

## ***Lactococcus garvieae* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi**

Ayşegül KUBİLAY<sup>1</sup> Soner ALTUN<sup>1</sup> Gülşen ULUKÖY<sup>2</sup> Öznur DİLER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Eğirdir/ISPARTA

<sup>2</sup>Muğla Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü MUĞLA

### **ÖZET**

Bu çalışmada, 9 farklı *Lactococcus garvieae* suşlarının Mueller-Hinton agarda disk diffüzyon tekniği ile ATB VET (Biomerieux 14 289) strip sistemi kullanılarak antimikrobiyal duyarlılıklarının yanısıra E testi (AB BIODISK) ile de Eritromycin antibiyotikliğinin MİK (Minimal inhibitör konsantrasyonu) değerleri incelenmiştir. *L.garvieae* suşlarının; disk diffüzyon testi ve ATB VET sistemine göre Amoxicillin+clavulanic acid, Ampicillin, Enrofloxacin, Vancomycin, Tetracycline, Doxycycline, Chloramphenicol, Erytromycine, Nitrofurantoin, Cephalotin, Amoxicillin, Cefoperazon, Spectinomycin, Pristinamycin, Cotrimoxazol, antibiyotiklerine duyarlı oldukları, Kanamycin, Cefuroxime, Lincomycin, Penicillin, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin Ceftriaxone, Clindamycine, Vancomycin, Oxacillin, Streptomycin, Trimethoprim+ Sulfamethoxazole, Gentamicin, Apramycin, Tylosin, Colistin, Sulfamethizol, Flumequin, Oxolinic asit antibiyotiklerine dirençli oldukları tespit edilmiştir. *L. garvieae* suşlarında eritromisin antibiyotikliğinin MİK değerleri 0,032-0,125 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu değerlere göre; suşların eritromisine duyarlı olduğu görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** *Lactococcus garvieae*, antimikrobiyal duyarlılık, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK),

## **The Determination of Antimicrobial Susceptibilities of *Lactococcus garvieae* Strains**

### **ABSTRACT**

This study was to investigated antimicrobial susceptibilities by disc diffusion method on Mueller-Hinton agar and ATB VET (14 289 Biomerieux) strip system and also the value the minimum inhibitory concentration (MIC) of Eritromycine antibiotic by Etest (ABBIODISK) in 9 strains of *Lactococcus garvieae*. *L.garvieae* strains were determined as sensitive to Amoxicillin+clavulanic acid, Ampicillin, Enrofloxacin, Vancomycin, Tetracycline, Doxycycline, Chloramphenicol, Erytromycine, Nitrofurantoin, Cephalotin, Amoxicillin, Cefoperazon, Spectinomycin, Pristinamycin, Cotrimoxazol, and resistant to Kanamycin, Cefuroxime, Lincomycin, Penicillin, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin Ceftriaxone, Clindamycine, Vancomycin, Oxacillin Streptomycin, Trimethoprim+ Sulfamethoxazole, Gentamicin, Apramycin, Tylosin, Colistin, Sulfamethizol, Flumequin, Oxolinic acid by disc diffusion method and ATB VET (14 289 Biomerieux) strip system. MIC values of Eritromycin antibiotic were obtained as 0.032-0.125 µg/mL in *L. Garvieae* strains. The values showed to sensitive of eritromycine antibiotic for all strains.

**Key words:** *Lactococcus garvieae*, antimicrobial susceptibilities, minimum inhibitory concentration (MIC)

## GİRİŞ

*Lactococcus garvieae* 1974 yılında Japonya’da sarıkuşuk balıklarında epizootikler oluşturarak yüksek mortaliteye sebep olmuştur (Ksuda ve ark., 1991; Ksuda ve Salati, 1999; Austin ve Austin 1999). *Lactococcus garvieae* (=Synonime *Enterococcus seriolicida*)’nin etken olduğu enfeksiyonlar (Streptococcosis veya Lactococcosis) dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki tatlı su ve deniz balığı türlerinde yaygın olarak görülmektedir (Ksuda and salati 1999 ; Chen ve ark., 2001 ; Eldar ve Ghittino 1999; Toranzo ve ark. 1994 ; Nieto ve ark. , 1995 ; Salati ve ark. , 1996 ; Muzquiz ve ark. , 1999 ; Austin ve Austin , 1999).

*L.garvieae* gökkuşağı alabalıklarında İspanya, İtalya, Portekiz, İngiltere, Fransa , Avustralya, Güney Afrika ve Asya ülkelerinde de rapor edilmiştir (Bragg ve Brroero, 1986; Ceschia ve ark.,1992; Carson ve ark. 1993; Eldar ve ark. , ; Eldar ve Ghittino, 1999; Chang ve ark. 2002; Ravelo ve ark., 2001).

Streptococcosis enfeksiyonları ülkemizde ise 2001 yılında Ege bölgesindeki gökkuşağı alabalıkları işletmelerinde görülerek yüksek mortaliteye sebep olmuştur (Çağırğan ve Tanrikul 1997; Diler ve ark. , 2002; Altun ve ark. 2004). Ülkemizde gökkuşağı alabalığı işletmelerinde son yıllarda ortaya çıkan *L. garvieae*’ nin etken olduğu streptococcosis enfeksiyonlar hızlı bir yayılım göstermekte ve ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

*L.garvieae*’nin sebep olduğu streptococcosis enfeksiyonu hemorjik septisemi ile karakterize sistemik bir enfeksiyondur. (Ksuda ve Salati, 1999; Austin ve Austin 1999) Bu hastalığın kontrolünde profilaktik tedbirlerin alınması oldukça önem taşımaktadır.

Ancak hastalığın ortaya çıktığı işletmelerde hastalığın sağaltımı amacıyla antimikrobiyal maddelerin kullanılması gereklidir. Özellikle porsiyonluk balıklarda bu enfeksiyonun görülmesi halinde enfeksiyona karşı zamanında uygun

antibiyotik ve doz kullanımı önem taşımaktadır. Çünkü balık etinde oluşacak rezidü ve bakterinin direnç geliştirebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu hastalığa karşı gerek koruyucu amaçla gerekse sağaltım için kullanılacak antimikrobiyal ilaçların spesifik hastalık etkenine karşı olan bakteriostatik ve bakterisidal etkisinin çok iyi belirlenmesi ve uygun antibiyotığın seçilerek yeterli sürede ve dozda bir program dahilinde kullanılması gereklidir. Bu nedenle ülkemizde yaygın olarak görülen *L.garvieae*’nin sebep olduğu streptococcosis vakalarına karşı antimikrobiyal duyarlılık belirlenmesi ve uygun tedavinin seçilmesi önem arz etmektedir. Gram pozitif *L. garvieae*’nin antibiyogram sonuçları yapılmış olmakla birlikte ülkemizden izole edilen suşlar için etkili antibiyotığın belirlenmesi için detaylı bir araştırma yapılmamıştır.

Streptococcosis gökkuşağı alabalıklarında her boyda (porsiyonluk ve anaçlar dahil) yüksek mortaliteye neden olması sebebiyle balık işletmelerinin ekonomik kayıpları büyük olmaktadır. Hastalığın sağıtımında en etkin yol etken patojene karşı antibiyogram yaparak en etkili antibiyotığı tespit etmektir.

Bu çalışmada ülkemizde gökkuşağı alabalığı işletmelerinden izole edilmiş olan *Lactococcus garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılığının disk difüzyon tekniği, ATB VET (Biomerieux 14 289) strip sistemi, gibi farklı metotlar kullanılarak belirlenmesi ile bu patojen için duyarlı ve dirençli olduğu antibiyotikler ve Eritromisin için E testi (AB BIODISK) kullanılarak MİK değerlerinin saptanması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Araştırmada Kullanılan Bakteriye Suşlar

Araştırma materyali olarak kullanılan 9 *Lactococcus garvieae* suşu ve kökenleri Çizelge 1’ de verilmiştir.

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan *Lactococcus garvieae* suşları

No	Suş	Köken (Tür,Ülke)	İzolasyon yılı
1	A <sub>3</sub>	Gökkuşağı alabalığı,Antalya,Türkiye	2001
2	B <sub>1</sub>	Gökkuşağı alabalığı,Isparta,Türkiye	2003
3	279-00	Gökkuşağı alabalığı,İspanya	2000
4	00-21	Gökkuşağı alabalığı, İngiltere	2000
5	NCDO-2155	Mastit, ATCC43921,İngiltere	1973
6	K <sub>1</sub>	Gökkuşağı alabalığı,Konya,Türkiye	2001
7	C <sub>1</sub>	Gökkuşağı alabalığı,Muğla,Türkiye	2001
8	M <sub>1</sub>	Gökkuşağı alabalığı,Muğla,Türkiye	2001
9	D <sub>1</sub>	Gökkuşağı alabalığı,Denizli,Türkiye	2001

### *L. garvieae* suşlarının üretimi ve depolanması

Araştırmada kullanılan *L.garvieae* izolatları triptik soy broth (Merck) sıvı besiyeri kullanılarak 25 °C’de 24 saatte inkübe edilerek üretilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda

ortama %15 Gliserin (Sigma, ABD) eklenmiş, bu kültür ortamı 2 mL olacak şekilde steril tüplere dağıtılmış ve uzun süreli saklama amacıyla (3-6 ay), -80 °C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

İzolatların, testlerde kullanımı için -80°C'den alınan stok kültür ortamı oda sıcaklığında bekletildikten sonra TSA (Trypticase Soy Agar) besiyerlerine ekilerek 25°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edilerek hazırlanmıştır.

İnkübasyon sonucunda, *L.garvieae* suşları yatık TSA tüplerine ekilmiş ve 25°C'de 24-48 saat süreyle üretim amacıyla inkübasyona alınmıştır. Daha sonra +4°C'de günlük kullanım amacıyla saklanmıştır.

#### **Antimikrobiyal hassasiyet testleri için bakteri süspansiyonunun hazırlanması**

Triptik soy broth (Merck) hazırlanarak çalışmada kullanılan suşların stok kültürlerinden ekim yapılarak 25°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda ticari Mc Farland tüpleri kullanılarak bakteri süspansiyonlarının bulanıklığı serum fizyolojik ile Mc Farland 0.5 bulanıklığına denk olacak şekilde ayarlanmıştır.

#### ***L.garvieae* suşları için hassasiyet testleri**

Kullanıma uygun halde hazırlanan bakteri suşlarının antimikrobiyal hassasiyetin tespiti için, çeşitli antibiyotikler ile disk difüzyon testi, ATB VET sitrip sistemi ve E testi uygulanmıştır.

#### **Disk difüzyon metodu**

*L. garvieae* suşları için belirli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş hazır disklerle uygulanan disk difüzyon metodu kullanılmıştır.

Mc Farland 0,5 (Biomerieux sa 70 900) bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan Müller Hinton Agar (Merck) besiyerine 0,1 ml miktarında konularak yayılmıştır. Süspansiyon, tüm besiyeri üzerine kaplayacak şekilde steril eküvyon ile dağılması sağlanmıştır. Daha sonra laminar flowda, petri kuruması için 5-10 dk bırakılmıştır. Daha sonra agarın yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda değişik antibiyotikler içeren diskler steril pens ile yerleştirilerek 25°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Arda, 1997).

İnkübasyon sonucunda inhibisyon zonlarının çapı milimetrik cetvel ile ölçülmüştür. Test sonuçları, suşlar için hassas (S) ve dirençli(R) olarak NCCLS'in kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

#### ***L.garvieae* suşlarının ATB VET ile antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi**

*L.garvieae* suşları TSA da gençleştirildikten sonra %0.85 lik NaCl içeren ortamda süspense edilmiş ve bu bakteri süspansiyonu McFarland 0,5 e eşit bir bulanıklıkta hazırlanmıştır. Bu solüsyon ATB S mediumu içeren bir ampule 200 µl otomatik pipet ile inokule edilmiştir. Daha sonra ATB VET striplerinde her bir çukura 135 µl inokule edilmiştir. Stripler 25 °C' de 24 saat inkübe edildikten sonra

çukurlarda görülen berraklık duyarlı, bulanık ise resistant dirençli olarak değerlendirilmiştir.

#### **Epsilometre testi (E Testi)**

E testi, *L. garvieae* suşlarının eritromisin antibiyotiği için MİK ( Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) seviyelerini ölçmek için kullanılmıştır.

Bu çalışma ile 9 *L.garvieae* suşlarının eritromisin antibiyotiği için MİK seviyelerinin E testi (AB Biodisk) ile tespiti yapılmıştır. E testi şeritleri 0.016-256 µg/mL aralığında antibiyotik içermektedir. E testini gerçekleştirmek için öncelikle Mc Farland 0.5 bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu, Müller Hintonlu (Merck) besiyeri bulunan petrilere yayılmıştır. Bakteri süspansiyonu besiyeri üzerine kaplayacak şekilde steril eküvyon ile dağılması sağlanmıştır. Daha sonra laminar flowda, petri kuruması için 5-10dk bekletilmiştir. Daha sonra E testi şeritleri petrilere yerleştirilmiş ve 25°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonucunda, bakteri üremesinin inhiye olduğu şerit üzerindeki değer, NCCLS'nin kriterlerine göre test edilen bakteri suşunun, eritromisin için MİK seviyesi olarak kabul edilmiştir.

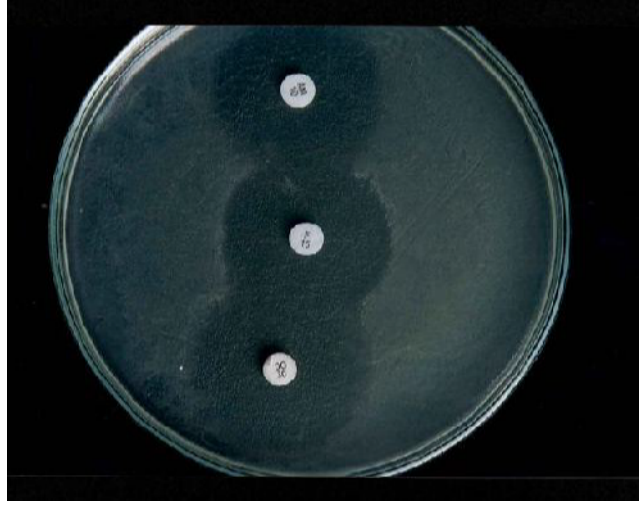
#### ***L.garvieae*'nin biyokimyasal ve kültürel özellikleri**

*L.garvieae* nin biyokimyasal özellikleri Holt ve ark., 1994; Cowan ve Steel, 1970; Collins ve Lyne, 1976; Koneman ve ark, 1997 göre belirlenmiştir. İzolatlarda Gram boyama, hareketlilik, katalaz testi, sitrat kullanımı Voges Proskauer reaksiyonu %0.0, %3.0, %6.0, % 6.5, %8.0 NaCl, pH 5, 6, 9.6 ve 4, 10, 22, 30, 37 ve 45 °C de büyüme özelliklerine bakılmıştır. Hemolitik özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca Rapid ID 32 Strep System (Bio Merieux, France) kullanılarak fenotipik özellikleri belirlenmiştir.

#### **BULGULAR**

#### ***L.garvieae* suşlarının disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları**

*L.garvieae* suşlarının disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları çizelge 2 de verilmiştir. Antibiyogram testinde duyarlı olan antibiyotiklerde bir inhibisyon zonu oluşmuştur (Şekil 1). *L.garvieae* suşlarının disk difüzyon testinde Amoxicillin+clavulanic acid, Ampicillin, Enrofloxacin, Vancomycin, Tetracycline, Doxycycline, Chloramphenicol, Erytromycine, Nitrofurantoin, Cephalotin antibiyotiklerine duyarlı oldukları, Kanamycin, Cefuroxime, Lincomycin, Penicillin, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin Ceftriaxone, Clindamycine, Vancomycin, Oxacillin Streptomycin, Trimethoprim+ Sulfamethoxazole antibiyotiklerine dirençli oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 1. *L.garvieae* suşunda antibiyogram testi

Çizelge 2. *L.garvieae* suşlarının disk diffüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotikler	Sensitivity ; R: resistans S: sensitiv e (Zon çapı: mm)								
	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6	No:7	No:8	No:9
Kanamycin (30mcg)	R(12)	R(10)	R(12)	R(12)	R(13)	R(10)	R(10)	R(12)	R(10)
Cefuroxime (30mcg)	R(8)	R(12)	R(12)	R(16)	R(14)	R(12)	R(14)	R(16)	R(8)
Lincomycin (2mcg)	R(16)	R(14)	R(14)	R(14)	R(16)	R(12)	R(14)	R(14)	R(10)
Amoxicillin+clavulanic acid (20mcg+10mcg)	S(20)	S(30)	S(22)	S(28)	S(24)	S(28)	S(18)	S(22)	S(20)
Penicilin (10 units)	R(17)	R(14)	R(14)	R(13)	R(14)	R(13)	R(12)	R(14)	R(13)
Enrofloxacin (5mcg)	S(24)	S(24)	S(26)	S(26)	S(26)	S(24)	S(22)	S(28)	S(24)
Ofloxacin (5mcg)	R(12)	R(14)	I(16)	I(20)	R(14)	R(14)	I(20)	S(26)	R(14)
Norfloxacin (10mcg)	R(6)	R(12)	R(16)	R(12)	R(16)	R(14)	R(14)	R(14)	R(14)
Ciprofloxacin (5mcg)	R(14)	R(14)	R(16)	R(18)	R(20)	R(14)	R(20)	R(14)	R(20)
Ampicillin (10mcg)	S(28)	S(28)	S(30)	S(30)	S(28)	S(28)	S(26)	S(28)	S(28)
Ceftriaxone (30mcg)	R(18)	R(14)	R(10)	R(20)	R(18)	R(12)	R(16)	R(16)	R(14)
Clindamycine (2mcg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
Vancomycin (30mcg)	S(16)	S(20)	S(20)	S(20)	S(10)	S(22)	S(16)	S(16)	S(18)
Treptomycin (10mcg)	R(6)	R(6)	R(10)	R(10)	R(10)	R(10)	R(6)	R(10)	R(10)
Oxacillin (1mcg)	R(10)	R(6)	R(10)	R(10)	R(10)	R(6)	R(10)	R(12)	R(10)
Tetracycline (30mcg)	S(24)	S(24)	S(26)	S(20)	S(20)	S(20)	S(20)	S(20)	S(22)
Doxycycline (30mcg)	S(30)	S(18)	S(20)	S(26)	S(18)	S(26)	S(28)	S(24)	S(24)
Trimethoprim+Sulfamethoxazole (1,25 µg +23,7 µg )	R(8)	R(10)	R(10)	R(10)	R(6)	R(10)	R(10)	R(10)	R(8)
Chloramphenicol (30mcg)	S(24)	S(26)	S(26)	S(20)	S(18)	S(20)	S(22)	S(22)	S(24)
Erytromycine (15mcg)	S(28)	S(26)	S(28)	S(28)	S(22)	S(28)	S(24)	S(26)	S(20)
Nitrofurantoin (300mcg)	S(24)	S(20)	S(24)	S(18)	S(18)	S(26)	S(24)	S(24)	S(26)
Cephalotin (30mcg)	S(20)	S(18)	S(18)	S(24)	S(20)	S(18)	S(20)	S(18)	R(18)

#### ***L.garvieae* suşlarının ATB VET testine göre antibiyotik duyarlılıkları**

*L.garvieae* suşlarının ATB VET test stripleriyle yapılan antimikrobiyal duyarlılıkları ile ilgili sonuçlar çizelgede verilmiştir. *L.garvieae* nin 9 suşu ATB VET testi sonuçlarına göre Amoxicillin, Amox-clav.ac, Cefoperazon, Cephalothin,

Spectinomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Doxycyclin, Erythromycin, Pristinamycin, Cotrimoxazol, Enrofloxacin, Nitrofurantoin, antibiyotiklerine duyarlı olduğu, Penicillin, Oxacillin, Streptomycin, Kanamycin, Gentamicin, Apramycin, Lincomycin, Tylosin, Colistin, Sulfamethizol, Flumequin, Oxolinic asit antibiyotiklerine karşı dirençli

oldukları saptanmıştır. Fusidic asit antibiyotikğine No 1 suşu duyarlı, Rifampicin antibiyotikğine No 1-3 suşları duyarlı, Metronidazol antibiyotikğine No1 ve No 3 duyarlı iken diğer suşlar dirençli olduğu gözlenmiştir.

***L.garvieae* suşlarının E testine (AB BIODISK) göre antibiyotik duyarlılıkları**

*L.garvieae* suşlarının E testine (AB BIODISK) göre antibiyotik duyarlılık sonuçları çizelge 4 te verilmiştir.

Eritromicin antibiyotikğinin E testi striplerin kenarında oval inhibisyon zonunun keşiştiği noktadaki değeri MIK değeri olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). *L. garvieae* nin 9 suşunun eritromisin antibiyotikğinin MIK değeri 0,032-0,125 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4). Bu değeri bütün suşlar için eritromisin antibiyotikğine duyarlı olduğunu göstermiştir.

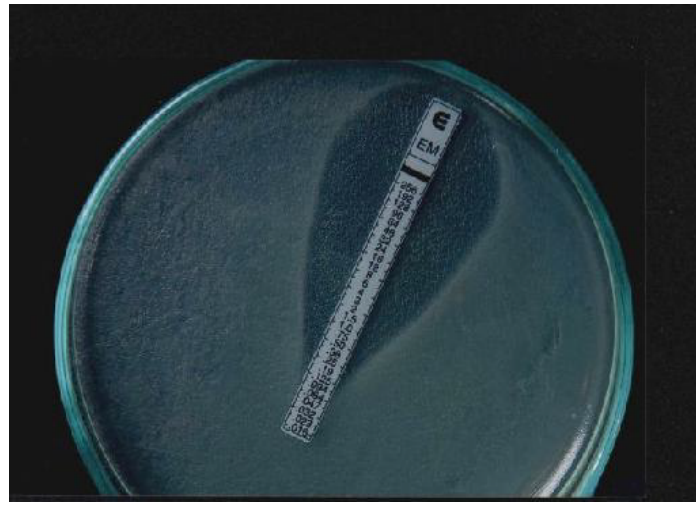
Çizelge 3. *L.garvieae* suşlarının ATB VET testine göre antibiyotik duyarlılıkları

Antibiotikler	(mg/l)	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6	No:7	No:8	No:9
Penicillin	0,25	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amoxicillin	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Amox-clav.ac	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Oxacillin	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cephalothin	8	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cefoperazon	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Streptomycin	8	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Spectinomycin	64	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kanamycin	8	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicin	4	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Apramycin	16	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Chloramphenicol	8	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tetracyclin	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Doxycyclin	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Erythromycin	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lincomycin	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Pristinamycin	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tylosin	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Colistin	4	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cotrimoxazol	2/38	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sulfamethizol	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Flumequin	4	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Oxolinic ac.	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Enrofloxacin	0,5	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Nitrofurantoin	25	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Fusidic ac.	2	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampicin	4	S	S	S	R	R	R	R	R	R
Metronidazol	4	S	R	S	R	R	R	R	R	R

S:Duyarlı ( sensitive), R: Dirençli ( resistant)

Çizelge 4. *L.garvieae* suşlarının E testine(AB BIODISK) göre antibiyotik duyarlılıkları

Suş No:	MIK ( $\mu\text{g/mL}$ )	Duyarlılık(sensitivity)
1	0,094	S
2	0,064	S
3	0,047	S
4	0,125	S
5	0,047	S
6	0,094	S
7	0,125	S
8	0,094	S
9	0,032	S



Şekil 2. *L.garvieae* suşlarının E testinde (AB BIODISK) oluşan elips inhibisyon zonu

#### ***L.garvieae*'nin Biyokimyasal ve Kültürel Özellikleri**

Türkiyenin çeşitli bölümlerinden izole edilen ve İngiltere İspanya ve ATCC *L. garvieae* suşlarının biyokimyasal özellikleri çizelge 5-6 da verilmiştir. Bütün izolatlarda VP, PRYA, ADH, APPA,  $\beta$ -glucosidase pozitif, oksidaz, katalaz,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase, PAL, GTA ve üreaz negatif olduğu saptanmıştır. İzolatların hiç biri nişasta ve jelatini hidrolize etmemiştir. Tüm izolatlar glucose, fructose,

galactose, mannitole, saccharose, esculin, ribose, trehalose, maltose, tagatose, methyl-  $\beta$ -D glycopyronoside dan asit üretmiştir. İzolatlar nutrient agar, bile esculin azide agar, tripticase soy agar, brain heart infusion agar and Mac Conkey agar da üremişlerdir. *L. garvieae* 4 ve 45 °C'de %3, %6, %6.5 NaCl de ve pH 5, 6 ve 9.6 üremişlerdir. Bütün izolatlar kanlı agarda  $\alpha$ -hemolysis oluşturmuştur. Çizelge 5-6 da görüldüğü gibi referans suş (NCDO 2155) ile aynı karakteristik özellikleri göstermişlerdir.



Çizelge 6. *L.garvieae* suşlarının Rapid ID 32 Strep test sisteminde fenotipik özellikleri

Rapid ID 32 Strep System testi	No:1	No:2	No:3	No:4	No:5	No:6	No:7	No:8	No:9
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PRYA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ - galactosidase( $\beta$ GAR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ - galactosidase( $\beta$ GAL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ NAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APPA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of Hippurate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetoin Production	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Acid from									
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyclodextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pullulan	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-B-D Glucopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tagatose	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ADH, arginine dihidrolase; PYRA, pyrrolidonil arylamidase; PAL, alkaline phosphatase;  $\beta$ NAG, N-acetyl- $\beta$ -glucosamidase;

APPA, alanine phenylalanine proline arylamidase; GTA, glycylyl tryptophan arylamidase. Symbols: + pozitif, - negatif.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Yetiştiricilikte bakteriyel hastalıkların kontrolü için iyi yönetim ve çevresel şartlar ve koruyucu önlemlere ihtiyaç vardır. Aşı geliştirmede büyük emekler harcanmaktadır. Bazı hastalıklarda henüz etkili aşı mevcut değildir. Balık hastalıklarının kontrolün hala antimikrobiyal bileşenler temel oluşturmaktadır. Akuakültürde ilaçların yoğun kullanımı balık patojenlerinde akuatik bakterilerde antibiyotik direncin yoğunluğunu artırmaktadır. Bazı ilaç dirençleri plazmid kodludur böylece diğer bakterilere kolayca nakledilebilir.

*L. garvieae* nin sebep olduğu Streptococcosis gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde önemli bir problemdir. Bu hastalık işletmelerde 15°C nin üzerindeki sıcaklıklarda büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. *L. garvieae* suşları arasında fenotipik özelliklerinde homojenite görülmüştür.

*L. garvieae* tatlısu ve deniz balıklarında meningocephalitis ve septisemiye neden olan Gram pozitif özellikte önemli bir patojendir (Eldar ve ark 1996) Türkiye’de 2001 yılında ortaya çıkan epizootiklerden sonra hızlı bir yayılım göstererek önemli seviyede ekonomik kayıplara neden olmuştur (Diler ve ark. 2002, Altun ve ark. 2004). Hastalığın kemoterapotiklerle tedavisi mümkündür. Ancak tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gelişimi balık dokularında rezidü oluşturması ve tedavi masraflarının yüksekliği gibi nedenler kemoterapotiklerin kullanımında uygun duyarlı antibiyotiğin seçilmesi ve kullanılması önem arz etmektedir. Bu çalışma ülkemizde *L. arvieae* bakterisinin antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi bu hastalığın işletmelerde sağlım için uygun antibiyotiğin kullanımı için bilgiler sağlaması açısından önem



taşımaktadır. *L.garvieae*'ye karşı gökkuşağı alabalıklarında uygun antibiyotiğin kullanılması *L.garvieae*'ye karşı direnç gelişimi önlenebileceği gibi hastalığın nüksleride azaltılabilir.

Çalışmada incelenen *L.garvieae* suşlarının biyokimyasal kültürel ve fizyolojik karakterleri Eldar ve ark. (1999) Ravelo ve ark. (2001) nin araştırmaları ile benzerlik göstermiştir.

Elliott ve Facklam (1996), yaptıkları araştırmada insandan izole edilen *L.garvieae* patojeninin klindamisine antibiyotiğine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada da Türkiyeden izole edilen ve referans suşlar olan ATCC 43926, İngiltere ve İspanya suşlarının klindamisine dirençli olduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacılar *L.garvieae* nin penicilin ve cephalotine karşı *L. Lactis*'ten daha az duyarlı olduğunu saptamışlardır.

*L.garvieae*; ampicillin, cefuroxime, cephalotin, chloramphenicol, ciprofloxacin, erytromycin fusidic acid, methicillin, mezlocillin, nitrofurantoin, penicillin, potentiated sulphamide, tetracycline ve vankomisine duyarlı amikacin, colistin, gentamicin nalidixic acide dirençli olarak bildirilmiştir. (Austin ve Austin 1999). Erytromycin 25 mg/kg balık /gün dozunda 4 ile 7 gün süreyle kullanımı ile sarı kuyruk balıklarında streptococcosis 'in kontrol altına alındığını ve oxytetracycline ve ampicilinden, daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Doxycycline 20 mg/lit balık ağırlığı/gün ve josamycin 30 mg/kg balık ağırlığı gün olarak 3 gün destekleyici olmuştur. Sodium nifurstyrenate 50mg/kg balık ağırlığı /gün olarak streptococcosis için kullanıldığı bildirilmiştir. Bu ilaçların etkili olduğu ve plazmidlere ait bir direnç probleminin olmadığı bildirilmiştir (Austin ve Austin 1999).

Enterekokkal enfeksiyonların tedavisinde sodium nifurstyrenate *in vitro* ve *in vivo* şartlarda aminobenzyl penicillin, chloramphenicol ve tetracycline den daha etili olduğu bildirilmiştir. Eritromisin kültüre edilen sarıkuyruk balıklarının tedavisinde daha iyi sonuçlar göstermiştir. Eritromisin ve spiramisiin hastalığın kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır fakat 10 kez *in vivo* seri pasajlarından sonra ilaç dirençliliği oluşmaktadır. Josamisin balık üzerine zararlı bir yan etkisi ve intestinal floraya etkisi olmadığı için faydalı bir kemoteropatik olarak bildirilmiştir.

Eritromisin ve josamisiinin sahada tedavi çalışmalarında iyi sonuçlar alınmaktadır. Ancak işletmelerde tedavi sırasında iyi bir besleme, hijyenik şartlar ve stok yoğunluğunun düzenlenmesi gerekmektedir. Suşlarda ilaç dirençliliğinin görülmesinden dolayı sahada gelişen güzel kemoteropatik kullanımından kaçınılması gerekir (Kusuda ve Salati 1999).

Kum ve ark. (2004) *L.garvieae* nin deneysel olarak yaptıkları sağaltımında ampicilin'in eritromisin, oksitetrasiklin ve amoksisilinden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Mazzolini ve ark. (2003) Kuzey İtalya daki klinik izolatlardan elde edilen *L.garvieae* suşlarının ampicilin, amoxycilin, oxytetracyclin ve eritromycine karşı duyarlı olduğunu , flumequine, oxolonic acid, streptomycin,

trimetoprim ve sulphadiazine dirençli olduğunu saptamıştır. *L.garvieae* suşlarında yapılan bu çalışmada da ampicilin, amoxycilin, oxytetracyclin ve eritromycine karşı duyarlı olduğu, flumequine, oxolonic acid, streptomycine ve trimetoprim antibiyotiklerine dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Diler ve ark.(2002) *L.garvieae* suşları için yaptıkları antibiyogram çalışmaları sonucunda penicillin,clindamycin ,cefriaxon antibiyotiklerine dirençli eritromycin, tetracycline, ofloxacin, ampicillin ve chloromphenicol antibiyotiklerine duyarlı olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Diler ve ark. (2002) sonuçları ile benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Bu çalışmada *L.garvieae* suşlarının disk diffüzyon testi ve ATB-VET sitrip sistemine göre Amoxicillin+clavulanic acid, Ampicillin, Enrofloxacin, Vancomycin, Tetracycline, Doxycycline, Chloramphenicol, Erytromycine, Nitrofurantoin, Cephalotin, Amoxicillin, Cefoperazon, Spectinomycin, Pristinamycin, Cotrimoxazol, antibiyotiklerine duyarlı oldukları, Kanamycin, Cefuroxime, Lincomycin, Penicillin, Enrofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin Ceftriaxone, Clindamycine, Vancomycin, Oxacillin Streptomycin, Trimetoprim+Sulfamethoxazole, Gentamicin, Apramycin, Tylosin, Colistin, Sulfamethizol, Flumequin, Oxolonic asit antibiyotiklerine dirençli oldukları tespit edilmiştir.

*L. garvieae* suşlarında eritromisin antibiyotiğinin MİK değerleri 0.032-0.125 µg/mL olarak tespit edilerek bu değerlerin bütün suşlar için eritromisin antibiyotiğinin duyarlı olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak balık hastalıklarında tedavi sırasında; etken izolasyonu ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin hızlı bir şekilde yapılması, tedaviye hastalığın başlangıç döneminde etkili antibiyotikler kullanılarak başlanması, ilaç dirençliliğinin önüne geçilmesi için gelişen güzel antibiyotik kullanımının engellenmesi gerekmektedir.

#### KAYNAKLAR

- Altun S, Diler O , Adiloğlu AK (2004). Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16S rDNA sequencing. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol 24,119-125.
- Arda, M.,(1997) Temel Mikrobiyoloji. Medisan yayın seri No :25.Ankara.490s.
- Austin B, Van Pouce A (1993). A Gram-positive lactic-acid bacterium causing steady mortalities in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, in the UK. Bull.Eur.Assoc.Fish Pathol. 13,114-118.
- Austin, B., Austin, D.A. (1999) Bacterial fish pathogens disease of farmed and wild fish third (Revised) Edition. Praxis Publishing Chichester, U.K., 457p.
- Bragg, R., Broero, J.S.E. (1986) Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. Bull. Ass. Fish Pathol. 6, 89-91

- Çağırğan, H and Tanrikul, T. T. (1997) A *Lactococcus* in a trout farm. Mediterranean Fisheries Congress. 9-11 April Izmir, Turkey, 40p.
- Carson, J., Gudkovs, N., Austin, B., (1993) Characteristic of an Enterococcus-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum). Journal of Fish Diseases. 16, 381-388
- Ceschia, G., Girgetti, G., Giavenni, R., Sarti, M. (1992) A new problem for Italian trout farms: Streptococcosis in rainbow (*Oncorhynchus mykiss*). Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 12:71-72.
- 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. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 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. Dis. Aquat. Org. 45:45-52.
- Collins, C. H., Lyne, P.M. (1976) Microbiological methods. Butterworths. 521p.
- Cowan, S. T., Steel, K. J. (1970). Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge of University Press, 216 p.
- Diler, Ö., Altun, S., Adiloğlu, A.K., Kubilay, A. and Işıklı, B.I. (2002) First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 22:21-26.
- Eldar, A.C., Ghittino, C., Asanta, L., Bvozzetz, E., Gorla, M. (1996) *Enterococcus seriolicida* is a Junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in Fish. Curr. Microbiol. 32:85-88.
- Eldar, A. and Ghittino, C. (1999) *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Similar, but different diseases. Dis. Aquat. Org., 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. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1005-1008.
- Elliott, J.A., Facklam, R.R., (1996) Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and proposed method to discriminate between them. Journal of Clinical Microbiology, 1296-1298.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A. and Williams, S.T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. eighth edition. Williams & Wilkins, 787.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schereekenberger, P.C., Winn, N.Y. (1997). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. fifth edition, Philadelphia.
- Ksuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. and Fryer, L. (1991) *Enterococcus seriolicida* sp. Nov., a fish pathogen. Int.J. Syst. Bacteriol., Vol. 41, 406-409pp.
- Ksuda, 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.
- Kum, C., Gökbulut, C., Akar, F., Kırkan, Ş., Sekkin, S. (2004) Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* izolasyonu ve etkili antibakteriyal sağaltım seçeneğinin belirlenmesi. Veteriner Hekimleri Derneği Dergisi. Cilt 75 Sayı:3,47-53.
- 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.
- Muzquiz, J. L., Royo, F. M., Otega, C., Blas, I., Ruiz, I., Allonso, J. L., (1999). Pathogenicity of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) dependence on age of diseased fish Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 19(3), 114-119.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing) performance standards for antimicrobial susceptibility testing, eleventh information supplement. NCCLS document M100-S11 NCCLS, West Walley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898. USA, 2001
- Nieto, J.M. Devesa, S., Quiroga, I., Toranzo, A.E. (1995). Pathology of *Enterococcus* sp. Infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L., J. Fish Dis. 18(1), 21-30p.
- Ravelo, C., Magarinos, B., Romalde, J.I. and Toranzo, A.E. (2001) Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 21:136-144.
- Salati, F., Tassi, P., Bronzi, P., (1996). Isolation of an Enterococcus-like bacterium from diseased Adriatic sturgeon, *Acipenser naccarii*, farmed in, Italy. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 16(3), 96-100.
- Toranzo, A. E., Devesa, S., Heinen, P., Rıaza, A., Nunez, S., Barja, J.I. (1994). Streptococcosis in cultured turbot caused by Enterococcus-like bacterium. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14 (1), 19-23.