

KONYA BÖLGESİNDE BULUNAN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Onchyrnus mykiss*) ÇİFTLİKLERİNDEN *Lactococcus garvieae* İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU VE FENOTİPİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Kürşat Kav¹

Osman Erganiş¹

Isolation, Identification and Phenotypic Characterization of *Lactococcus garvieae* from Rainbow Trout (*Onchyrnus mykiss*) Fisheries in Konya Region.

Özet : Bu çalışmada, Konya bölgesinde gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde *Streptokokkozis* etkeni olan *Lactococcus garvieae*'nin izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Haziran 2002-Ağustos 2004 yılları arasında hastalığın görüldüğü 6 adet gökkuşağı alabalığı çiftliğinden 180 hastalıklı balık toplandı. Balık örneklerin 30'unda *L. garvieae* saf kültür halinde izole edildi. Etkenin belirlenmesinde API 20 Strep, klasik bakteriyolojik yöntemler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanıldı. Sonuç olarak bölgesel *Streptokokkozis* etkeninin *L. garvieae* olduğu, tespit edilen izolatların ise fenotipik özelliklerine göre homojen ve kapsüllü olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Streptokokkozis*, *Lactococcus garvieae*, Gökkuşağı Alabalığı, PZR, API 20 Strep

Summary: The aim of this study was to determine isolation, identification and phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* which is cause of *Streptococcosis* in rainbow trout fisheries in Konya region. Between June 2002 and August 2004, 180 ill fish were obtained from 6 rainbow trout fisheries where the disease was observed. Out of the fish samples, 30 *L. garvieae* isolates were isolated. API 20 Strep, polymerase chain reaction (PCR) and classical bacteriological techniques were used the identification of agents. In conclusion, it has been determined that the local *L. garvieae* strains were homogen and have capsule formations regard phenotypic characterizations.

Key Words: *Streptococcosis*, *Lactococcus garvieae*, Rainbow trout, PCR, API 20 Strep

Giriş

Streptokokkozis ve/veya *Streptokoksikozis* olarak da isimlendirilen enfeksiyon, su ürünlerinde *Streptococcus* ve *Enterococcus* cinsinde yer alan bakteriler *L. garvieae* (syn. *Enterococcus seriolocida*), *Streptococcus iniae* (syn. *S. shilo*), *S. agalactiae* (syn. *S. difficile*), *S. parauberis*, *S. milleri*, *L. piscium* ve *Vagococcus salmoninarum* tarafından oluşturulan septisemik ve epizootik karakterli bir hastalıktır (Eldar ve ark 1996, Austin ve Austin 1999, Belton 2002). Hastalık özellikle balıkların merkezi sinir sistemini etkileyerek meningoensefalitis ve suppuratif ekzoftalmusa neden olması ile tanınmaktadır (Eldar ve ark 1996, Austin ve Austin 1999, Belton 2002). Enfeksiyonun *L. garvieae*, *S. iniae*, *S. agalactiae* ve *S. parauberis* tarafından oluşturulan sıcak su *Streptokokkozis*'i (genellikle su sıcaklığının 15°C'nin üstünde olduğu şartlarda) ve *L. piscium* ile *Vibrio salmoninarum* tarafından oluşturulan soğuk su *Streptokokkozis*'i (su

sıcaklığının 15°C'nin altında olduğu şartlarda) olmak üzere yüksek mortaliteyle seyreden 2 formunun olduğu bildirilmektedir (Afonso ve ark 2003, Toranzo ve ark 2005).

Streptokokkozis ilk kez Japonya'da 1958 yılında gökkuşağı alabalıklarında enterokok cinsi bakteriler tarafından oluşturulan bir hastalık olarak bildirilmiştir (Austin ve Austin 1999). Günümüze kadar çeşitli kültür balığı türlerinde gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), yellowtail'lerde (*Seriola quinqueradiata*), tilapia'larda (*Sarotherodon galilaeus*), coho salmon'da (*Oncorhynchus kisutch*), ayu'da (*Plecoglossus altivelis*), catfish (*Ictalurus punctatus*), silver trout, sea trout (*Salmo trutta* L.), stingray (*Potamotrygon falkneri*) ve striped bass'larda (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*) rapor edilmiştir (Austin ve Austin 1999). Ayrıca, büyük karides (freshwater prawn=*Macrobrachium rosenbergii*) çiftliklerinde de hastalığın ciddi ekonomik kayıplara sebep olduğu bildirilmektedir (Cheng ve

Geliş Tarihi: @: kav@scluk.edu.tr

* Bu makale Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen (BAP 2002/003 nolu) "Gökkuşağı Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) *Streptokokkozis* (*Lactococcus garvieae*) Hastalığına Karşı Aşı Çalışmaları" isimli doktora tezinin bir bölümü alınarak hazırlanmıştır.

1. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KONYA

ark 2003). Dünyanın diğer bir çok ülkesinde (Kore, Güney Afrika, İsrail, Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya) streptokok veya streptokok'a benzeyen mikroorganizmaların su ürünleri için önemli bir tehdit unsuru haline geldiği belirtilmektedir (Eldar ve ark 1996, Austin ve Austin 1999, Afonso ve ark 2003). Avrupa'da ise *Streptokokozis* özellikle İspanya, İngiltere ve İtalya'da bir çok balık türünde %50'ye varan mortaliteyle seyreden enfeksiyonlar yapmaktadır (Ellis 1988, Eldar ve ark 1996, Afonso ve ark 2003). Ülkemizde, *L. garvieae* 2001 yılında Ege bölgesindeki gökkuşağı alabalığı çiftliklerinden izole ve tanımlanmıştır (Diler ve ark 2002).

L. garvieae tarafından oluşturulan *Streptokokozis* enfeksiyonu, Enterokokkozis veya Laktokokkozis olarak da tanımlanmaktadır (Eldar ve ark 1996, Austin ve Austin 1999, Afonso ve ark 2003). *L. garvieae*, Streptococcus cinsi bakterilerin karakteristik özelliklerini gösteren Gram pozitif, kapsüllü veya kapsülsüz olabilen sporsuz bir bakteridir. Zoonoz bir hastalık olan Laktokokkozis; balıklarda septisemi ve meningoensefalitise, mandalarda subklinik mastitise, insanlarda pnömoni, osteomyelit ve sekonder olarak da endokarditise yol açar (Eldar ve ark 1996, Teixeira ve ark 1996, Fefer ve ark 1998, Zlotkin ve ark 1998, James ve ark 2000, Afonso ve ark 2003). Japonya'da sarı kuyruk'ların (yellowtail) en önemli bakteriyel hastalık etkenlerinden biri olan *L. garvieae* aynı zamanda tuzlu ve tatlı su balıkları içinde oportunistik bir patojendir (Okoda ve ark 2000, Ooyama ve ark 2002).

L. garvieae gökkuşağı alabalıklarında (özellikle yaz aylarında su sıcaklığının 15-22°C'ye ulaştığı zamanlarda) %60-80 oranında mortaliteye sebep olmaktadır (Eldar ve ark 1999, Diler ve ark 2002, Afonso ve ark 2003, Toranzo ve ark 2005). Bakteriyolojik ve moleküler çalışmalar (Zlotkin ve ark 1998, Diler ve ark 2002) *L. garvieae*'nin gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğinde hemorajik sepsiseminin, bilinen adıyla göz fırlaması (pop-eye) hastalığının etiolojisinde yer aldığını ortaya koymuştur (Afonso ve ark 2003). Hastalığın bilinen en genel semptomu ekzoftalmustur. Bazı vakalarda periorbital dokuda eksudat birikimi görülmekle birlikte genellikle gözün kaybıyla sonuçlanmaktadır (Afonso ve ark 2003). Diğer semptomlar ise abdominal gerginlik, gözlerde hemoraji, operkula ve yüzgeçlerin tabanı ile vücut yüzeyinde ülserasyonlar ve deride kararmalardır (Diler ve ark 2002, Afonso ve ark 2003).

Streptokokların laktik grubu içinde yer alan *S.*

lactis, *S. cremoris* gibi bakteriler, *Lactococcus* genusunun kurulmasıyla birlikte bu yeni gruba dahil edilmişlerdir (Teixeira ve ark 1996). Bu genusa eklenen türlerden bir tanesi de *L. garvieae*'dir (Austin ve Austin 1999). Bu tür ilk olarak mandalarda subklinik mastitis vakalarından izole edildiği için, ilk dönemde *S. garvieae* olarak adlandırılmıştır. Enterokokların identifikasyon ve klasifikasyonu çalışmalarında enterokokların tür özelliklerini göstermeyen ve birbirinden farklı çok sayıda Gram pozitif kok tanımlanmıştır (Teixeira ve ark 1996). DNA ve rRNA sekans özelliklerine göre *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. garvieae*'nin birbirinden ayrı tür olduğu kesin olarak belirlenmiştir (Teixeira ve ark 1996, Holt 1997).

L. garvieae, yuvarlak veya oval yapıda (0.5-0.6 µm), Gram pozitif, flagellasız, hareketsiz, sporsuz, tek ya da kısa zincirler oluşturan bir koktur. *L. garvieae* enfekte balık iç organlarından (dalak, böbrek ve beyin), farklı besi ortamları Brain Heart Infusion Agar (BHIA), %1 maya ekstraktlı ve %5 glukozlu Trypton Soya Agar (TSA) veya kanlı agarda 22°C'de 2-4 gün inkubasyon sonucunda izole edilebilir (Sneath 1986, Teixeira ve ark 1996, Holt 1997, Afonso ve ark 2003). *L. garvieae*'nin 10-45°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında ürettiği, en iyi üremenin 30 °C' de gerçekleştiği, tuzsuz ve/veya %1-6.5 tuz konsantrasyonları içeren besi yerlerinde üreyebildiği bildirilmiştir (Teixeira ve ark 1996, Holt 1997, Austin ve Austin 1999, Afonso ve ark 2003). TSA'da 25°C'de 48 saatte 0.2-0.5 mm çapında düz, hafif konveks, kabarık, yuvarlak, beyaz ile krem renginde yarı şeffaf koloniler oluşturmaktadır. Etkenin %5 koyun kanlı agardaki kültüründe koloniler etrafında α-hemoliz şekillenmektedir (Teixeira ve ark 1996, Afonso ve ark 2003).

Streptokokozis hastalığına sebep olan mikroorganizmaların biyokimyasal ve morfolojik özelliklerine göre cins ve tür düzeyinde tanımlamaları yapılabildiği, bu nedenle tür düzeyinde tanımlamanın enfeksiyonun etiolojisi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Facklam ve Elliott 1995). Ancak salgınlar esnasında izole edilen aynı tür içindeki bir çok suşun birbiri ile akrabalık ilişkisinin olup olmadığını belirlemek ve doğru aşılama stratejilerinin geliştirilmesi için tür içinde farklılık veya suş sınıflandırması olarak ifade edilen tiplendirmede bazı fenotipik ve genotipik özelliklerden de yararlanılmaktadır (Facklam ve Elliott 1995, Afonso ve ark 2003).

Rapid ID 32 Strep ve API 20 Strep testleri ile *Streptokokozis* kolay ve hızlı bir şekilde teşhis edi-

lebilmektedir. Ancak bu testler Streptokokkozis'in etiyolojik etkenlerini birbirinden kesin olarak ayıramamaktadır (Toranzo ve ark 2005). Nitekim *L. garvieae* ile *L. lactis subsp. lactis* veya *S. iniae* ile *S. uberis*'in biyokimyasal testlerinin benzerliğinden dolayı bu testlerle ayırt edilemediği bildirilmiştir (Facklam ve Elliot 1995, Bascomb ve Manafi 1998, Toranzo ve ark 2005).

Fenotipik olarak *L. garvieae*'nin biyokimyasal (sakkaroz, tagatoz, mannitol, siklodekstrin vs) ve enzim API 20 Strep ve API 50 CH (piroglutamik asit arilamidaz, N-asetil- α -glukozaminidaz vs) testleri ile İtalyan ve Japon (biyotip 1), Avustralya (biyotip 2) ve İspanya (biyotip 3) olmak üzere 3 farklı biyotipinin ve serolojik olarak KG- (kapsüllü) ve KG+ (kapsülsüz) olmak üzere 2 serotipinin olduğu bildirilmektedir (Eldar ve ark 1999).

Epidemiyolojik çalışmalar (Vela ve ark 2000) balıklardaki streptokokkozis hastalığının etkenlerinden biri olan *L. garvieae* suşlarının fenotipik ve genotipik farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Vela ve ark (2000), çeşitli ülkelerden temin edilen ve farklı balık türlerinden izole edilen *L. garvieae* suşlarını Restriction Fragment Length Polymorphism Ribotyping (PFGE) tekniği ile incelediklerinde, genetik olarak farklılık gösteren 19 pulstotipini saptamışlardır. Ravelo ve ark (2003), değişik ülkelerin işletmelerindeki balıklardan izole edilmiş 57 adet *L. garvieae* izolatının RAPD-PZR analizi ile A, B ve C olarak isimlendirdikleri 3 farklı genomik grup ve 10 farklı RAPD profil tespit etmişlerdir.

Aşılamanın laktokokkozis ile mücadelede etkin bir yol olduğu belirtilmektedir (Romalde ve ark 2004). Bununla birlikte aşılamanın başarısı konakçıdaki türe, uygulama yoluna ve kullanılan adjuvantın tipine göre değişmektedir (Afonso ve ark 2003). Alabalıklarda bu hastalığa karşı uygulanan ticari aşuların etkinliğinin düşük olduğu ve koruma süresi 3-6 ay arasında değiştiği belirtilmektedir (Afonso ve ark 2003, Toranzo ve ark 2005). Etkili aşılama stratejilerinin geliştirilebilmesi için streptokokkozis hastalığına neden olan bölgesel olarak yaygın *L. garvieae* izolatlarının saptanması ve bu türlere karşı etkili koruma önlemlerinin alınması gerektiği bildirilmektedir (Ravelo ve ark 2003, Romalde ve ark 2004).

Bu çalışmada Konya ili ve çevresindeki gökkuşluğu alabalığı çiftliklerinde özellikle yaz aylarında Streptokokkozis'e neden olan *L. garvieae*'nin izolasyonu, identifikasyonu ve bölgesel yaygın suş'unun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Balık Örnekleri

Bu araştırma, Konya ili ve çevresinde alabalık üretimi ile yetiştiriciliği yapılan çiftliklerdeki gökkuşluğu alabalıkları üzerinde yapıldı. Balık örnekleri; su sıcaklığında önemli değişimlerin gözlemlendiği ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında 'pop eye' sendromu gösteren balıkların bulunduğu çiftliklerden alındı. Bu amaçla 6 adet gökkuşluğu alabalığı çiftliğinden Haziran 2002-Ağustos 2004 tarihlerini kapsayan 2 yıllık süre içerisinde 180 adet hastalıklı alabalık toplandı.

Her çiftlikten alınan 80-180 g arasındaki 6'şar adet hastalıklı alabalığı canlı olarak laboratuvara getirmek amacıyla 20 litrelik poşetlerin 1/3'üne kadar su diğer kısma ise oksijen verilerek ağızları burulmak suretiyle kapatıldı. Laboratuvara canlı getirilen balıkların otopsileri yapılarak aseptik koşullarda alınan marazi maddelerden (göz, karaciğer, dalak, kalp ve beyin) %5 'lik koyun kanlı agar'a ve TSA'ya ekimleri yapılarak 28°C'de 24-48 saat aerobik olarak inkübe edildi. Üreyen tipik α -hemolizli koloniler seçilerek oksidaz ve katalaz testleri ile Gram boyama yapıldı. Oksidaz ve katalaz negatif Gram (+) bakterilere, referans suşlarla balıklardan hazırlanan anti *L. garvieae* hiperimmün serumu ile lam aglütinasyon testleri yapıldı. Konvansiyonel bakteriyolojik ve API 20 Strep testleri ile *L. garvieae*'nin identifikasyonun tam olarak yapılamaması nedeni ile izole edilen tüm suşların doğrulanması amacıyla Zlotkin ve ark (1998) önerdiği PZR yöntemi uygulandı.

Kapsül varlığının belirlenmesi

İzolatlarda kapsül varlığı belirlenmesi amacıyla *L. garvieae* suşları % 5 defibrine koyun kanı ilave edilmiş TSA'ya ekilerek (Oxoid, CM 131), 24°C'de 48 saatte üretildi. Suşlara ait kolaniler 0,5 ml Fosfat tampon solüsyonunda (pH 7.4) süspanse edilerek eşit miktarda fizyasyon solüsyonundan (100mM L-lisin HCl içeren % 2,5 luk glüteraldehit) ilave edildi ve 20 dakika oda ısısında bekletildi. Bu solüsyondan yuvarlak uçlu öze ile bir öze dolusu alınarak lam üzerine yayıldı ve kurutuldu. Hazırlanan preparat basık fuksin ile 3 dakika boyandı ve yıkanarak kurulandı. Işık mikroskopunda çevresi hale tarzında boya almayan kırmızı boyanan bakteriler kapsül yününden pozitif olarak değerlendirildi (Çağırğan 2004).

Bulgular

İzole edilen *L. garvieae* izolatları ve yıllara göre dağılımı

L. garvieae Suşları

Araştırmada, 2002-2004 yılları arasında Konya ili ve çevresindeki alabalık çiftliklerinden izole ve tanımlanmış 30 adet *Lactococcus garvieae* saha suşu ve 2 adet referans suş (*L. garvieae* ATCC 49156, *L. garvieae* NCDO 2155) olmak

üzere toplam 32 adet suş kullanıldı (Tablo 1).

Referans suşlar *L. garvieae* ATCC 49156 suşu Dr. Chan Lee (Kore) ve *L. garvieae* NCDO 2155 suşu ise Dr. Jesus L. Romalde (Santiago, Compostela, Spain)'den sağlandı.

Tablo 1. *L. garvieae* izolatlarının kaynaklara ve yıllara göre dağılımı

Kaynak	2002	2003	2004	Toplam (adet)
Papila/Kaşören	ST*-1 ve ST-2	ST-3 ve ST-4	ST-5 ve ST-6	6
Beyköy/Cihanbeyli	ST-7 ve ST-8	ST-9 ve ST-10	ST-11 ve ST-12	6
Zengi/Sarayönü	ST-13 ve ST-14	ST-15 ve ST-16	ST-17 ve ST-18	6
Aydoğdu/Ilgın	ST-19 ve ST-20	ST-21 ve ST-22	ST-23 ve ST-24	6
FETAAlabalık/Selçuklu	ST-25 ve ST-26	ST-27 ve ST-28	-	4
Hatıp Alabalık Tesisleri/Karatay		ST-29 ve ST-30	-	2
Kore		ATCC 49156		1
İspanya			NCDO 2155	1
Genel Toplam	10	13	9	32

*ST=suş, ATCC 49156 ve NCDO 2155; *L. garvieae*'nin referans suşlarıdır.

L. garvieae suşlarının kapsül varlığının

Konya ili ve çevresinden izole edilen *L. garvieae* izolatlarının (ST1-ST30) tamamı ve kullanılan referans suşlar (*L. garvieae* ATCC 49156 ve *L. garvieae* NCDO 2155) kapsül yönünden pozitif bulundu.

L. garvieae suşlarının mikrobiyolojik testleri

Mikrobiyolojik testlerle ilgili sonuçlar (Tablo 2) incelendiğinde, izole edilen *L. garvieae* suşları ile referans suşların fenotipik özelliklerinin büyük ölçüde benzer olduğu, ancak karbonhidrat testlerinde (D-galaktoz, laktoz, mannitol, rafinoz, sakkaroz, ve L-Rhamnoz) farklılıklar olduğu gözlemlendi (Tablo 3).

L. garvieae ATCC 49156 ve *L. garvieae* NCDO 2155 nolu referans suşların D- galaktoz, laktoz, rafinoz, sakkaroz ve L-rhamnoz test sonuçları karşılaştırıldığında *L. garvieae* ATCC 49156 negatif bulunurken *L. garvieae* NCDO 2155'in sadece mannitol testi negatif olarak tespit edildi (Tablo 2 ve

3). *L. garvieae*'nin saha suşlarının D-galaktoz, mannitol, sakkaroz testleri pozitif ve laktoz, rafinoz ve rhamnoz testleri yönünden negatif olduğu, *L. garvieae* saha suşları ile *L. garvieae* NCDO 2155'in D-galaktoz, mannitol ve sakkaroz test sonuçları yönünden ile aynı olduğu tespit edildi.

L. garvieae suşlarının API 20 Strep testi sonuçları

API 20 Strep test sonuçlarına göre, *L. garvieae* ATCC 49156 ve *L. garvieae* NCDO 2155 suşları arasında karbonhidrat (inülin, rafinoz, laktoz, arabinoz) testlerinde farklılıklar tespit edildi. *L. garvieae*'nin saha suşlarının (ST1-ST30) fenotipik özelliklerinin benzer bulundu (Tablo 4).

Mini API reader aracılığı ile testler 4 saat inkübasyondan sonra okutulduğu zaman identifikasyonda izolatlar %66.4 oranında *L. lactis lactis*, %29.1 oranında *E. faecalis*, %3.7 oranında *E. faecium*, %0,9 oranında da *E. durans* ile benzer

Tablo 2. *L. garvieae* suşlarının kültürel ve biyokimyasal testler kullanılarak belirlenen fenotipik özellikler

Fenotipik Özellikler	ATCC 49156	NCDO 2155	ST1-30
Gram Boyama	+	+	+
Koloni Formu	S	S	S
Hareket	μ	μ	μ
α -Hemoliz	+	+	+
O/F	+	+	+
Oksidaz	μ	μ	μ
Katalaz	μ	μ	μ
Mac Conkey'de Üreme	μ	μ	μ
TSA+%1 Yeast Extract'de Üreme	+	+	+
TSB, BHI ve NA'de Üreme	+	+	+
Kanlı Agar	+	+	+
Metil Red	+	+	+
H ₂ S	μ	μ	μ
Tuzsuz peptonlu su	+	+	+
%2.5 NaCl peptonlu su	+	+	+
%6.5 NaCl peptonlu su	+	+	+
D-Glukoz	+	+	+
D-Galaktoz	μ	+	+
Laktoz	μ	+	μ
Mannitol	μ	μ	+
L- Arabinoz	μ	μ	μ
Raffinoz	μ	+	μ
D Mannoza	+	+	+
D – Sorbitol	μ	μ	μ
Eskülin	+	+	+
Sakaroz	μ	+	+
İnülin	μ	μ	μ
Furuktoz	+	+	+
Xyloz	μ	μ	μ
L-Rhamnoz	+	+	μ
Dulcitol	μ	μ	μ

Tablo 3. *L. garvieae* suşları arasındaki fenotipik farklılıklar

Fenotipik Özellik	ATCC 14956	NCDO 2155	Saha Suşları (ST1-30)
D-Galaktoz	-	+	+
Laktoz	-	+	-
Mannitol	-	-	+
Raffinoz	-	+	-
Sakaroz	-	+	+
L-Rhamnoz	-	+	-

* ST: Strain : Suş

Tablo 4. *L. garvieae* suşlarının API 20 Strep testi kullanılarak belirlenen fenotipik özellikler.

Test	ATCC 49156	Sonuç	
		NCDO 2155	Saha suşları (ST 1-30)
Voges Proscauer	+	+	+
Hippurat hidrolizi	-	-	+
Eskulin	+	+	+
pyrolarilamidaz	+	+	+
a-Galaktosidaz	-	-	-
a-Glukuronidaz	-	-	-
a-Galaktosidaz	-	-	-
PAL	-	-	-
LAP	+	+	+
Arjinin dihidrolaz	+	+	+
Riboz	+	+	+
Arabinoz	-	-	-
Mannitol	-	-	+
Sorbitol	-	-	-
Laktoz	-	+	-
Trehaloz	+	+	+
Inulin	-	-	-
Raffinoz	-	+	-
AMD	-	-	+
GLYG	-	-	-
a-hemoliz	-	-	-

PAL: Alkalın Fosfotaz LAP: Lösün arilamidaz, AMD: Amidon, GLYG: Glikojen

* ST: Strain : Suş

Tablo 5. API 20 Strep testinin 4 saat inkübasyondan sonra değerlendirilmesi.

Test kiti API 20 strep	V6.0: Low Discrimination	Profile:	7143111
<i>Lactococcus lactis lactis</i>		% id=66.4	T=0.84
<i>Enterococcus faecalis</i>	Sorbitol: %92, Laktoz:%92	%id=29.1	T=0.65
<i>Enterococcus faecium</i>	a-Gal: %90, Laktoz:%84	%id=3.7	T=0.65
<i>Enterococcus durans</i>	a-Gal: %76, Laktoz:%84, Mannoz:%2	%id=0.9	T=0.50

a-Gal: a-Galactosidase

Tablo 6. API 20 Strep testinin 24 saat inkübasyondan sonra değerlendirilmesi.

Test kiti API 20 strep	V6.0: Good Discrimination	Profile:	6143111
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	VP: %90	%id=90	T=0.69
<i>Enterococcus faecalis</i>	VP: %99 Sorbitol: %92 Laktoz:%92	%id=6.6	T=0.37

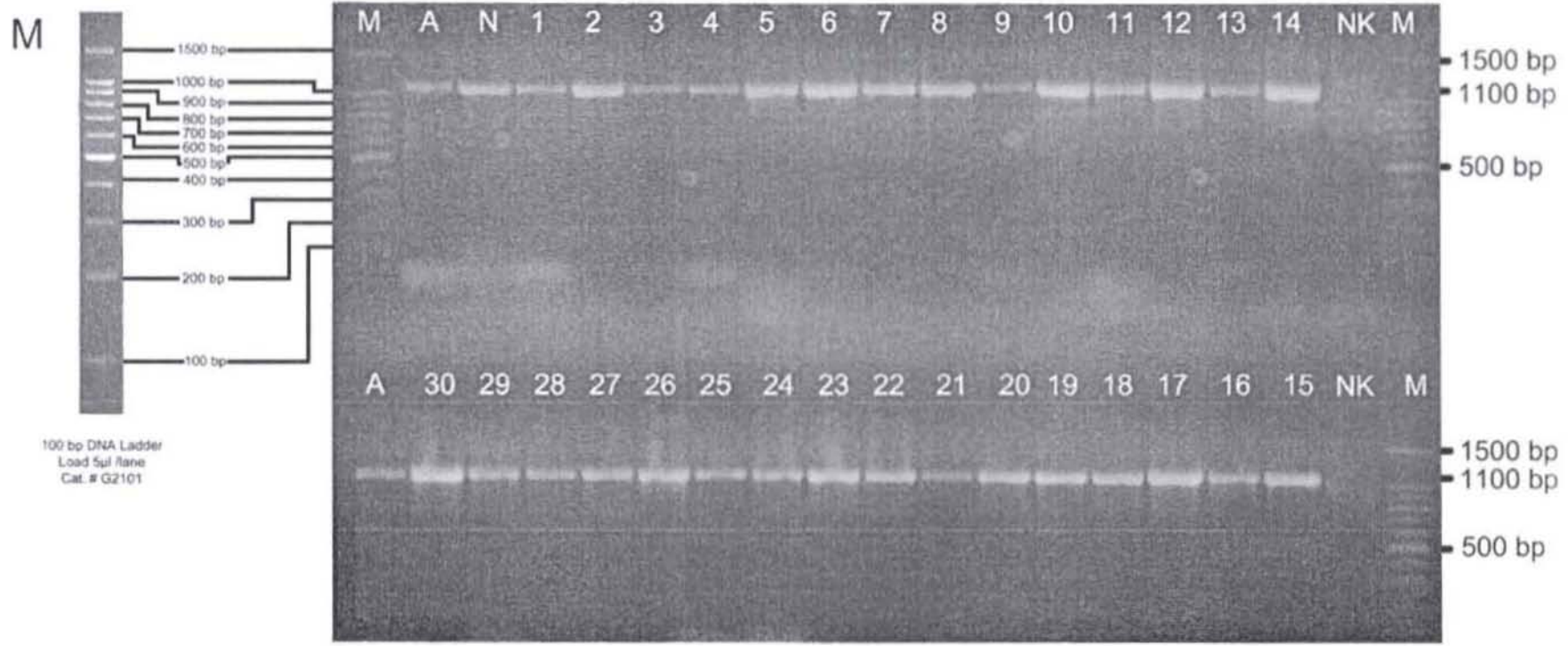
VP: Voges Proscauer

(Tablo 5); 24 saat inkübasyondan sonra da %90 oranında *L. lactis lactis* ve %6.6 oranında da *E. faecalis* benzediği (Tablo 6) tespit edildi.

API 20 Strep testi sonucunda *L. garvieae* ATCC 49156; 5143010, *L. garvieae* NCDO 2155; 5143150 ve *L. garvieae* saha suşları da 7143111 kodlu profili gösterdi.

PZR

Çalışmada, toplam 32 adet *L. garvieae* suşunun (ST1-30, ATCC 49156 ve NCDO 2155), *L. garvieae*'nin 16S rRNA (EMBL giriş no X54262) gen bölgesine yönelik seçilen pLG-1 (5'-CA-TAACAATGAGAATCGC-3' ve pLG-2 (5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3') primerleri ile Zlotkin ve ark (1998) bildirdiği yöntemle göre yapılan PZR sonucunda tüm suşlar agaroz jel elektroforezinde 1100 bp'de tür spesifik bantları verdi (Resim 1).

Resim 1. *L. garvieae* ATCC 49156, N; NCDO 2155, 1-30 saha suşları'nın PZR ile spesifik bantlarının görüntülenmesi

M: Marker 100 bp (1500 bp, Promega), A: *L. garvieae* ATCC 49156, N: *L. garvieae* NCDO 2155, NK: Negatif Kontrol ve 1-30: Saha suşlarına ait 1100 bp'lik tür spesifik bantları

Tartışma ve Sonuç

Laktokokkozis dünyada tatlı su balık yetiştiriciliğinin önemli bir sorunudur (Eldar ve ark 1999, Vela ve ark 2000, Eyngor ve ark 2004, Matta ve ark 2004, Toranzo ve ark 2005). *Laktokokkozis*'in kültürü yapılan gökkuşuğu alabalığı, kedi balığı, ayu, yılan balığı, tilapia, yellowtail, sazan ve karides çiftliklerinde önemli kayıplara sebep olduğu bildirilmiştir (Zlotkin ve ark 1998, Austin ve Austin 1999, Alim ve ark 2001, Chen ve ark 2001, Diler ve ark 2002, Cheng ve ark 2003, Ravelo ve ark 2003).

Vela ve ark. (2000), farklı ülke ve balık türlerinden izole ettikleri *L. garvieae*'nin 13 biyotipinin olduğunu bildirirken Eldar ve ark. (1999), 3 biyotipinin olduğunu ve en yaygın biyotipinin İspanya biyotip 3 olduğunu bildirmişlerdir. Çağırğan (2004), Türkiye'den izole edilen *L. garvieae* izolatlarının biyotip 3 olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada *L. garvieae* saha suşlarının hepsi Gram pozitif 2-10 kok zinciri içeren, % 5 koyun kanlı agarda α -hemolitik özelliğine sahip iken oksidaz, katalaz, H₂S üretimi, indol testi ve hareket testleri negatif olarak saptandı. D-galaktoz, laktoz, mannitol, rafinoz, sakkaroz ve L-rhamnoz testleri yönünden referans suşlarla karşılaştırıldıkları zaman % 50 oranında *L. garvieae* ATCC 49156'ya %33.3 oranında da *L. garvieae* NCDO 2155 ile örtüşdüğü gözlenmiştir.

Ravelo ve ark. (2001) ve Chang ve ark. (2002) yaptıkları çalışmalarda *L. garvieae*'nin İspanya suşlarının %96'sının, Tayvan suşlarının ise %20'sinin laktozdan asit oluşturduklarını, Çağırğan (2004) Türkiye'den izole ettikleri 20 adet *L. garvieae* suşunun 8 tanesinin (% 40) laktozdan asit oluşturduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada ise kullanılan saha izolatlarının tamamının (30 adet) laktozdan asit oluşturduğu saptanmıştır.

Bu çalışmadaki tüm saha suşları hippurat'ı hidrolize ederken Eldar ve ark. (1999), yaptığı çalışmada İtalya, Avusturya ve Japon izolatlarının hippuratu hidrolize etmediğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada kullanılan referans suşlarında hippuratu hidrolize edemediği saptanmıştır.

Çalışmamızdaki *L. garvieae*'nin saha izolatlarının API profilleri, *L. garvieae* ATCC 49156 ile % 85.7 oranında, *L. garvieae* NCDO 2155 ile % 76.2 oranında örtüşmektedir. Referans suşlar kendi aralarında karşılaştırıldıkları zaman ise % 90.5 oranında test sonuçlarının örtüşdüğü saptanmıştır.

Bu çalışmadaki *L. garvieae* saha izolatları, tavşandan hazırlanan kapsül pozitif *L. garvieae* ATCC 49156 ve NCDO 2155 antiserumları ile lam aglütinasyon testinde pozitif sonuç verdi. Ayrıca saha suşları kendi aralarında mikrobiyolojik ve API 20 Strep testlerinde tek bir profil gösterirken referans suşlarla farklılıklar gösterdi.

Sonuç olarak;

1. Konya ili ve çevresindeki çiftliklerde özellikle yaz aylarında 'pop eye' sendromu ile seyreden *Streptokokkozis* hastalığının etkeninin *L. garvieae* ve kapsüllü olduğu,

2. Suşların Fenotipik özellikleri bakımından homojen olduğu,

3. Saha suşlarının fenotipik özellikleri ile referans suşların fenotipik özellikleri arasında farklılıklar olduğu ve API 20 Strep testi sonucunda *L. garvieae* ATCC 49156'nın 5143010, *L. garvieae* NCDO 2155'in 5143150 ve *L. garvieae* saha suşlarının da 7143111 kodlu profili gösterdiği,

4. *L. garvieae*'nin API 20 Strep ile identifikasyonda %66.4 oranında *L. lactis subsp lactis*, %29.1 oranında *E. faecalis*, %3.7 oranında *E. faecium* ve %0,9 oranında da *E. durans* olarak identifiye edildiği ve identifikasyonda bunların göz önünde bulundurulması gerektiği,

5. Saha suşları arasındaki polimorfizmin gösterilmesinde API 20 Strep ve klasik mikrobiyolojik testlerin tek başlarına yeterli olmadığı, ancak RAPD-PZR ve SDS-PAGE gibi daha hassas moleküler teknikler ile suşlar arasındaki polimorfizm tespit edilebileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

Afonso A, Silva Jr And Gomes S (2003) *Lactococcus garvieae* trout infections in Portugal: A new challenge on fish vaccinology. Institute for Molecular and Cell Biology, IBMC News feb03; 1-10.

Alim SR, Anvar Hossain M, Chowdhury EK and Kusuda R (2001) G1 antigen: a cell-surface immunoprotective 96 kDa glycoprotein from the virulent fish pathogen *Enterococcus seriolicida*, its purification and characterization. Adv Appl Microbiol 32, 357-367.

Austin B and Austin DA (1999) Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish. Second Edition Ellis Norwood Ltd. London.

Bachrach G, Zlotkin A, Hurvitz A, Evans D and Eldar A (2001) Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine. Appl Environ Microbiol. 67(8): 3756-3758.

Bascomb S and Manafi M (1998) Use of enzyme tests in

- characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-positive cocci. *Clin Microbiol Rev.* 11(2): 318-340.
- Belton D (2002) Import risk assessment: juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) from Spencer Gulf aquaculture, South Australia. NIWA Client Report 1-58.
- Betzl D, Ludwig W and Schleifer KH (1990) Identification of *Lactococci* and *Enterococci* by colony hybridization with 23S rDNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 56 (9): 2927-2929.
- Blaizotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F, Andolfi R and Moschetti G (2002) 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis. *Appl Microbiol* 25, 520-527.
- Chang PH, Lin CM ve Plarre (2002) *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 22(5): 319-327.
- Chen SC, Lin YD, Liaw LL and Wang PC (2001) *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Dis Aquat Org* 45: 45-52.
- Cheng W, Juang FM, Li JT, Lin MC, Liu CH and Chen JC (2003) The immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to *Lactococcus garvieae* in relation to moult stage. *Aquaculture* 218, 33-45.
- Çağırğan H (2004) Biotyping of *Lactococcus garvieae* isolated from Turkey. *E U Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 21(3-4): 267-269.
- Diler Ö, Altun S, Adiloglu AK, Kubilay A and Isikli B (2002) First occurrence of *Streptococcosis* affecting farmed rainbow trout in Turkey. *Bull Eur Fish Pathol* 22: 21-26.
- Eldar A, Ghittino C, Asanta L, Bozzetta E and 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, Gloria M, Ghittino C, Zlotkin A, Bercovier H (1999) Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1005-1008.
- Elliott JA and Facklam RR (1996) Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. *J Clin Microbiol.* 34 (5): 1296-1298.
- Ellis AE (1988) *Fish vaccination*. Academic Press, London.
- Eyngor M, Zlotkin A, Ghittino C, Prearo G, Douet DG, Chilmoneczyk S and Eldar A (2004) Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean Countries. *Appl Environ Microbiol* 70 (9): 5132-5137
- Facklam R and Elliott JA (1995) Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the *Streptococci* and *Enterococci*. *Clin Microbiol Reviews.* 8(4): 479-495.
- Fefer JJ, Ratzan KR, Sharp SE and Saiz E (1998) *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 32: 127-130.
- Fihman V, Raskine L, Barrou Z, Kiffel C, Riahi J, Berçot B and Sanson-Le Pors MJ (2005) *Lactococcus garvieae* endocarditis: identification by 16S rRNA and *sodA* sequence analysis. *J Infect.* (Article in press)
- Heppell J and Davis HL (2000) Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Adv Drug Deliv Rev.* 43: 29-43.
- Holt JG (1997) Group 17 'Gram-Positive Cocci' 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology' Ed by JG Holt 9 Edition 540. Williams and Wilkins USA.
- James PR, Hardman SMC and Patterson DLH (2000) Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae*: a first case report. *Postgrad Med J* 76: 301-303.
- Matta AI, Gibello A, Casamayor A, Blanco MM, Dominguez L and Fernandez-Garayzabal JF (2004) Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water *Streptococcosis* in fish. *Appl Environ Microbiol* 70 (5): 3183-3187.
- Okada T, Minami T, Ooyama T, Yasuda H and Yoshida T (2000) Capsular and non-capsular antigen localization on *Lactococcus garvieae* isolated from yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Fisheries Science*, 66(5):992-994.
- Ooyama T, Hirokawa Y, Minami T, Yasusa H, Nakai T, Endo M, Ruangpan L and Yoshida T (2002) Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis Aquat Org*, 51:169-177
- Ravelo C, Magarinos B, Romalde JL, Toranzo AE (2001) Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 21(4) 136-144
- Ravelo C, Magarinos B, Romalde SL, Toranzo AE and JL Romalde (2003) Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*, 41(2): 751-756.
- Robertson PAW, O'Dowd CO, Burrells C, Williams P and Austin B (2000) Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*

185: 235-243.

Romalde JL, Alvarez AL, Ravelo C, Toranzo AE and Mendez JB (2004) Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish *Lactococcosis* Aquaculture. Aquaculture, 236, 119-129.

Sneath P.H.A (1986) Section 12. Gram-Positive Cocci. Ed by PHA Sneath 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology' (2) 1070 Williams and Wilkins USA.

Teixeira LM, Merquior VL, Vianni MC, Carvalho MG, Fracalanza SE, Steigerwalt AG, Brenner DJ and Facklam RR (1996) Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. Int J Syst Evol Microbiol, 46: 664-668.

Toranzo AE, Beatriz M and Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture, (Article in press).

Vela AI, Vazquez J, Gibello A, blanco MM, Moreno MA, Liebana P, Albendea C, Alcala B, Mendez A, Dominguez L and Garayzabal JFF (2000) Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from *Lactococcosis* outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. J Clin Microbiol, 38(10): 3791-3795.

Vinitnantharat S (2001) Immunological methods of disease control. Aquatic Animal Health Division, Alpha Pharma Inc. 103-109.

Zlotkin A, Eldar A, Ghittino and C Bercovier (1998) Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J Clin Microbiol, 36(4): 983-985.