

***Lactococcus garvieae* İzolatlarının Antimikrobiyal Direnç Profillerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Belirlenmesi**

İlker Hancı¹, Ertan Emek Onuk²

¹ Sinop İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Sinop

² Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları AD, Samsun

Geliş Tarihi / Received: 11.04.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 08.06.2018

Özet: Antimikrobiyel ajanların su ürünleri yetiştiriciliğindeki yoğun ve bilinçsiz kullanımı sucul ortamda antibiyotik dirençli bakterilerin ve antibiyotik direnç genlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda su ve sediment antibiyotik direnç genleri için rezervuar durumuna dönüşebilir ve bu genler horizontal gen transferi ile insan ve balık patojenleri arasında yayılabilirler. Bu çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş 25 *L. garvieae* izolatının 14 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. İzolatların sahip oldukları çeşitli antibiyotik direnç genlerinin varlığı spesifik primer çiftlerinin kullanıldığı PCR metodu ile belirlendi. Ayrıca izolatlar arasındaki olası klonal ilişkiler RAPD-PCR metodu ile ortaya konuldu. İzolatların tamamının en az 4 farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, bir izolatın ise 9 farklı antibiyotiğe karşı direnç ile en yüksek direnç profiline sahip olduğu belirlendi. İzolatlardan birinin (%4) *suII* direnç genine, altısının (%24) *suIII* direnç genine ve bir izolatın (%4) *tetD* direnç genine sahip olduğu belirlendi. İzolatların ERIC2 primeri ile 3 farklı genotipe ayrıldığı ve izolatların büyük bir bölümünün (16 izolat) baskın tip olan LG2 genotipine dahil olduğu belirlendi. Çalışmada çoklu ilaç direncinin yüksek oranda saptanması balık hastalıklarının tedavisinde uygun antimikrobiyel ajanların seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik, antibiyotik direnç geni, genotiplendirme, *L. garvieae*

Phenotypic and Genotypic Determination of Antimicrobial Resistance Profile for *Lactococcus garvieae* Isolates

Abstract: The intense and unconscious use of antimicrobial agents in aquaculture results in the occurrence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes (ARGs). In such cases, water and sediment may become a reservoir for ARGs and these genes can be transferred horizontally among fish and human pathogens. In the current study, antimicrobial activity of 25 *L. garvieae* strains isolated from different regions of Turkey was determined by Kirby Bauer disk diffusion method against the 14 different antibiotics. Presence of various antibiotic resistance genes in the isolates was determined by PCR method with specific primers. Additionally, possible clonal relationships between isolates were demonstrated by the RAPD-PCR method. All isolates have resistant to at least 4 different antibiotics, also one isolate had the highest resistance profile with resistance to 9 different antibiotics. It was determined that one of the isolates (4%) has *SuII* resistance gene, six (24%) of isolates have the *suIII* resistance gene and one isolate (4%) has *tetD* resistance gene. It was determined that the isolates were divided into 3 different genotypes by the ERIC2 primer and large amount of the isolates (16 isolates) have involved dominant type LG2 genotype. Detection of high rate multi-drug resistance in the study, suggested that selection of appropriate antimicrobial agents is important for treatment of fish diseases.

Key words: Antibiotic, antibiotic resistance gene, genotyping, *L. garvieae*

Giriş

Lactococcus garvieae (*L. garvieae*) enfeksiyonlarının tedavisinde en etkin yol patojene karşı antibiyogram yaparak en etkili antibiyotiği tespit ederek uygulamaktır [14]. Ancak balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin kullanımına son zamanlarda çeşitli ülkeler tarafından kısıtlamalar getirilmiştir. ABD'de balıklarda sulfamerazin, oksitetrasiklin dihidrat, sulfadimetoksin-ormetoprim

ve florfenikol'ün yasal kullanımına izin verilirken [4], İngiltere'de sadece üç adet antibiyotik (florfenikol, oksitetrasiklin ve amoksisilin) su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanım için lisans almıştır [18]. Ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliğinde çok çeşitli antibakteriyellerin kullanıldığı bildirilmiş olmasına rağmen, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü verilerine göre balıklarda kullanılacak 40 adet ruhsatlı antibakteriyel ürün bulunmakta ve bu ürünlerin ise beş

farklı etken madde, florfenikol, oksitetrasiklin HCl, enrofloksasin, sülfadiazin-trimetoprim ve amoksisilin trihidrat içerdiği görülmektedir [9].

Genel olarak *L. garvieae* enfeksiyonlarının tedavisinde eritromisin, oksitetrasiklin, amoksisilin ve düşük düzeyde doksisilin en sık olarak kullanılan antibiyotiklerdir [28]. Ancak streptokokkal balık patojenlerinde antibiyotik kullanımına bağlı olarak antibiyotiklere karşı direnç geliştiği bildirilmiştir [2, 3]. Bir izolatta birden fazla kemoterapotik ajana karşı direncin geliştiği çoklu direnç sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriye populasyonlardaki antibiyotik direnç genlerinin yayılımı horizontal gen transferinin çeşitli mekanizmaları yoluyla gerçekleşmektedir. Streptokokkal balık patojenlerinde en yaygın gen transfer mekanizması plazmid ilişkili transferdir. Akuvatik Streptokok türlerinde antibiyotik direnciyle ilgili ilk rapor Japonya'da kültüre edilen sarıkuyruk balıklardan yapılmıştır. Çalışmada makrolid, linkomisin ve tetrasikline karşı orta düzeyde direnç olduğu ve direnç genlerinin yapısal olarak ekspresse olduğu ve transfer edilemez olduğu ortaya konulmuştur. Yine aynı çalışmada makrolid, linkomisin, tetrasiklinler ve kloramfenikole karşı yüksek düzeyde direnç olduğu ve ilişkili direnç genlerinin transfer edilebilir ve indüklenebilir olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar antibiyotik direnç determinantlarının direnç (R) plazmidlerinde ya da tranposonlarda lokalize olduğunu tahmin etmişlerdir [2]. Bu bulgular, eritromisin, oksitetrasiklin ve linkomisin dirençli *L. garvieae* izolatlarından izole edilen R plazmidlerinin karakterizasyonuna neden olmuş ve *ermB* ve *tet(S)* direnç genlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır [11]. 170 adet *L. garvieae* izolatının antibiyotik duyarlılık testi sonucu izolatların neredeyse yarısının aynı anda eritromisin, linkomisin ve oksitetrasikline dirençli olduğu ve tüm dirençli izolatların *ermB* ve *tet(S)* direnç genlerine sahip oldukları ortaya konulmuştur [13]. İran'da yapılan çalışmada 49 *L. garvieae* izolatının %65,3'ü enrofloksasin'e, %42,8'i eritromisin'e, %40,8'i kloramfenikol ve trimetoprim+sulfametoksazol ve %38,7'sinin tetrasiklin'e karşı dirençli olduğu bulunmuş ve test edilen 49 izolatın tamamını en az bir tetrasiklin direnç geni taşıdığı saptanmıştır [22]. Ülkemizde *L. garvieae* izolatlarında antibiyotik direnç genlerinin varlığının belirlendiği bir çalışmada izolatların en yaygın olarak tetrasiklin (*tetB*) direnç geni taşıdığı ortaya konulmuştur [26].

Bu çalışma ile Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan *L. garvieae* izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve izolatların sahip oldukları bazı antibiyotik direnç genleri belirlenmiş ve izolatlar arasındaki genetik ilişkiler Random Amplified Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) metodu ile ortaya konulmuştur.

Materyal ve Metot

Bakteriyel izolatlar: Çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan 25 adet Gökkuşluğu alabalığı kökenli *L. garvieae* saha izolatı ve *L. garvieae* ATCC 43921 referans suşu kullanıldı (Tablo 1). İzolatlar Trypticase soy broth'a (Merck, Almanya) pasajlandı ve 25 °C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı.

***L. garvieae* Spesifik PCR:** İzolatların DNA ekstraksiyonları prensibi spin kolon ile filtrasyon esasına dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Invitrogen, Kanada) kullanılarak yapıldı. Kit içeriğine ek olarak Gram pozitif bakteriler için 0,06 g Tris-HCl, 0,15 g EDTA, 240 ml Triton X-100, 0,4 g lizozim'den oluşan 20 ml lizozim lizis buffer hazırlandı. *L. garvieae* izolatları genetik olarak tür spesifik pLG-1 (5'-CATAACAATGAGAATCGC-3') ve pLG-2 (5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3') primer setinin kullanıldığı PCR metodu ile konfirme edildi [30]. *L. garvieae* spesifik 1100 bp'lik son amplifikasyon ürününün görüldüğü izolatlar *L. garvieae* olarak değerlendirildi. PCR çalışmasında pozitif kontrol olarak *L. garvieae* ATCC 43921 suşu kullanıldı.

Disk Difüzyon Testi: İzolatların antibiyotik profillerinin belirlenmesinde Kirby Bauer disk difüzyon metodu kullanıldı. İzolatların amoksisilin (10 µg), ampisilin (10 µg), enrofloksasin (5 µg), eritromisin (15 µg), florfenikol (30 µg), flumekuin (30 µg), gentamisin (10 µg), kanamisin (30 µg), neomisin (30 µg), oksitetrasiklin (30 µg), oksolinik asit (2 µg), sefoperazon (75 µg), trimetoprim (5 µg) ve trimetoprim+sulfametoksazol (25 µg) (Bioanalyse, Türkiye) olmak üzere 14 farklı antibiyotiğe karşı direnç profilleri belirlendi. Bu amaçla her bir bakteri Brain Heart Infusion agarda 25 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılarak subkültüre edildi. Elde edilen bakteri subkültürleri McFarland 0.5 standardına göre ayarlandı ve süspansiyonlarının her birinden 0,1 ml alınarak Müeller-Hinton agara steril

svap yardımıyla ekimleri yapıldı. Daha sonra ekim yapılan petrilere antibiyotik diskleri yerleştirilerek 25 °C'de 24-48 saat inkube edildi. İnkubasyon sonrası diskler etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü ve sonuçlar referans değerlerle karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı [5].

Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Belirlenmesi: Çalışmada kullanılan *L. garvieae* izolatla-

rında eritromisin (*ermB*, *ermF*), florfenikol (*floR*), sulfanamid (*sulI*, *sulII* ve *sulIII*), tetrasiklin (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE* ve *tetG*) ve trimetoprim (*dhfr1*) antibiyotik direnç genlerinin varlığı PCR metodu ile araştırıldı. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primer dizileri ve bu dizilere ait beklenen PCR son ürün boyutları Tablo 2'de verildi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *L. garvieae* saha izolatları, izolasyon yerleri ve tarihi

| No | İzolatlar | İzolasyon Yeri | | İzolasyon Yılı |
|----|------------|----------------|------------|----------------|
| 1 | Çob S | Muğla | Akdeniz | 2001 |
| 2 | Alk S | Antalya | Akdeniz | 2002 |
| 3 | Haykas 12B | Isparta | Akdeniz | 2012 |
| 4 | Anakas 12B | Isparta | Akdeniz | 2012 |
| 5 | Kep B | Antalya | Akdeniz | 2001 |
| 6 | Yal B | Isparta | Akdeniz | 2012 |
| 7 | Çan B | Isparta | Akdeniz | 2012 |
| 8 | Göz B | Muğla | Akdeniz | 2001 |
| 9 | Çift B | Eskişehir | İç Anadolu | 2012 |
| 10 | Esk B | Eskişehir | İç Anadolu | 2017 |
| 11 | Sam ED | Samsun | Karadeniz | 2010 |
| 12 | Sam EK | Samsun | Karadeniz | 2010 |
| 13 | Or YDD | Ordu | Karadeniz | 2014 |
| 14 | Or YDB | Ordu | Karadeniz | 2014 |
| 15 | Or YDE | Ordu | Karadeniz | 2014 |
| 16 | Or YDF | Ordu | Karadeniz | 2014 |
| 17 | SK 68D | Aydın | Ege | 2011 |
| 18 | SK 45K | Aydın | Ege | 2011 |
| 19 | SK 31K | Aydın | Ege | 2011 |
| 20 | SK 19K | Aydın | Ege | 2011 |
| 21 | SK 67K2 | Aydın | Ege | 2011 |
| 22 | SK 66B | Aydın | Ege | 2011 |
| 23 | SK 53K | Aydın | Ege | 2011 |
| 24 | SK 65B | Aydın | Ege | 2011 |
| 25 | 37K | Aydın | Ege | 2011 |

Tablo 2. Antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primer setleri

| Primerler | Primer Dizileri | Hedef Gen | PCR Ürün Boyutu | Kaynak |
|------------------------------------|---|--------------|-----------------|--------|
| <i>ermB</i> -F <i>ermB</i> -R | GAAAAGGTAAGCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC | <i>ermB</i> | 639 | [24] |
| <i>ermF</i> -F <i>ermF</i> -R | CGGGTCAGCACTTTACTATTG GGACCTACCTCATAGACAAG | <i>ermF</i> | 466 | [24] |
| <i>floR</i> -F <i>floR</i> -R | TATCTCCCTGTCGTTCCAG AGAACTCGCCGATCAATG | <i>floR</i> | 399 | [27] |
| <i>SuI</i> -F <i>SuI</i> -R | CGCACCGGAAACATCGCTGCAC TGAAGTTCGCGCCGAAGGCTCG | <i>suI</i> | 163 | [20] |
| <i>SuII</i> -F <i>SuII</i> -R | TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG | <i>suII</i> | 191 | [20] |
| <i>SuIII</i> -F <i>SuIII</i> -R | TCCGTTACGCGAATTGGTGCAG TTCGTTACGCTTACACCAGC | <i>suIII</i> | 128 | [20] |
| <i>tetA</i> -F <i>tetA</i> -R | GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG | <i>tetA</i> | 210 | [17] |
| <i>tetB</i> -F <i>tetB</i> -R | TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG GTAATGGGCCAATAACACCG | <i>tetB</i> | 659 | [17] |
| <i>tetC</i> -F <i>tetC</i> -F | CTTGAGAGCCTTCAACCCAG ATGGTCGTCATCTACCTGCC | <i>tetC</i> | 418 | [17] |
| <i>tetD</i> -F <i>tetD</i> -R | AAACCATTACGGCATTCTGC GACCGGATACACCATCCATC | <i>tetD</i> | 787 | [17] |
| <i>tetE</i> -F <i>tetE</i> -R | AAACCACATCCTCCATACGC AAATAGGCCACAACCGTCAG | <i>tetE</i> | 278 | [17] |
| <i>tetG</i> -F <i>tetG</i> -R | GCTCGGTGGTATCTCTGCTC AGCAACAGAATCGGGAACAC | <i>tetG</i> | 468 | [17] |
| <i>dhfr1</i> -F <i>dhfr1</i> -R | AAGAATGGAGTTATCGGGAATG GGGTAAAACCTGGCCTAAAATTG | <i>dhfr1</i> | 391 | [27] |

Direnç genlerinden *ermB*, *floR*, *suI*, *suII*, *tetA*, *tetB* ve *tetC*'ye ait pozitif DNA örnekleri Dr. Mustafa Türe (Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trabzon) ve Dr. Muhammed Duman'dan (Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa) temin edildi.

Eritromisin direnç genlerinin belirlenmesinde Roberts ve ark. [24]'ün bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. *ermB* ve *ermF* direnç genlerinin belirlenmesinde tekli PCR denemeleri gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonu için 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Bu karışım DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1,5 mM of MgCl₂, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,5 U Taq polymerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA'dan oluşturuldu. Oluş-

turulan bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 45 sn uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifiye edildi.

Florfenikol direnç geninin (*floR*) belirlenmesinde Van ve ark. [27]'nin bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. PCR amplifikasyonunda PCR water, 1xPCR Buffer, 1,5 mM of MgCl₂, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,5 U Taq polymerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA içeren 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50,5°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 45 sn uzama olmak üzere 35 siklus ve

72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Sulfonamid direnç genlerinin belirlenmesinde Pei ve ark. [20]'nin bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. *suII*, *suIII* ve *suVIII* direnç genlerinin belirlenmesinde tekli PCR denemeleri gerçekleştirildi. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1,25 mM of MgCl₂, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,75 U Taq polimerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA içeren 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 95°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 95°C'de 15 sn denatürasyon, *suII* için 55,9°C'de, *suIII* için 60,8°C'de ve *suVIII* için 60°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 7 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Tetrasiklin direnç genlerinin belirlenmesinde Ng ve ark. [17]'nin bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. Bu amaçla iki farklı Multipleks PCR denemesi gerçekleştirildi. Birinci denemede *tetB*, *tetC* ve *tetD* genlerinin, ikinci denemede ise *tetA*, *tetE* ve *tetG* genlerinin varlığı belirlendi. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 2,0 mM of MgCl₂, her bir dNTP'den 0,3 mM, 1,5 U Taq polimerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol (1. denemede *tetB*, *tetC* ve *tetD* primerleri, 2. denemede *tetA*, *tetE* ve *tetG* primerleri kullanıldı) ve 3 µl template DNA içeren 50 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 1,5 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Trimetoprim direnç geninin (*dhfrI*) belirlenmesinde Van ve ark. [27]'nin bildirdiği PCR yöntemi modifiye ve optimize edilerek kullanıldı. PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1,25 mM of MgCl₂, her bir dNTP'den 0,12 mM, 1,75 U Taq polimerase (Fermentas), her bir primer'den 1 pmol ve 3 µl template DNA içeren 25 µl PCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım 95°C'de 15 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 50°C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 1 dk uzama olmak üzere 30 sik-

lus ve 72°C'de 7 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

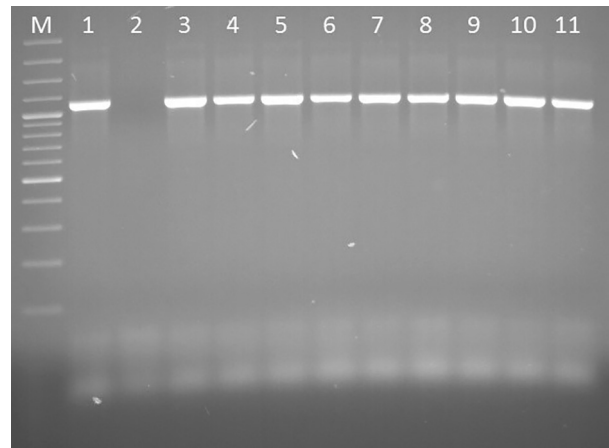
Tüm PCR analizleri sonrası oluşan son amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesinde etidium bromid (2 mg/ml) içeren %1,5-2'lik agaroz jel kullanıldı. Jel elektroforezi sonrası oluşan ürünler UV transilluminatör ile görüntüldü.

İzolatlar Arası Klonal İlişkinin Belirlenmesi:

İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin ortaya konması amacıyla rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) metodu kullanıldı. Bu metotta random primer olarak "Enterobacterial repetitive intergenic consensus" dizilerine özgü ERIC-2 primeri (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') kullanıldı [29]. Oluşan RAPD paternlerinin dendogramları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) ile, CHEF-DR® III, Quantity One® yazılımı (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kullanılarak çizildi. RAPD analizinin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla rastgele 7 izolat seçildi ve analiz arka arkaya 3 kez tekrarlandı. İzolatlar arasındaki genetik yakınlık % 70 benzerlik katsayısına göre hesaplandı.

Bulgular

***L. garvieae* Spesifik PCR:** Çalışmada kullanılan izolatlar *L. garvieae* tür spesifik PCR uygulamasıyla moleküler olarak konfirme edildi. *L. garvieae* spesifik PCR sonucunda tüm izolatların 1100 bp amplifikasyon ürünü verdiği saptandı (Şekil 1).



Şekil 1. *L. garvieae* spesifik PCR (1100 bp). M; Marker (100 bp Plus DNA Marker), 1; *L. garvieae* ATCC 49156, 2; Negatif Kontrol (Distile su), 3-11; *L. garvieae* saha izolatları

Disk Difüzyon Testi: *L. garvieae* saha izolatlarının çalışmada kullanılan 14 farklı antibiyotiğe karşı değişik düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları belirlendi. İzolatların tamamının en az 4 farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, bir izolatın (Yal B izolatı) ise 9 farklı antibiyotiğe karşı direnç ile en yüksek direnç profiline sahip olduğu belirlendi. İzolatların tamamının flumekuin, gentamisin, neomisin ve oksolonik asit'e karşı dirençli amoksisilin, florfenikol ve sefoperazon'a karşı ise duyarlı olduğu saptandı. En düşük direnç oranının ise %4 ile oksitetrasiklin ve %12 ile enrofloksasin'e karşı şekillendiği görüldü (Tablo 3).

Tablo 3. Çalışmada kullanılan *L. garvieae* izolatların antimikrobiyal profilleri

| Antibiyotik | <i>L. garvieae</i> (n=25) | | |
|-----------------------------|---------------------------|---------|----------|
| | n (%) | | |
| | S | I | R |
| Amoksisilin | 25 (100) | - | - |
| Ampisilin | 5 (20) | 20 (80) | - |
| Enrofloksasin | 3 (12) | 19 (76) | 3 (12) |
| Eritromisin | 22 (88) | 3 (12) | - |
| Florfenikol | 25 (100) | - | - |
| Flumequin | - | - | 25 (100) |
| Gentamisin | - | - | 25 (100) |
| Kanamisin | - | 14 (66) | 11 (44) |
| Neomisin | - | - | 25(100) |
| Oksitetrasiklin | 15(60) | 9 (36) | 1 (4) |
| Oksolinik asit | - | - | 25 (100) |
| Sefaperazon | 25 (100) | - | - |
| Trimetoprim | 5 (20) | 2 (8) | 18 (72) |
| Trimetoprim-sulfametoksazol | - | 12 (48) | 13 (52) |

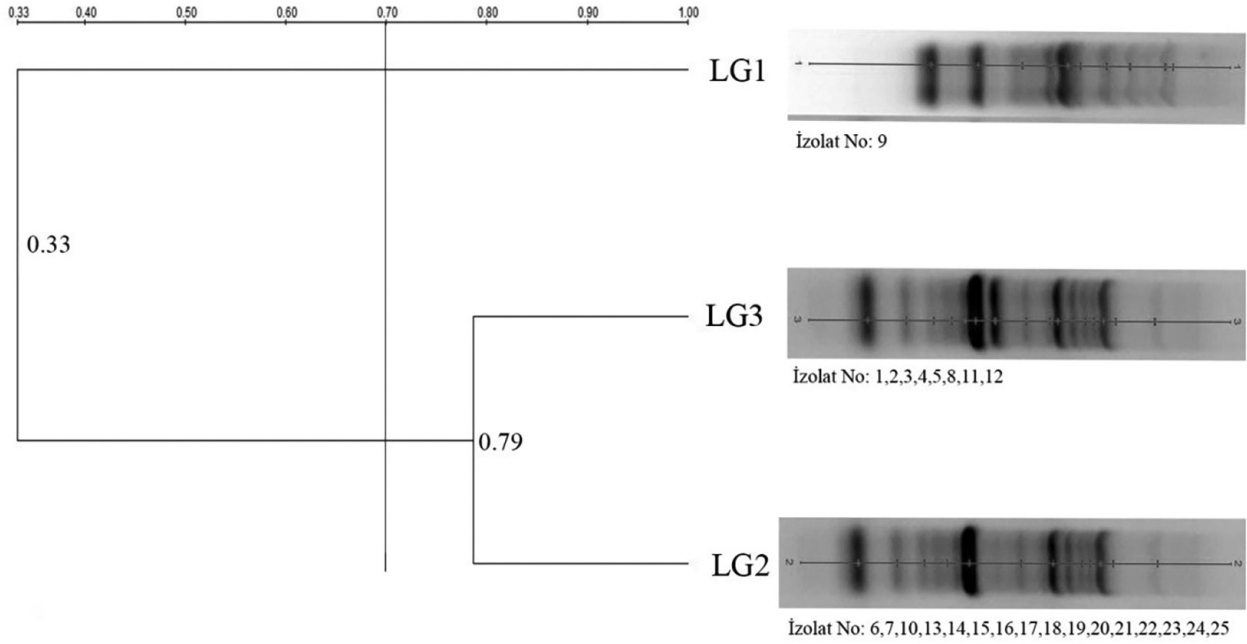
S: duyarlı, I: Orta derece duyarlı, R: Dirençli

Antimikrobiyal Direnç Genlerinin Belirlenmesi: Çalışma kapsamında incelenen *L. garvieae* saha izolatları arasından bir izolatın (%4) *suII* direnç genine, altı izolatın (%24) *suIII* direnç genine ve bir izolatın (%4) *tetD* direnç genine sahip olduğu belirlendi. İzolatlar arasında *ermB*, *ermF*, *floR*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE* *tetG* ve *dhfr1* direnç genlerinin varlığı saptanamadı. Sadece bir izolatın (Anakas 12B) birden fazla direnç genine sahip olduğu belirlendi (Tablo 4). İzolatların izole edildikleri yerler ile sahip oldukları antibiyotik direnç genleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı.

Tablo 4. *L. garvieae* izolatlarında saptanan antibiyotik direnç genleri

| İzolatlar | <i>suII</i> | <i>suIII</i> | <i>tetD</i> |
|------------|-------------|--------------|-------------|
| Anakas 12B | + | + | - |
| Kep B | - | + | - |
| Çift B | - | - | + |
| Esk B | - | + | - |
| Or YDE | - | + | - |
| SK 66B | - | + | - |
| 37K | - | + | - |

İzolatlar Arası Klonal İlişki: İzolatlar arası genetik ilişkinin belirlenmesi amacıyla seçilen ERIC-2 primeri ile farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş olan 25 *L. garvieae* saha izolatının üretken bant paternleri verdiği gözlemlendi. ERIC-2 primeri ile üç farklı genotip saptandı ve izolatlar %70 benzerlik katsayısına göre bir küme (LG2 ve LG3 nolu genotip) ve bir "unique" tip (LG1 nolu genotip) içerisinde sınıflandırıldı. Baskın genotip olan LG2'ye izolatların 16'sının (%64) dahil olduğu, unique tip'e ise sadece bir izolatın dahil olduğu, diğer genotip'e ise 8 izolatın (%32) saptandı (Şekil 2). Testin tekrarlanabilirliği %100 olarak bulundu.



Şekil 2. ERIC2 primeri ile *L. garvieae* izolatlarında belirlenen genotipler

Tartışma ve Sonuç

L. garvieae, balıklarda hiperakut, hemorajik sepsisemi ile seyreden laktokokkozis hastalığının etiyolojik ajanıdır. Etken aynı zamanda önemli bir zoonotik patojen olarak ele alınmaktadır. Ticari öneme sahip birçok tatlı ve tuzlu su balık türlerinde laktokokkozis sonucu meydana gelen önemli ekonomik kayıplar su ürünleri yetiştiriciliğine zarar vermektedir [16]. Bununla birlikte *L. garvieae* enfeksiyonlarında tedavi kemoterapotik ajanlar ile yapılabilmektedir. Ancak tedavide kullanılan antibiyotiklerin kalıntı, antimikrobiyal direnç gelişimi ve maliyet gibi faktörler göz önüne alınarak yapılması gerektiği bunun içinde uygun antibiyotik seçimi için etkenin duyarlı olduğu antibiyotik belirlenerek uygulanmasının büyük önem taşıdığı bildirilmektedir [14].

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalar ile değişik bölge ve illerden izole edilmiş olan *L. garvieae* izolatların sahip olduğu antimikrobiyel aktiviteler göz önüne serilmiştir. Kubilay ve ark., [14] 2001-2003 yılları arasında Antalya, Isparta, Konya, Denizli ve Muğla illerinden izole edilmiş yedi *L. garvieae* izolatının kanamisin, sefuroksim, linkomisin, penisilin, norfloksasin, siprofloksasin, ceftriaxone,

klindamisin, vankomisin, okzasilin, streptomisin, trimetoprim+sulfametoksazol, gentamisin, apramisin, tylosin, colistin, sulfamethizol, flumekuün ve oksolinik asit'e dirençli olduklarını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda benzer şekilde flumekuün, gentamisin ve oksolinik asit'e karşı %100 oranında direnç saptanmıştır. Kav ve Erganiş [12] 2002-2004 yılları arasında Konya ilinde gökkuşuğu alabalığı işletmelerinden elde ettikleri izolatların tamamında metisilin, okzasilin, kloksasilin, spiramisin, klindamisin, linkomisin, gentamisin, neomisin, basitrasin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı direnç saptamışlardır. Yapılmış olan çalışmada elde edilen sonuçlara göre *L. garvieae* enfeksiyonlarının tedavisinde β -laktam gurubu antibiyotiklerin tercih edilebileceği bildirilmiştir. Altun ve ark., [1] disk difüzyon yöntemi ile Türkiyenin değişik illerinden izole edilen 10 gökkuşuğu alabalığı kökenli *L. garvieae* izolatının tamamının gentamisin, neomisin, linkomisin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı dirençli olduklarını belirlemişlerdir. Oksitetrasiklin ve eritromisin'e karşı ise sırasıyla %80 ve %90 oranında yüksek düzeyde direnç saptanmıştır. Akdeniz bölgesinde 2012 yılında rastlanılan salgından izole edilen suşların benzer şekilde oksitetrasiklin, neomisin ve trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı di-

rençli olduğu bildirilmiştir [6]. Türe ve Boran [26] çalışmalarında kullandıkları 29 *L. garvieae* izolatı arasından 20 izolatın çoklu antibiyotik direncine sahip olduklarını bildirmişler ve en yüksek direnç oranının %86,3 ile trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı şekillendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada Türe ve Boran [26]'nın bildirdiği gibi izolatlarda yüksek düzeyde (%100) çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır. Yapılan çalışmalardan farklı olarak trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı ise daha düşük düzeyde (%52) direncin şekillendiği belirlenmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda [6, 26] çalışmamıza benzer şekilde florfenikol'e karşı bir direncin şekillenmediği görülmüş olup *L. garvieae* enfeksiyonların sağaltımında bu antibiyotiğin kullanılabilir olduğu değerlendirilmiştir.

Duyarlı bakteriler antibiyotiğin hücre membranı tarafından dışlanması, antibiyotiğin hücre içi modifikasyonu ve/veya deaktive edilmesi, hücresel hedefe duyarlılığının azaltılması, antibiyotiğin hücreden dışarıya atılması ve hücre içi ayrıştırma gibi çoklu ve kompleks mekanizmalar yoluyla antibiyotiklere karşı dirençli hale gelebilirler [25]. Bu mekanizmalar mutasyon ve seleksiyon yoluyla ya da diğer bakterilerden direnç kodlayan genetik bilgilerin kazanılması ile evrimleşebilir. Direnç kodlayan genetik bilgilerin aktarımı horizontal gen transferi (HGT) aracılığıyla gerçekleşebilir. HGT içerisinde konjugasyon (bakteriyel plazmidler ve konjugatif transpozonlar yoluyla), transformasyon (serbest DNA'nın çevreden alınmasıyla) ve transdüksiyon (bakteriyofajlarla) gibi büyük bir ölçüde antibiyotiğe dirençli bakterilerin geliştirilmesinden sorumlu mekanizmalar bulunmaktadır [15]. Antibiyotik direnç genlerinin patojenler arasında aktarılmasında özellikle, akuvatik ortamların önem taşıdığı ve bu ortamların rezervuar olarak görev yaptıkları bildirilmektedir [10]. Dolayısıyla balık patojenlerinde görülen antibiyotik direncinin ve izolatların sahip oldukları direnç genlerinin belirlenmesi hem hayvan sağlığı hem de insan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Ülkemizde ve dünyada *L. garvieae* izolatlarının sahip oldukları antibiyotik direnç genlerinin ortaya konulduğu sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Türe ve Boran [26] 28 *L. garvieae* saha izolatının 12 farklı antibiyotik direnç geninin varlığını inceledikleri çalışmalarında izolatlar en yaygın olarak *tetB* (20/28) ve *ereB* (19/28) di-

renç genlerinin taşıdıklarını saptamışlardır. Araştırdıkları diğer direnç genlerinden 13 izolatın *floR*, 12 izolatın *suIII* ve *blaTEM* (β -lactam direnç geni), 3 izolatın *suII*, 2 izolatın *tetS*, *dhfrI* ve *aadA* (gentamisin direnç geni) taşıdığını, izolatların hiçbirinin *ereA*, *blaPSE* (β -lactam direnç geni) ve *ampC* (β -lactam direnç geni) taşımadığını ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte izolatların tamamının en az 2 antibiyotik direnç geni taşıdığını bildirmişlerdir. 25 adet *L. garvieae* saha izolatının incelendiği bu çalışmada ise Türe ve Boran [26]'nın aksine izolatların düşük düzeyde antibiyotik direnç geni taşıdığı belirlenmiştir. Çalışmamızda bir izolatın (%4) *suII* direnç genine, altı izolatın (%24) *suIII* direnç genine ve bir izolatın (%4) *tetD* direnç genine sahip olduğu belirlendi. İzolatlar arasında *ermB*, *ermF*, *floR*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE* *tetG* ve *dhfr1* direnç genlerinin varlığı saptanamamıştır. Çalışmamızla benzer şekilde Duman [7] 137 *L. garvieae* saha izolatının incelendiği çalışmada izolatların *tetA* ve *floR* direnç genlerine sahip olmadığını belirlemiştir. Ancak yine aynı çalışmada her iki çalışmada ortak olarak araştırılan genlerden *ermB*'nin dört izolat da var olduğu bildirilmiştir. Bunun dışında izolatların dokuzunda *ermA*, yedisinde *tetM* ve dördünde *tetS* direnç genine sahip olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda *suII* ve *suIII* direnç genine sahip olduğu belirlenen 4, 10 ve 25 nolu izolatın fenotipik olarak trimetoprim+sulfametoksazol'e karşı dirençli, 15 ve 22 nolu izolatın ise orta düzeyde duyarlı oldukları belirlenmiştir.

İran'da yapılan bir çalışmada 49 *L. garvieae* izolatında yüksek düzeyde (%89,4) *tetA* geninin varlığına rastlanılmıştır [22]. Aynı çalışmada çalışmamızda bulduğumuz tek tetrasiklin direnç geni olan *tetD* ise %15,3 oranında saptanmıştır. Yine İran'da yapılan bir başka çalışmada ise 24 *L. garvieae* izolatı incelenmiş ve izolatların dokuzunun *ermB*, onunun ise *tetS* direnç genine sahip oldukları belirlenmiştir [21]. Çalışmamızda ise *ermB* direnç geni saptanamamıştır. Sonuçlar farklı coğrafik bölgelerden izole edilen izolatların farklı direnç genlerine sahip olduklarını göstermektedir. Bu farklılıkların işletmelerde hastalıkların tedavisinde bölgesel olarak kullanılan antibiyotik farklılıklarından ve/veya izolatların bölgeler arası yumurta ve balık nakilleri ile yayılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bakteriyel izolatlar arasında genetik ilişkilerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan metotlardan birisi RAPD-PCR metodu [1, 19]. Araştırmacılar bu metotta random primer olarak farklı primer dizilerinin kullanılabilirliğini değerlendirmişlerdir. Ravelo ve ark., [23] farklı coğrafik bölge ve balık türlerinden izole edilen *L. garvieae* izolatlarını P5 ile P6 primerlerinin kullanıldığı RAPD-PCR ile genotiplendirmişlerdir. Çalışmalarında kullandıkları izolatları 3 genogruba ayırmışlardır. Alabalıklardan izole edilen İspanya, Portekiz, İngiltere ve Türkiye izolatlarının 1. grupta, yine alabalıklardan izole edilen Fransa ve İtalya suşlarının 2. grupta ve sarıkuyruk balıklarından izole edilen Japon izolatları ile *L. garvieae* NCDO 2155 referans suşun ise 3 grupta kümelendiğini bildirmişlerdir. Foschino ve ark., [8] *L. garvieae* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede M13 ve P5 primerlerini kullanmışlardır. M13 primerinin en iyi ayırım gücüne sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu primeri ile İtalyan balık ve çiftlik örneklerinden elde edilen toplam 81 izolatı 5 küme içerisinde 52 RAPD genotipine ayırmışlardır. Balıklardan izole edilen izolatların ise 3 farklı kümeye dağıldığı görülmüştür. Sonuçta balık ve çiftlik izolatları arasında düşük genetik ilişkinin olduğu belirlenmiştir. Altun ve ark., [1] *L. garvieae* izolatlarının ERIC2 primeri ile değişken bant paternleri verdikleri, dolayısıyla epidemiyolojik araştırmalarda bu random primerin kullanılabilir olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar *L. garveae* izolatlarını 3 farklı genotip içeren bir küme içerisinde gruplanmış ve Ravelo ve ark., [23]'ün çalışmalarına paralel olarak ülkemizden izole edilen bazı izolatların İspanya ve İngiltere izolatlarıyla yüksek oranda benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada Türkiye kökenli izolatların büyük bir bölümünün (8 izolat) predominant tip olan LG1 genotipine dahil olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda 25 *L. garvieae* saha izolatının ERIC2 primeri ile üretken bant paternleri verdiği gözlenmiş ve izolatlar üç farklı genotip içerisine yerleştirilmiştir. İzolatların 16'sının (%64) baskın genotip olan LG2 içerisine dahil olduğu, unique tip'te ise sadece bir izolatın bulunduğu belirlenmiştir. İzolatların büyük çoğunluğunun Altun ve ark., [1]'in yapmış oldukları çalışmada olduğu gibi baskın bir genotip içerisinde gruplanmış olması Türkiye kökenli *L. garvieae* izolatlarının tek bir epidemiyolojik suş ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler izolatların çoklu antibiyotik direncine sahip olduğunu ve bazı izolatların antibiyotik direnç genine sahip olduğunu göstermiştir. Antimikrobiyal direnç gelişiminin önüne geçilebilmesi için sahada balık hastalıklarının uygun olmayan şekilde tedavi edilmesinin veya ruhsatsız antibiyotik kullanımının önlenmesi için tedbirlerin alınması gerekmektedir. İşletmelerde kullanılan ilaçların mutlaka reçeteli olmasının ve bu ilaçların kayıt altına alınmasının sağlanması gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, PYO.VET.1904.17.013 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Aynı isimdeki Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir. "Ayrıca 5th International VETistanbul Group Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur."

Kaynaklar

- Altun S, Onuk EE, Çiftçi A, Büyükekiz AG, Duman M, (2013). Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. *Kafkas Üni Vet Fak Derg.* 19, 375-381.
- Aoki T, Takami K, Kitao T, (1990). *Drug resistance in a nonhemolytic Streptococcus sp. isolated from cultured yellowtail Seriola quinqueradiata.* *Dis Aquat Org.* 8, 171-177.
- Austin B, Austin AD, *Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish, 5th edn.* Springer/Praxis Publishing, Chichester, 2012.
- Baydan E, Yurdakök B, Aydın FG, (2012). *Balıklarda antibiyotik kullanımı.* *Türkiye Klinikleri J Vet Sci.* 3(3), 45-52.
- Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). The susceptibility of the isolates was determined according to Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement, Zone Diameter Standards for *Enterococcus* spp. (7). CLSI.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first Informational Supplement, 2011.
- Didinen BI, Yardımcı B, Onuk EE, Metin S, Yıldırım P, (2014). *Naturally Lactococcus garvieae infection in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792): New histopathological observations, phenotypic and molecular identification.* *Rev Med Vet.* 165(1-2), 12-19.
- Duman M, (2017). *Gökkuşuğu alabalıklarında görülen motil aeromonas (Aeromonas hydrophila, A. sobria, A. caviae), Yersinia ruckeri ve Lactococcus garvieae bakterilerinin antimikrobiyal duyarlılıkları ve duyarlılıkta rol oynayan genlerin tespiti.* Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa, Doktora Tezi, sayfa: 70.

8. Foschino R, Nucera D, Volponi G, Picozzi C, Ortoffi M, Bottero MT, (2008). *Comparison of Lactococcus garvieae strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing*. J Applied Microbiol. 105(3), 652-62
9. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (GTHB). Bakanlığımızdan izinli veteriner tıbbi ürünler listesi. <https://www.tarim.gov.tr/Konular/Veteriner-Hizmetleri/Veteriner-Saglik-Urunleri>. 2018. İnternet Erişimi: 15.03.2018.
10. Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ, (2009). *Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture*. Clin Infect Dis. 49, 1248-1253.
11. Hirono I, Aoki T, (2001). *Characterization of structure and genes of R Plasmid from fish-pathogenic Lactococcus garvieae*. Proc Jpn Soc Antimicrob Anim. 23, 22-24.
12. Kav K, Erganiş O, (2008) *Antibiotic susceptibility of Lactococcus garvieae in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) farms*. Bull Vet Inst Pulawy. 52, 223-226.
13. Kawanishi M, Kojima A, Ishihara K, Esaki H, Kijima M, Takahashi T, Suzuki S, Tamura Y, (2005). *Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of Lactococcus garvieae isolates from cultured Seriola (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan*. Lett Appl Microbiol. 40, 322-328.
14. Kubilay A, Altun S, Ulukoy G, Diler O, (2005). *Lactococcus garvieae suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi*. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi. 1(1), 39-48.
15. Marti E, Variatza E, Balcazar JL, (2014). *The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance*. Trends Microbiol. 22(1), 36-41.
16. Meyburgh CM, Bragg RR, Boucher CE, (2017). *Lactococcus garvieae: an emerging bacterial pathogen of fish*. Dis Aquat Org. 123, 67-79.
17. Ng LK, Marti, I, Alfa M, Mulvey M, (2001). *Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes*. Mol Cel Prob. 15, 209-215.
18. Ngo TPH, Smith P, Bartie KL, Thompson KD, Verner-Jeffreys DW, Hoare R, Adams A, (2018). *Antimicrobial susceptibility of Flavobacterium psychrophilum isolates from the United Kingdom*. J Fish Dis. 41, 309-320.
19. Onuk EE, Çiftçi A, Fındık A, Çiftçi G, Altun S, Balta F, Özer S, Çoban AY, (2011). *Phenotypic and Molecular Characterization of Yersinia ruckeri Isolates from Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792) in Turkey*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 124(7-8), 320-328.
20. Pei R, Kim SC, Carlson KH, Pruden A, (2006). *Effect of river land scape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG)*. Water Res. 40, 2427-2435.
21. Raissy M, Moumeni M, (2016). *Detection of antibiotic resistance genes in some Lactococcus garvieae strains isolated from infected Rainbow trout*. Iran J Fish Sci. 15(1), 221-229.
22. Raissy M, Shahrani M, (2015). *Detection of tetracycline resistance genes in Lactococcus garvieae strains isolated from Rainbow trout*. World Academy of Science, Engineering ve Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food ve Biotechnological Engineering. 9(2), 126-129.
23. Ravelo C, Magarinos B, Lopez-Ramade S, Toranzo AE, Romalde JL, (2003). *Molecular fingerprinting of fish-pathogenic Lactococcus garvieae strains by Random Amplified polymorphic DNA Analysis*. J Clin Microbiol. 41(2), 751-756.
24. Roberts MC, Chung WO, Roe D, Xia M, Marquez C, Borthagaray G, Whittington WL, Holmes KK, (1999). *Erythromycin resistant Neisseria gonorrhoeae and oral commensal Neisseria spp. carry known rRNAmethylase genes*. Antimicrob Agents Chemother. 43(6), 1367-1372.
25. Taylor NGH, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C, (2011). *Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance?* Trends Ecol Evol. 26(6), 278-284.
26. Türe M, Boran H, (2015). *Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance of Lactococcus sp. strains isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Bull Vet Inst Pulawy. 59, 37-42.
27. Van TTH, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ, (2008). *Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of Escherichia coli isolations for antibiotic resistance and virulence genes*. Int J Food Microbiol. 124, 217-223.
28. Vendrell D, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuela I, De Blas I, Girones O, Muzquiz JL, (2006). *Lactococcus garvieae in fish: a review*. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 29, 177-198.
29. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R, (1991). *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*. Nucleic Acids Res. 19(24), 6823-6831.
30. Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H, (1998). *Identification of Lactococcus garvieae by PCR*. J Clin Microbiol. 36, 983-985.