

Yavru Gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, W.)'ndan *Lactococcus garvieae*'nin İzolasyonu ve Plazmit Profilleri Üzerine Bir Çalışma

A Study on Plasmid Profiles and Isolation of *Lactococcus garvieae* from the Young Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.)

Özet

Bu çalışmada Fethiye bölgesindeki bazı gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerindeki hasta yavru balıklardan *Lactococcus garvieae* suşları izole ve tanımlenmiştir. Hasta balıklarda durgunluk, iştahsızlık, gözlerde ekzoftalmi ve hemoraji, abdominal kısımda şişkinlik gözlenmiştir. İç bulgu olarak karaciğerde hemoraji, dalakta büyüme (splenomegali) ve karın boşluğunda asidik sıvı birikimi tespit edilmiştir. *Lactococcus garvieae* suşları ampisilin, eritromisin, kloramfenikol, sülfametoksazol, oksitetrasiklin, tetrasiklin ve trimetoprim'e duyarlılık, basitrasin, flumequin, furazolidon, kanamisin, nalidiksik asit, oksalnik asit ve streptomisin'e direnç göstermiştir. Plazmit analiz sonuçlarına göre, suşların farklı boyutlarda plazmitleri içerdikleri bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşuğu alabalığı, *Lactococcus garvieae*, antimikrobiyal, plazmit

Abstract

In this study, *Lactococcus garvieae* strains were isolated and identified from sick young fish from some rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Fethiye region. Lethargy, anorexia, exophthalmi with hemorrhage and abdominal dropsy in the sick fish were observed. Hemorrhage in the liver, enlargement of the spleen (splenomegaly) and ascites as internal signs were determined. The strains showed sensitivity to ampicillin, erythromycin, chloramphenicol, sulfamethoxazole, oxytetracycline, tetracycline and trimethoprim and resistant to basitrasin, flumequine, furazolidone, kanamycin, nalidixic acid, oxalnic acid and streptomycin. It was found that the strains harboured plasmids with different sizes according to the results of plasmid analysis results.

Key Words: Rainbow trout, *Lactococcus garvieae*, antimicrobial, plasmid

Araştırma Makalesi

Mehtap Kurtoğlu¹

Jale Korun²

¹Avcılar İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Avcılar, İstanbul

² Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı Akdeniz Üniversitesi

İletişim (Correspondence)

Jale KORUN

jalekorun@akdeniz.edu.tr

Makale Bilgisi

Geliş: 04-03-2018

Kabul: 26-03-2018

Giriş

Laktokokkozis gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğini etkileyen önemli bulaşıcı hastalıklar arasında yer alır. Hastalık ilk kez 1990'lı yılların başlarında İspanya da görülmüş, daha sonra ise Portekiz, Fransa, Türkiye, Yunanistan ve Bulgaristan dahil olmak üzere Avrupa'nın çeşitli bölgelerine hızlı bir şekilde yayılım göstermiştir (Savvidis vd., 2007). Ülkemizde ise kok enfeksiyonları ilk kez 1997 yılında Çağırğan ve Tanrıkul tarafından bildirilmiş olup, sonraki yıllarda ise hastalık epizootikler oluşturarak, gökkuşağı alabalığı işletmelerinden bildirilmiştir (Çağırğan ve Tanrıkul, 1997; Diler vd., 2002; Altun vd., 2004). Günümüzde ise hastalık etkeni *Lactococcus garvieae* ile doğal olarak enfekte gökkuşağı alabalıklarına dair raporlar giderek artmaktadır (Avcı vd., 2010; Didinen vd., 2014). *L. garvieae* önceleri Streptococcaceae familyasında yer alan Streptococcus cinsine dahil edilmiştir. Ancak daha sonraları DNA-ribozomal RNA melezleme ve rRNA sekanslama çalışmalarına göre, tür *Lactococcus* cinsine dahil edilerek yeniden sınıflandırılmıştır (Shin vd., 2006). *L. garvieae* bugüne kadar japon yılan balığı (*Anguilla japonica*), pisi (*Paralichthys olivaceus*), kefal (*Mugil cephalus*), gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) ve sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*) dahil olmak üzere birçok deniz ve tatlı su balık türlerinden izole edilmiştir (Meyburgh vd., 2017). *L. garvieae* hareketsiz, fakültatif anaerobik, Gram-pozitif, katalaz ve sitokrom oksidaz negatif, 0.7-0.4 µm büyüklüğünde kısa zincir oluşturan oval-kok şekilli bir bakteri türüdür. Bakterinin 10-45 °C de % 6.5 NaCl konsantrasyonunda ve pH'm 4.5-9.6 olduğu optimal koşullarda ürediği ve koloni oluşturduğu bildirilmiştir (Kitao,1993). Yetersiz su kalitesi ve yüksek su sıcaklığı gibi çevresel koşullar, balıkların *L. garvieae* enfeksiyonlarına olan hassasiyetlerinin artmasına neden olmaktadır. Laktokokkozis hiperakut hemorajik septiseminin

gelişmesi ile karakterize edilir. Hastalıkta gözlenen başlıca klinik bulgular; hızlı ve genel iştahsızlık, melenozis, durgunluk, denge kaybı ve düzensiz yüzme, ekzoftalmi (tek ya da çift taraflı), periorbital ve intraoküler bölgede, yüzgeçlerin taban kısmında, perianal bölgede ve operkulum yüzeyinde hemorajilerdir (Vendrell vd., 2006; Fukushima vd., 2017). Ayrıca, etkilenmiş balıklarda karın kısmında şişkinlik ve anal prolapsus da görülür. Nekropside peritoneal boşlukta asidik sıvı birikimi vardır (Vendrell vd., 2006). Gökkuşağı alabalıklarında lactococcosis enfeksiyonu kontrolünde en yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin amoksisilin, eritromisin, oksitetrasiklin ve düşük düzeyde doksisisilin olduğu bildirilmiştir (Vendrell vd., 2006). Ülkemizde 2002 yılından bu yana lactococcosis enfeksiyonu etkeni olan *L. garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları araştırılmış ve in vitro koşullarda suşların amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit, ampisilin, doksisisiklin, enrofloksasin, eritromisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin, pristinamisin, sefalotin ve tetrasiklin'e duyarlı oldukları, apramisin, flumekuoin, gentamisin, kanamisin, linkomisin, oksasilin, oksolinik asit, penisilin, streptomisin ve sulfametizol'e ise direnç gösterdikleri bildirilmiştir (Kubilay vd., 2005; Kav ve Erganiş, 2008; Öztürk vd., 2009; Türe ve Alp, 2016).

Bakteriyel hastalıkları kontrol etmek amacıyla enfekte balıkları antibiyotik ilaveli yemlerle beslemek genel bir uygulamadır. Bununla birlikte, bu uygulama hasta balıkların yemi almama durumlarında etkisiz olabilmektedir. Ayrıca, antimikrobiyal ajanların sık kullanımı patojenlerde antimikrobiyal maddelere karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. Bu durum, antibiyotik dirençli bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisini güçleştirmektedir (Pridgeon ve Klesius, 2012). Kemoterapötik uygulamaların dirençli streptokokkal balık patojenlerinin ortaya çıkmasına

neden olduğu bildirilmiştir (Meyburg vd., 2017). 1 izolatta birden fazla kemoterapötik ajan direncinin varlığını ima eden çoklu dirençle sıklıkla karşılaşmaktadır. Bakteri popülasyonlarında antibiyotik direnç genlerinin yayılması, yatay gen transferinin çeşitli mekanizmaları tarafından desteklenmektedir. Plazmit aracılı transferin Streptokok türü olan balık patojenlerinde yaygın bir şekilde bildirilmiştir (Meyburg vd., 2017). Japonya da kültür sarı kuyruk (*S. quinqueradiata*) balıklarından izole edilen streptokok izolatlarında direnç ilk kez tanımlanarak, iki kategoriye ayrılmıştır. Bu kategorilerden ilki suşların makrolidler, linkomisin ve tetrasiklin'e orta düzeyde direnç gösterdikleri ve direnç genlerinin aktarılamaz özellikte ve yapısal olarak ifade edildiği kategori ve diğeri ise suşların makrolidler, linkomisin ve ya tetrasiklin'e ya da kloramfenikol'e yüksek direnç gösterdikleri ve aktarılabılır özellikte olduğu kategoridir (Meyburg vd., 2017). Aoki vd. (1990) antibiyotik direnci belirleyicilerinin, dirençli plazmitler veya transpozonların üzerinde bulunduğunu tahmin etmiştir. Bu bulgular eritromisin, lincomisin ve oksitetrasiklin dirençli *L. garvieae* izolatlarından izole edilen R plazmitlerinin karakterize edilmesine ve direnç genleri ermB ve tet(S) varlığının ortaya çıkmasına neden olmuştur (Aoki vd., 1990; Meyburgh vd., 2017).

Bu çalışmanın amacı; kültür gökkuşağı alabalığı yavrularında görülen laktokokkozis'in tespiti, hastalık etkeni bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılığının ortaya konulması ve plazmitlerinin mevcut olup olmadığının araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Örnekleme

Çalışmada incelenen hasta gökkuşağı yavruları Fethiye bölgesinde faaliyet gösteren üç farklı ticari alabalık işletmesinden temin edilmiştir. Örneklemeler ilgili

işletmelerin hastalık çıkışlarını bildirdiği Şubat ve Mayıs (2010) ayları olmak üzere her ay yapılmıştır. Örneklemelerin yapıldığı işletmelerde kullanılan sular, kaynak suyu olup işletme verilerine göre su sıcaklığı 8-12 °C, pH'ı 7.6-8.1 ve çözülmüş oksijen miktarı 7.2-10.2 mg/l arasında değişiklik göstermiştir. Çalışma süresince vücut ağırlıkları 3-20 g arasında değişen toplam 50 yavru balık ile çalışılmıştır.

Bakteriyolojik Çalışma

Hasta balıklara nekropsi uygulaması sonrası balıkların haemopoietik organlarından (karaciğer, dalak ve böbrek) Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Ekimli besiyerleri 24 ± 2°C de 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. Besiyerinde gelişme gösteren bakteri kolonilerinden altkültürler yapılmıştır. İzole edilen suşların morfolojik özelliklerinin tespiti Gram boyama yöntemi ile, hareketlilik testi ise asılı damla yöntemi ile belirlenmiştir (Timur ve Timur, 2003). Fizyolojik özelliklerinin tespiti için farklı tuzluluk oranları (%0,2,4,6,8 ve 10 NaCl içeren nutrient buyyonu) ve farklı sıcaklıklarda (4,20,30 ve 35°C de) üreme durumları araştırılmıştır (Seeley vd., 1991). Bakterilerin biyokimyasal özelliklerinin tespiti amacıyla çeşitli testler uygulanmıştır. Bu testler ; sitokrom oksidaz (tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride), katalaz (%3 H₂O₂), O/F glukoz testi, metil kırmızısı (MR) ve Voges-Proskauer (VP) testleri, TSI da reaksiyon, glükozdan gaz oluşturma, arjinin dihidrolaz üretimi, lizin ve ornitin dekarboksilaz testleri, sitrat kullanımı, indol üretimi, nitrat indirgeme, amilaz üretimi, ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) testi ve şekerlerden asit üretimi (galaktoz, fruktoz, mannoz, laktoz, mannitol, sorbitol, rafinoz, arabinoz, ksiloz, sukroz ve myo-inositol)'dur (Seeley vd., 1991). Çalışmada izole edilen bakteri suşları Vendrell vd. (2006) ve Austin ve Austin (2012)'ye göre tanımlanmıştır.

Antibiyotik Duyarlılık Tespiti için Standart Disk Difüzyon Yöntemi

İzolatların antibiyotik duyarlılık testleri Mueller-Hinton agar (MHA) da disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. McFarland No 0.5 bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan MHA besiyerine 0.1 ml aktararak yayılmış ve bekletilmiştir. Daha sonra petrilerin kuruması için oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilmiştir. Besiyeri yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda değişik antibiyotikleri içeren ticari diskler yerleştirilerek $26 \pm 2^\circ\text{C}$ de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Arda, 1997). İnkübasyon süresi sonunda diskler etrafında gelişen zonların çapları milimetrik cetvel ile ölçülerek suşların hassas ve dirençli olup olmadıkları değerlendirilmiştir (NCCLS, 2003; EUCAST, 2011). Çalışmada kullanılan antibiyotikler; Ampisilin (Amp10 μg), Basitrasin (BC0.04 μg), Eritromisin (E15 μg), Flumekuim (UB30 μg), Furazolidon (FR15 μg), Kanamisin (K30 μg), Kloramfenikol (C30 μg), Nalidiksik asit (NA30 μg), Oksalidik asit (OA2 μg), Streptomisin (S10 μg), Tetrasiklin (TE30 μg) ve Trimetoprim (W5 μg)'dir.

Plazmit Analizleri

Hasta gökkuşağı alabalığı yavrularından izole edilen suşlarda plazmit varlığının belirlenmesi amacı ile 24 saatlik bakteri kültürlerinden 10 ml'lik GM17 sıvı besiyerine 1 ml'lik inokülasyonlar yapılarak, 30°C de 3-3.5 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda bakteri kültürü 6000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre çökeltisi üzerine kurutulduktan sonra 380 μl sukroz tamponu eklenerek su banyosunda 37°C de 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 96.5 μl lizozim ilave edilmiş ve su banyosunda 37°C de 5 dakika bekletilmiştir. Lizozim uygulanan hücre çökeltisine 48.5 μl Tris-EDTA-1 (pH 8.0) ve 28 μl %20'lik SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) eklenmiştir.

Lizinin tamamlanabilmesi için su banyosunda 37°C de 10 dakika bırakılmıştır. Daha sonra mekanik karıştırıcıda en yüksek devirde 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA'nın kırılması sağlanmıştır. 3 N NaOH çözeltisinden 28 μl eklenerek 10 dakika süre ile aralıklı olarak karıştırılmıştır. Denatürasyon aşaması sonrasında santrifüj tüplerine 50 μl 2 M Tris-HCL (pH 7.0) çözeltisi eklenerek 3 dakika süre ile aralıksız karıştırılmıştır. 5 M NaCl çözeltisinden 72 μl ve %3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700 μl eklenerek 4°C de 12500 devirde 20 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Oluşan üst faz yeni tüplere aktararak deproteinasyonun sağlanması için 700 μl kloroform/izoamil alkol (24:1) uygulaması yapılmıştır. 4°C de 12500 devirde 15 dakika santrifüj işlemi sonrası oluşan üst faz yeni tüplere aktararak üzerine eş değer hacimde etil alkol eklenmiştir. Etil alkol ilaveli tüpler -20°C de 1 gece bekletildikten sonra 4°C de 12500 devirde 20 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı faz dökülerek çözeltiler kurutulmuştur. Kuruyan çökeltiler 20 μl Tris-EDTA-2 (pH 7.5) içerisinde çözdürülmüş ve RNaz A stok çözeltisinden 2 μl eklenerek 37°C de su banyosunda 45 dakika bekletilmiştir (Anderson ve McKay, 1983). Plazmit DNA'ları %0.7 agaroz jel elektroforez yöntemi ve restriksiyon enzimler ile analiz edilerek varlıkları tespit edilmiştir. Elde edilen agaroz jel görüntülerinde plazmit büyüklüğü belirlenirken GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (75-20000 bp) ve High RNage DNA ladder (10171-48502 bp) (Fermentas) büyüklük markırlarından yararlanılmıştır. Alınan agaroz jel görüntüleri UVPro programı ile bilgisayara aktarılmıştır.

Plazmitlerin karakterizasyonunda kullanılan restriksiyon enzimleri ve tanıma bölgelerinin sekans bilgileri (Kuk ve Erensoy, 2008) Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri (Kuk ve Erensoy, 2008).

Table 1. Restriction enzymes used in the study (Kuk ve Erensoy, 2008).

Enzimin adı	İzole edildiği mikroorganizma	Oluşturduğu uç	Tanım dizisi
BamHI	Bacillus amylolique faciens	Yapışkan uç	5'-G [^] GATCC-3' 3'-CCTAG [^] G-5'
EcoRI	Escherichia coli	Yapışkan uç	5'-G [^] AATTC-3' 3'-CTTAA [^] G-5'
EcoRV	E. coli	Küt uç	5'-G [^] AATTC-3'

Bulgular

Klinik bulgular

Çalışmada vücut ağırlıkları 3 g'dan 20 g'a kadar değişen ağırlıklarda toplam 50 adet hasta gökkuşağı alabalığı ile çalışılmıştır. Enfekte balıklarda durgunluk, yem alımında azalma ve iştahsızlık ile havuz su çıkışlarında toplanma gözlenmiştir. Dış klinik bulgular olarak gözlerde ekzoftalmi, hemoraji ve opaklaşma (Şekil 1), dorsal yüzgeçlerde distal kısımda erime ve abdominal kısımda şişkinlik mevcut olup, iç bakıda karaciğerde hemoraji, dalakta büyüme (splenomegali) ve renginde koyulaşma (Şekil 2), karın boşluğunda asidik sıvı birikimi ile böbreklerde kıvamında yumuşama tespit edilmiştir. Enfekte balıklarda bağırsağın gıda yönünden boş olduğu da gözlenmiştir.



Şekil 1. Enfekte balıkta gözde ekzoftalmus, hemoraji ve opaklaşma.
Figure 1. Exophthalmus, haemorrhage and opacification in the infected fish.



Şekil 2. Enfekte balıkta karaciğerde hemoraji, dalakta büyüme (splenomegali) ve renginde koyulaşma.
Figure 2. Haemorrhage in the liver, enlargement and darkening of spleen in the infected fish.

Bakteriyolojik bulgular

Şubat-Mayıs ayları arasında yapılan örnekleme çalışmalarında elde edilen suşların tümüne hareketlilik, Gram-boyama, sitokrom oksidaz, katalaz, oksidasyon-fermentasyon testleri dahil bir dizi fenotipik tanı testleri uygulanmıştır. Test sonuçlarına göre Gram-negatif olduğu tespit edilen suşlar (28 hareketli *Aeromonas* sp. suşu, 5 *Pseudomonas* sp. suşu, 4 *Enterobacter* sp. suşu ve 8 *Edwardsiella* sp. suşu) araştırma konusu olmadığından sadece Gram-pozitif, hareketsiz, fermantatif, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif sonuç veren *Lactococcus* sp. suşları ile çalışılmıştır. Çalışmada *Lactococcus* sp. olarak tanımlanan suşlar besiyerinde küçük, yuvarlak ve beyaz renkli koloniler oluşturmuştur. Suşların kanlı vasatta α -hemoliz

oluşturup içerisinde farklı konsantrasyonlarda (%0-8) NaCl içeren sıvı besiyerinde gelişme gösterdikleri ancak %10 NaCl içeren sıvı besiyerinde gelişemedikleri tespit edilmiştir. Bakteri suşları farklı sıcaklık derecelerinde (4°C-35°C) gelişme göstermiş olup, d-glukoz, fruktoz, galaktoz ve mannitolden asit oluşturdukları ancak sukroz, mannoz, sorbitol ve ksilozdan ise asit oluşturmadıkları tespit edilmiştir.

Suşların ONPG-pozitif olup, amilaz üretimleri ise negatif bulunmuştur. Suşlar ayrıca arjinin dihidrolaz pozitif iken, lizin ve ornitin dekarboksilaz testleri negatif sonuç vermiştir. Çalışma sonuçlarına göre suşlar *Lactococcus garvieae* olarak tanımlanmıştır (Vendrell vd., 2006; Austin ve Austin, 2012). Suşların fenotipik özellikleri Tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 2. *Lactococcus garvieae* suşlarının fenotipik özellikleri

Table 2. Phenotypical characteristics of *Lactococcus garvieae* strains

Özellik	Mevcut çalışma	Austin & Austin (2012)	Vendrell vd. (2006)
Hücre morfolojisi	oval kok	kok	oval kok
Gram boyama	+	+	+
Hareketlilik	-	-	-
Sitokrom oksidaz	-	-	-
Katalaz	-	-	-
O/F	F	F	F
Hemoliz	α	α	α
Sitrat (Simmon's)	-	.	-
Nitrat indirgeme	-	-	-
Metil kırmızısı	+	+	.
Voges-Proskauer	+	+	+
İndol üretimi	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
Glukozdan gaz oluşumu	-	.	.
Büyüme			
0% NaCl	+	+	.
2 % NaCl	+	+	.
4 % NaCl	+	+	.
6 % NaCl	+	+	+
8 % NaCl	+	.	.
10% NaCl	-	.	.
4°C	+	.	+
20°C	+	+	+
30°C	+	+	+

35°C	+	+	+
ADH	+	+	+
LDK	-	.	-
ODK	-	.	-
Niřasta (amilaz)	-	.	.
ONPG	+	.	.
Asit oluşumu			
Laktoz	-	-	(+)
D-Glukoz	+	+	+
D-Fruktoz	+	+	.
Galaktoz	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Sükroz	+	-	D
D-Mannoz	+	+	+
Sorbitol	-	+	-
Rafinoz	-	-	-
İnositol	-	.	-
Arabinoz	-	-	-
D-Ksiloz	-	-	-

+ : pozitif, - : negatif, (+): zayıf ya da yavaş reaksiyon, D: değişken reaksiyon, .: belirtilmemiş, F: Fermentatif, α : alfa hemolitik, ADH: Arjinin dehidrolaz, LDK: Lizin dekarboksilaz, ODK: Ornitin dekarboksilaz, ONPG: Orto-Nitrofenil- β -Galaktozid.

Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları

Antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre, *L. garvieae* suşlarının Ampisilin, Kloramfenikol, ve Tetrasiklin antibiyotiklerine duyarlı oldukları ancak Basitrasin, Flumequin, Furazolidon, Kanamisin, Nalidiksik Asit,

Oksalinik Asit ve Streptomisin'e ise dirençli oldukları tespit edilmiştir (Tablo 3). Suşlar arasında Eritromisin'e değişen derecede direnç tespit edilerek, iki suşun orta dirençli, bir suşun ise hassas olduğu tespit edilmiştir. Suşların Trimetoprim'e ise orta derecede dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Tablo 3. L. garvieae suşlarının standart disk difüzyon testine göre antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.**Table 3. Antimicrobial sensitivity results of L. garvieae strains according to the standard disk diffusion test results.**

Antibiyotikler	Suşlar		
	1	2	3
Ampisilin(10 µg) ^a Zon çapı (mm) H I D ≥17 - ≤16	*H(26)	H(26)	H(27)
Basitrasin	D	D	D
Eritromisin (15 µ) ^a Zon çapı (mm) H I D ≥23 22-14 ≤13	I(22)	H(24)	I(22)
Flumekuın	D	D	D
Furazolidon	D	D	D
Kanamisin	D	D	D
Kloramfenikol (30 µg) ^a Zon çapı (mm) H I D ≥18 17-13 ≤12	H(23)	H(25)	H(27)
Nalidiksik asit	D	D	D
Oksalinik asit	D	D	D
Streptomisin	D	D	D
Tetrasiklin (30 µg) ^a Zon çapı (mm) H I D ≥19 18-15 ≤14	H(24)	H(24)	H(26)
Trimetoprim (5 µg) ^b Zon çapı (mm) H I D ≥50 - ≤21	I(27)	I(25)	I(23)

^aEnterococcus sp. için NCCLS (2003) tarafından bildirilen direnç zon çapları.

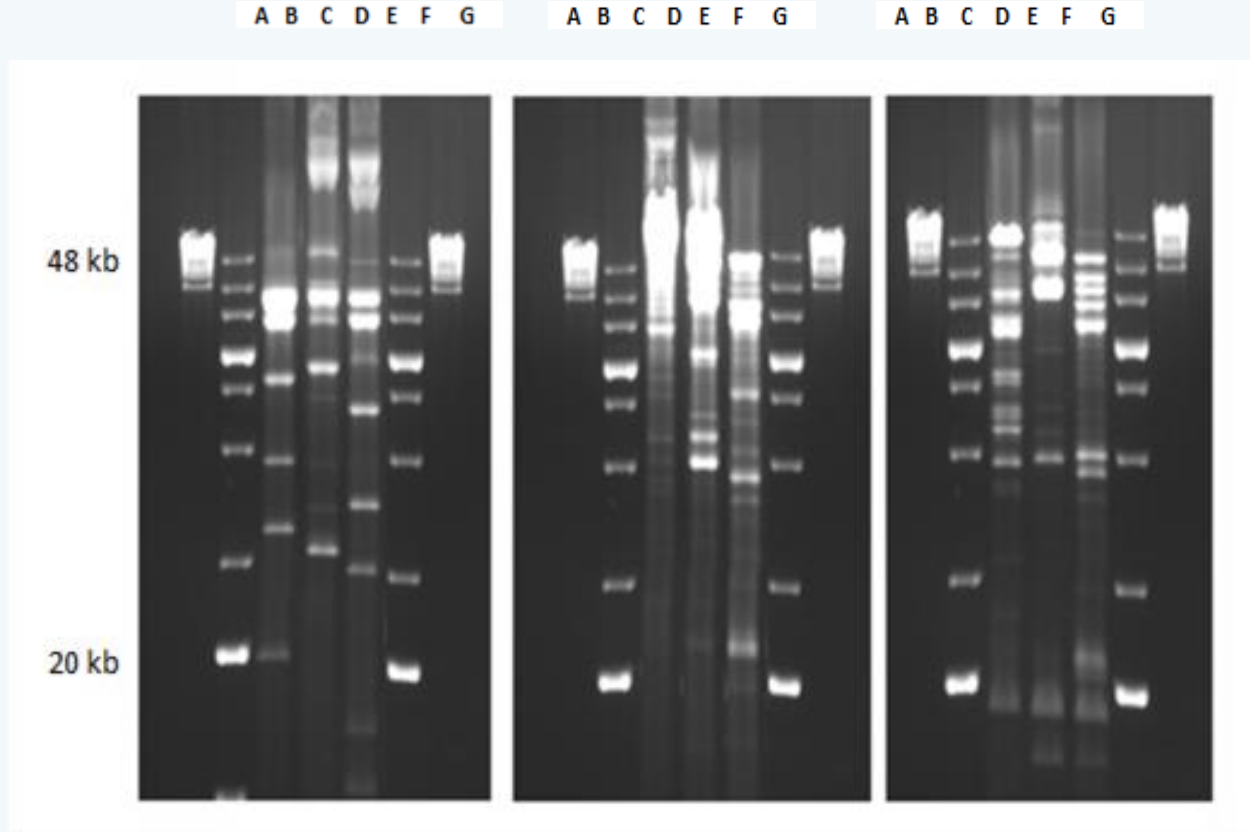
^bEnterococci spp. için EUCAS (2011) tarafından bildirilen direnç zon çapı.

H: Hassas, D: Dirençli, O: Orta derecede dirençli.

Plazmit sonuçları

Yapılan plazmit analiz sonuçlarına göre, *L. garvieae* suşlarının farklı boyutlarda plazmitleri içerdikleri bulunmuştur. Suşların plazmit DNA'ları EcoRI, BamHI ve EcoRV restriksiyon enzimleri ile kesilip agaroz jel elektroforez analizleri incelendiğinde, suşlardan elde edilen plazmitlerden en az birinin diğerlerinden farklı olduğu görülmüştür. Plazmit DNA'ları EcoRI restriksiyon enzimi ile kesildiğinde sadece iki numaralı suşta en üstte tek ürün (36 kb) görülmüştür. EcoRV

restriksiyon enzimi ile kesildiğinde ise bir nolu suşta en üstte iki restriksiyon enzim ürünü (40 kb ve 38 kb) tespit edilirken, iki ve üç nolu suşlarda ise enzim ürünü tespit edilememiştir. Plazmit DNA'ları BamHI restriksiyon enzimi ile kesildiğinde bir nolu suşta 32 kb'lık, iki nolu suşta ise tespit edilememiştir (Şekil 3). Çalışma sonuçlarına göre, plazmit içeren suşların basitrasin, flumekuın, furazolidon, kanamisin, nalidiksik asit, oksalinik asit ve streptomisin'e direnç gösterdikleri de bulunmuştur.



(A: 48kb marker, B: 20kb marker, C:EcoRI (enzim), D: BamHI (enzim), E: Eco RV (enzim),F: 20kb marker, G: 48kb marker).

Şekil 3. Suşların plazmit analiz sonuçları.

Figure 3. Plasmid analysis results of strains.

Tartışma

Çalışma boyunca elde edilen makroskobik bulguların lactococcosis enfeksiyonundan etkilendiği bildirilen balıklarda gözlenen klinik bulgulara benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Vendrell vd., 2006; Savvidis vd., 2007). Çalışmada *Lactococcus garvieae* suşlarının tanımlanması fenotipik tanı yöntemleri ile yapılmıştır. Suşların fenotipik özelliklerinin Vendrell vd. (2006) ile Austin ve Austin (2012) tarafından *L. garvieae* için bildirilen özelliklere benzer özellik gösterdiği bulunmuştur. Su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel enfeksiyonların tedavisi antibiyotikler ile yapılmaktadır. Ancak antibiyotikler çoğu kez etkisiz olmakta ve enfeksiyonun tekrarını önleyememektedir (Menéndez vd., 2007). Mazzolini vd. (2003) *L. garvieae* suşlarının ampisilin, amoksisilin, oksitetrasiklin ve eritromisin'e karşı hassas, flumekuün, oksalinik asit, streptomisin ve trimetoprim'e ise dirençli olduğunu bildirmiştir. Kav ve Erganiş (2008) çalıştıkları *L. garvieae* suşlarının ampisilin, eritromisin, kloramfenikol ve oksitetrasiklin'e hassas olduğunu, suşların basitrasin'e ise direnç gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda *L. garvieae* suşlarının eritromisin, kloramfenikol ve oksitetrasiklin'e hassas olduğu, suşların basitrasin, flumekuün, furazolidon, kanamisin ve oksalinik aside dirençli olduğu bulunmuştur. Bu bulgular Kav ve Erganiş (2008), Mazzolini vd. (2003)'nin bulgularına benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Gökkuşığı alabalıklarında hastalıklara neden olan bakteri türlerinin örneğin *Flavobacterium psychrophilum* (Izumi ve Aranishi,

Sonuç

Bu çalışma sonucunda, Fethiye bölgesindeki gökkuşığı alabalığı işletmelerindeki yavru balıklardan Şubat-Mayıs ayları arasında (su sıcaklığının yükselmeye başladığı dönem) laktokokkozis'in etiyolojik etkeni *L. garvieae* izole ve tanımlanmıştır. Suşların

2004), *Vibrio salmonicida* (Sørum ve Olsuiko, 1998), *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* ve *Yersinia ruckeri* (Toranzo vd., 1993)'nin plazmit analizleri farklı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır. Bununla birlikte, gökkuşığı alabalıklarından izole edilen *L. garvieae* suşlarının plazmit profilleri üzerine sınırlı sayıda çalışma mevcut olup bu çalışmalar R-plazmit aktarımı ile ilgilidir (Maki vd., 2008). Maki vd. (2008) sarı kuyruk balıklarından izole ettikleri *L. garvieae* suşlarında plazmit bulunmadığını bildirmiştir. Bounaix vd. (1996) *L. garvieae*'nin plazmit analizi ile ilgili çalışmalarında bir suшта plazmitin görülmediğini ancak iki suшта plazmit büyüklüklerini 12.5 kb ve 5.1 kb olarak bulduklarını bildirmiştir. Çalışmamızda suşların büyük plazmitlere sahip oldukları ve plazmit büyüklüklerinin 32 kb'den 40 kb'ye kadar değiştiği bulunmuştur. Çalışmamızda Maki vd. (2008) ile Bounaix vd. (1996)'nin çalışmalarından farklı olarak suşların plazmit içerdikleri görülmüştür. Çalışmamızda suşların plazmit DNA'ları EcoRI, BamHI ve EcoRV restriksiyon enzimleri ile kesilip agaroz jel elektroforez analizleri incelendiğinde, bu üç restriksiyon enziminin sadece 1 numaralı suшта plazmiti tespitinde yardımcı olmuştur. Maki vd. (2008) izole ettikleri suşlarda plazmit bulunmadığını, Bounaix vd. (1996) ise bir suшта plazmitin bulunduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda bakteri suşlarının plazmit içermekle birlikte, suşların basitrasin, flumekuün, furazolidon, kanamisin, nalidiksik asit, oksalinik asit ve streptomisin'e direnç gösterdikleri tespit edilmiştir.

ampisilin, tetrasiklin ve kloramfenikol'e hassas, flumekuün, oksalinik asit ve furazolidon'a ise dirençli oldukları tespit edilmiştir. Suşların antibiyotik hassasiyetlerinin diğer ülkelerdeki izolatlardan farklı olduğu bulunmuştur. Bu durumun diğer ülkelerde

hastalığın tedavisinde yoğun antibiyotik kullanımından kaynaklanabileceği gibi diğer bakteri türlerine ait çevresel suşlardan direnç-gen aktarımlarından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, tedavi

Teşekkür

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi(2010.02.0121.010) tarafından desteklenmiştir. Çalışmanın plazmit kısmının

için antibiyotiklerin gelişigüzel kullanımını maddi açıdan dezavantaj olmaktadır. Çalışmada suşların plazmit içerdikleri ve bunun da daha sonraki direnç-gen çalışmaları için faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

analizlerinde yardımlarından dolayı Prof. Dr. Mehmet Karaca, Doç. Dr. Ayşe Gül İnce ve Araş. Gör. Adnan Aydın'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Anderson, D. G., McKay, L. L. (1983). A simple and rapid method for isolation large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol.*, 46(3), 549-552.

Aoki, T., Takami, K., Kitao, T. (1990). Drug resistance in a non-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis Aquat Org.*, 8, 171-7.

Arda, M. (1997). Temel Mikrobiyoloji. Ankara: Medisan Yayın No: 25.

Avcı, H., Aydoğan, A., Tanrıkul, T. T., Birincioğlu, S. S. (2010). Pathological and microbiological investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) naturally infected with *Lactococcus garvieae*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 16, 313-18. DOI: 10.9775/kvfd.2010.2452.

Altun, S., Diler, Ö., Adiloğlu, K. (2004). Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16s RDNA sequencing. *Bull Eur Ass Fish Pathol.*, 24, 119-125.

Austin, B., Austin, D. A. (2012). Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish. UK: Springer.

Bounaix, S., Benachour, A., Geerges, N. (1996). Presence of lactose genes and insertion sequences in plasmids of minor species of the Genus *Lactococcus*. *Appl Environ Microbiol.*, 62(3), 1112-1115.

CLSI (Clinical and laboratory Standards Institute) (2006). Temel Mikrobiyoloji. Ankara: Medisan yayın No: 25.

Çağrgan, H., Tanrıkul, T. T. (1997). A *Lactococcus* in a trout farm. *Mediterranean Fisheries Congress*, İzmir, 40.

Didinen, B. I., Yardımcı, B., Onuk, E. E., Metin, S., Yıldırım, P. (2014). Naturally *Lactococcus garvieae*

infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) new histopathological observations, phenotypic and molecular identification. *Revue Méd Vét.*, 165(1-2), 12-19.

Diler, O., Altun, S., Adiloğlu, K. A., Kubilay, A., Işıklı, B. (2002). First occurrence of streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull Eur Ass Fish Pathol.*, 22, 21-6.

EUCAST, (2011). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.

Fukushima, H. C. S., Bailone R. L., Ranzani Paiva, M. J. T. (2017). Lactococcosis reared fish in Brazil and control strategies. *J Vaccines Vaccin.*, 8, 1-3. DOI: 10.4172/2157-7560.1000357.

Izumi S., Aranishi, F. (2004). Plasmid profiling of Japanese *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *J Aquat Anim Health*, 16, 99-103.

Kav, K., Erganiş, O. (2008). Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52, 223-226.

Kitao, T. (1993). Streptococcal infections. In: Inglis V., Roberts RJ, Bromage NR(ed's). *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Sciences Ltd, Cambridge, UK, 196-210.

Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G., Diler, Ö. (2005). *Lactococcus garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi. *SDU-ESUFD*, 1(1), 39-48.

Kuk, S., Erensoy, A. (2008). Gen klonlama, plazmit seçimi ve *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 uygulamaları. *Türkiye Parazitol Derg.*, 32(1), 16-22.

- Maki, T., Hirano, I., Aoki, I. (2008).** Drug resistance mechanism of the fish pathogenic bacterium *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis.*, 31, 461-468.
- Mazzolini, E., Vismara, D., Ceschia, G., Malvisi, J., Fabris, A., Passera, A., Danielis, L., Giorgetti, G. (2003).** In vitro activity of several chemiantibiotics against clinical isolates of fresh and marine fish pathogens. *Appl Environ Microbiol.*, 77, 2114-2185.
- Menéndez, A., Fernandez, L., Reimundo, P., Guijarro, J. A. (2007).** Genes required for *Lactococcus garvieae* survival in a fish host. *Microbiology*, 153, 3286-3294.
- Meyburgh, C. M., Bragg, R. R., Boucher, C. E. (2017).** *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Dis Aquat Org.*, 123 (1), 67-79. DOI: 10.3354/dao03083.
- NCLS (2003).** Disk Difüzyon Ek Tablolar, M100-S13 (M2). İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti.
- Öztürk, T., Didinen, B. I., Doğan, G., Özer, A., Bircan, R. (2009).** Gökkuşluğu alabalığında, (*Oncorhynchus mykiss*, W., 1792) lactococcosis hastalığı ve *Lactococcus garvieae*'nin antibakteriyel duyarlılığı. *Ulusal Su Günleri 2009 Sempozyumu*, Elazığ.
- Pridgeon, J. W., Klesius, P. H. (2012).** Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews*, 7 (48), 1-16. DOI: 10.1079/PAVSNNR20127048.
- Savvidis, G. K., Anatoliotis, C., Kanaki, Z., Vafeas G. (2007).** Epizootic outbreaks of lactococcosis disease in rainbow trout, *O. mykiss* (Walbaum), culture in Greece. *Bull Eur Ass Fish Pathol.*, 28(5), 223-8.
- Seeley, W., VanDemark, P. J., Lee, J. J. (1991).** *Microbes in Action. A Laboratory Manual of Microbiology.* New York: W. H. Freeman and Company.
- Shin, G. W., Palaksha, H. H., Yang, Y. S., Shin, Y. S., Kim, Y. R., Lee, E. Y., Kim, H. Y., OH, M. J., Yoshida, T., Jung, T. S. (2006).** Discrimination of streptococcosis agents in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Bull Eur Ass Fish Pathol.*, 26, 68-79.
- Soorum, H., Olsuiko, P. (1998).** Plasmids in *Vibrio salmonicida* isolated from salmonids with haemorrhagic syndrome (Hitra disease). *J Clin Microbiol.*, 26(9), 1679-1683.
- Timur, G., Timur, M. (2003).** *Balık Hastalıkları.* İstanbul: İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayın No: 5.
- Toranzo, A. E., Combarro, P., Lemas, M. L., Barja, J. L. (1994).** Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured rainbow trout. *Appl Environ Microbiol.*, 48(4), 872-877.
- Türe, M., Alp, H. (2016).** Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. *J Vet Res*, 60, 141-6. DOI: 10.1515/jvetres-2016-0020.
- Vendrell, D., Balcazar, J. L., Ruiz-Zarzuola, I., de Blas, I., Girones, O., Muzquiz, J. L. (2006).** *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immun Microbial Infect.*, 29, 177-198.