiyogram duyarlılık testi sonuçları hastalığa karşı mevcut aşılarn kullanılması ve yeni aşı çalışmalarının geliştirmesi gerektiğini dűřünülmektedir.

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

Ayrıca, Bölgemizdeki balık çiftliklerinde hastalıktan korunmak amacıyla çiftliğe ait önceki yıllarda izole edilen *L. garvieae* suşları ile hazırlanan yağ bazlı otovaksin yerli aşılarn yanı sıra yağ bazlı ithal aşılarnın kullanımını son yıllarda arttığı tespit edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Altun, S., Diler, O. and 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.
- Akşit, D. ve Kum, C., 2008.** Gökkuşağı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda Sık Görülen Patojen Mikroorganizmaların Tespiti ve Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(1), 1-7.
- Anshary, H., Kurniawan, R.A., Sriwulan, S., Ramli, R. and Baxa, D.V., 2014.** Isolation and molecular identification of the etiological agents of streptococcosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in net cages in Lake Sentani, Papua, Indonesia. SpringerPlus, 3, 627-638.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1999.** Bacterial Fish Pathogens Diseased of Farmed and Wild Fish. 3rd ed., Praxis Publishing, Chichester, UK, p. 457.
- Austin, B. and Austin, D.A., 2012.** Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish. 5th ed., 17-118, Springer Science, Dordrech.
- Austin, B. and Al-Zahrani, A.M.J., 2006.** The Effect of Antimicrobial Compounds on the Gastrointestinal Microflora of Rainbow Trout *Salmo Gairdneri* Richardson. Journal of Fish Biology, 33, 1-14.
- Balta, F., Sandalli, C., Kayis, S. and Ozgumus, O.B., 2010.** Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 30(6), 211-219.
- Balta, F., Kayis, S., Karata, Y.İ., İpek, Z.Z. Er, A., 2017.** Gökkuşağı Alabalıkların (*Oncorhynchus mykiss*)'da Görülen *Lactococcus garvieae* Enfeksiyonu Üzerine Bir Araştırma. RTEÜ BAP (Proje No: 2014.103.02.3.) proje sonuç raporu.
- Balta, F. and Dengiz Balta, Z., 2019.** A research on *Lactococcus garvieae* infection observed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 1. International Technological Sciences and Design Symposium, 27-29 June 2018 - Giresun/Turkey, Proceeding Book, 162-167.
- Balta, F. ve Dengiz Balta, Z., 2019.** Ekzoftalmus gökkuşağı alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*)'ın gözlerinden *Lactococcus garvieae*'nin izolasyonu. Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi, 4(1), 27-33.
- Çađırđan, H. and Tanrıkuł, T.T., 1997.** A Lactococcus in a trout farm. Mediterranean Fisheries Congress. 9-11 April Izmir, Turkey, 40p.
- Çađırđan, H., 2004.** Biotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated from Turkey. E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 21(3-4), 267-269.

- Chang, P.H., Lin, C.W. and 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. and 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.
- Collins, M.D., Farrow, J.A., Phillips, B.A. and Kandler, O., 1983.** *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. Journal of General Microbiology, 129, 3427-3431.
- Dengiz Balta, Z., 2010.** Ani sıcaklık şoku uygulanmış Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax Pallas, 1811*)'nda fizyolojik stres cevabın belirlenmesi. Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 49s.
- Diler, Ö., Altun, S., Adiloğlu, A.K., Kubilay, A. and Işık, B.I., 2002.** First occurrence of streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 22, 21-26.
- Durmaz, Y. ve Kılıçoğlu, Y., 2015.** Bir alabalık çiftliğinde doğal enfekte gökkuşuğu alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) *Lactococcus garvieae*'nin kültür ve PCR ile saptanması ve etkenin antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 10(2), 109-115.
- Eldar, A. and 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. and Bercovier, H., 1999.** Biodiversity of *Lactococcus garvieae* isolated from fish in Europe, Asia and Australia. Applied and Environmental Microbiology, 65, 1005-1008.
- Guardabassi, L., Dijkson, L., Collard, J.M., Olsen, J.E. and Dalsgaard, A., 2000.** Distribution and in vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. Journal of Medical Microbiology, 49, 929-936.
- Kav, K. ve Erganiş, O., 2007.** Konya bölgesinde bulunan gökkuşa alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 23(1), 7-17.
- Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G. and Diler, Ö., 2005.** The determination of antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus garvieae* strains. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1, 39-48.
- Kusuda, K., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. and Fryer, J.L., 1991.** *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 406-409.

- Kusuda, R. and Salati, F., 1999.** *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. In (eds. Woo PTK, Bruno, D.W.) Fish Diseases and Disorders, Vol: 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing, 303-317pp.
- Mofredj, A., Baraka, D., Kloeti, G. and Dumont, J.L., 2000.** *Lactococcus garvieae* septicemia with liver abscess in an immuno-suppressed patient. The American Journal of Medicine, 109, 513-514.
- Muzquiz, J.L., Royo, F.M., Otega, C., Blas, I., Ruiz, I. and Allonso, J.L., 1999.** Pathogenicity of *Streptococcus* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) dependence on age of diseased fish. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 19(3), 114-119.
- NCCLS, 1997.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. National Committee for Clinical Laborator Approval Standard M2-A6. Wayne, PA: NCCLS.
- Ng, L.K., Martin, I., Alfo, M. and Mulvey, M., 2001.** Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistance genes. Molecular and Cellular Probes, 15,(4) 209-215. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363>
- James, P.R., Hardman, S.M.C. and Patterson, D.L.H., 2000.** Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae*: A first case report. Postgraduate Medical Journal, 76, 301-303.
- Öztürk, T., Didinen, B.I., Doğan, G., Özer, A. and Bircan, R., 2013.** Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in the middle Black Sea Region in Turkey and antimicrobial susceptibility of the aetiological agent, *Lactococcus garvieae*. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 24, 7-12.
- Ravelo, C., Magariños, B., López-Romalde, S. and Toranzo, A.E., 2003.** Molecular fingerprintings of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. Journal of Clinical Microbiology, 41, 751-756.
- Sandallı, C., Özgümüş, O.B. and Sevim, A., 2010.** Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline-resistant Enterobacteriaceae obtained from a coliform collection. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(11), 2099-2103.
- Sindermann, C.J., 1990.** Bacteria: In: Principal diseases of masrin fish and shellfish. 2nd. ed. Vol. 1: Diseases of masrin fish, pp.31-56, Academic Press, London.
- Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, P., Riaza, A., Nunez, S. and Barja, J.L., 1994.** *Streptococcosis* in cultured turbot caused by an *Enterococcus*-like Bacterium. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 14, 19-23.
- Türe, M., Işıdan, H., Savaş, H. ve Kutlu, İ., 2012.** PFGE metodu kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin genetik çeşitliliğinin ve yayılımının belirlenmesi. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü-Trabzon (TAGEM/HS/10/09/02/179) proje sonuç raporu, 61s.

- Türe, M. and 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, 37-42.
- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M., Liebana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A., Dominguez, L. and Fernandez-Garayzabal, J.F., 2000.** Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from *Lactococcosis* outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. Journal of Clinical Microbiology, 38, 3791-3795.
- Vendrell, D., Balcàzar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O. and Muzquiz, J.L., 2006.** *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 29, 177-198.
- Wang, C.Y., Shie, H.S., Chen, S.C., Huang, J.P., Hsieh, I.C., Wen, M.S., Lin, F.C. and Wu, D., 2007.** *Lactococcus garvieae* infections in humans: Possible association with aquaculture outbreaks. International Journal of Clinical Practice, 61, 68-73.
- Yiu, K., Siu, C., To, K., Jim, M., Lee, K., Lau, C. and Tse, H., 2007.** A rare cause of infective endocarditis; *Lactococcus garvieae*. International Journal of Cardiology, 114, 286-287.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. and Bercovier, H., 1998.** Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 36, 983-985.

## ÖZGEÇMİŞ

İsmail KARATAY, 25/01/1988 tarihinde Trabzon iline bağlı Çaykara ilçesinde doğdu. İlköğretimini 2002 yılında Trabzon ili, Çaykara ilçesinde bulunan Taşkiran Mustafa Özer İlköğretim Okulu'nda ve Ortaöğretimini 2005 yılında Trabzon ili, Çaykara ilçesindeki Çaykara Çok Programlı Lisesi'nde tamamladı. 15/09/2008 tarihinde başladığı lisans eğitimini 15/06/2012 tarihinde Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Bölümü'nde 3,17 derecesi ile tamamladı. 2011-2012 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda başladığı Yüksek Lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir. Emniyet Genel Müdürlüğü kurumunda Polis Memuru olarak 2015 yılı itibariyle görev yapmaktadır. Orta seviyede İngilizce bilmektedir.