



## Bir Alabalık Çiftliğinde Doğal Enfekte Gökkuşluğu Alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) *Lactococcus garvieae*'nin Kültür ve PCR ile Saptanması ve Etkenin Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Belirlenmesi

Yüksel DURMAZ<sup>1</sup>, Yunus KILIÇOĞLU<sup>2</sup>

1. Veteriner Kontrol Enstitüsü, Balık Hastalıkları Laboratuvarı, Atakum, Samsun, TÜRKİYE.
2. Veteriner Kontrol Enstitüsü, Seroloji Laboratuvarı, Atakum, Samsun, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
28.11.2014	12.03.2015	20.10.2015

**Öz:** Bu olgu sunumunda, Karadeniz Bölgesi'nde enfeksiyon çıkan bir ticari gökkuşluğu alabalığı çiftliğinden toplanan 8 adet balık örneği incelendi. Hastalık etkeni saptandı ve etkenin antibiyotik duyarlılık profili araştırıldı. Salgın 21°C su sıcaklığında ve 2014 yılı Ağustos ayı içerisinde görüldü. Enfeksiyon bir aylık süre içerisinde % 70-75 oranında mortaliteye neden oldu. Bakteriyolojik incelemeler sonucunda 4 balığın karaciğer, dalak ve böbreklerinden Tryptic Soy Agar, McConkey Agar ve Shotts-Waltman Agar'da *Lactococcus garvieae* izole edildi. Suşların identifikasyonu kültür tekniği ile konfirmasyonu ise moleküler yöntemlerle yapıldı. Çalışmada elde edilen izolatların fenotipik özelliklerinin birbirleriyle uyumlu olduğu saptandı. Suşların tamamı florfenikol, eritromisin, oksitetrasiklin, amoksisilin ve ampisiline duyarlı, trimetoprim, sulfametoksazol/trimetoprim ve okzolinik asite dirençli bulundu. Enrofloxasin, sefoperazon, kanamisin, neomisin, ve gentamisine karşı değişen oranlarda duyarlılık belirlenirken suşların tamamında çoklu antibiyotik direnci tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik duyarlılık, Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), İzolasyon, *Lactococcus garvieae*, PZR.

## Detection of Naturally Infected Rainbow Trouts (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) by *Lactococcus garvieae* with Molecular Methods and Culture Techniques and Determination of Antibiotic Susceptibility Profiles of Agent in a Trout Farm

**Abstract:** In this case report, 8 fish samples taken from a commercial Rainbow trout farm during outbreak in the Black Sea Region were investigated. Causal agent of the outbreak was detected and its antibiotic susceptibility profile was investigated. The outbreak was observed at 21°C temperature in August, 2014. The 70-75 % mortality rate was caused by the agent in a month. *Lactococcus garvieae* were isolated from liver, spleen and kidney of 4 fish on the Tryptic Soy Agar, McConkey Agar and Shotts-Waltman Agar as the result of bacteriological examinations. Isolated strains were identified by biochemical tests and were confirmed by molecular methods. Similar phenotypic properties were shared by outbreak isolates. All the strains were sensitive to florfenicol, erythromycin, oxytetracycline, amoxicillin, ampicillin while all strains were resistant to trimethoprim, sulfamethoxazole/trimethoprim and oxolinic acid. The sensitivity of enrofloxacin, cefoperazone, kanamycin, neomycin, and gentamicin were determined at varying rates. Multidrug resistance was also detected in all the strains.

**Keywords:** Antibiotic susceptibility, Isolation, *Lactococcus garvieae*, PCR, Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

## GİRİŞ

**L**actococcus garvieae (*L. garvieae*) balıklarda Laktokokkozis olarak bilinen önemli bir enfeksiyona neden olmaktadır. *Lactococcus cinsi 7* türü kapsar; *L. garvieae*, *L. fujiensis*, *L. piscium*, *L. chungangensis*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* ve *L. lactis*. *L. garvieae* cins içerisinde patojen olarak sınıflandırılan tek türdür (1). Laktokokkozis spesifik olarak kültür balıklarında % 50-80 civarında kayıplara neden olmaktadır (2,3). *L. garvieae* Gram pozitif, 0.7-1.4 µm çapında, oval, sporsuz, flagellasız, kapsüllü veya kapsülsüz olabilen, hareketsiz, sıvı besiyerlerinde kısa zincirler oluşturan, kanlı agarda alfa hemoliz özellik gösteren fakültatif anaerob bir bakteri olup, katı besiyerlerinde 1 mm çapında gri veya beyaz renkli yuvarlak koloniler oluşturur (4,5).

*L. garvieae* zoonoz bir bakteri olup; kümes hayvanlarından, kedi ve köpek tonsillerinden (6), süt ürünlerinden, peynirler, et ürünleri, sebzeler ve tahıllar gibi farklı kaynaklardan izole edilmiştir. Kurbağaların ve insanların barsaklarında fırsatçı patojen olarak bulunur (7). Etkenin balıklardan izolasyonu ilk kez Japonya da sarıkuyruk balıklarından daha sonra başta gökkuşuğu alabalığı olmak üzere, yellowtail, tilapia, japon yılan balığı, pisi balığı, dev tatlı su karidesi ve kefal balıklarından yapılmıştır (8). İnfekte balıklarda en önemli tipik belirti tek ya da çift taraflı egzoftalmus, korneada opaklaşma ve kalınlaşma, bazan katarakt, harekette yavaşlama, denge kaybı, deride kararma, karında şişlik ve karın boşluğunda sıvı birikimi, barsaklarda ve karaciğerde anemi, dalakta hemoraji, splenomegali, anüste prolapsus, hemoraji ve hiperemi görülür. Hastalık vakalarının görüldüğü çiftliklerin çoğunluğu su kaynağı olarak nehir ve ırmakları kullanmakta ve bu suların ısı 14-22°C arasında değişmektedir (9,10). Türe ve ark. (8)'nin yaptıkları deneysel enfeksiyon çalışmaları ile etkenin deniz levreği ve kalkan balıklarında enfeksiyon oluşturmadığı saptanmıştır.

Laktokokkozis, Güney Afrika, Avustralya, Kore, Japonya, Tayvan, İran İngiltere, İtalya, İspanya, İsrail, Fransa, ABD, Bulgaristan, Yunanistan ve Portekiz gibi

birçok ülkede kültür balıklarında görülmüştür (11). Türkiye'de ilk vaka bildirimi 1995 yılında yapılmış olup, bu yıldan itibaren hastalık ülkemizde endemik olarak görülmeye devam etmektedir (12,13). Bu çalışmada, Karadeniz Bölgesi'nde salgın çıkan bir gökkuşuğu alabalığı çiftliğinde hastalık etkeninin belirlenmesi ve tedavide önerilebilecek uygun antibiyotiklerin seçilmesine yönelik incelemeler yapılması amaçlanmıştır.

## OLGU SUNUMU

### Örnekler ve Mikrobiyolojik İncelemeler

2014 yılı Ağustos ayında Karadeniz Bölgesi'nde hastalık çıkan bir işletmeden toplanan, 15-18 cm boylarında 50-80 gr ağırlığında 8 adet alabalık örneği bakteriyolojik yönden incelendi. Enfekte balıkların karaciğer, dalak ve böbreklerinden Tryptic Soy Agar (TSA), McConkey Agar (MCA), Cytophaga Agar (CA) ve Shotts-Waltman Agar (SWA)'a ekimler yapıldı ve besiyerleri 22°C'de, 48 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda besiyerinde üreyen koloniler saflaştırıldıktan sonra konvansiyonel yöntemlerle morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterlerine göre identifiye edildi (14,15).

### İzolatların Moleküler İdentifikasyonu

Konvansiyonel yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu yapılan izolatların doğrulanması Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile yapıldı. DNA izolasyonu kaynatma yöntemiyle yapıldı. Bu amaçla; deiyonize otoklav edilmiş su (deiyonize steril su)'dan 500 µl 2 ml'lik bir tüpe aktarıldı. Besiyerinde üreyen kolonilerden ¼ öze dolusu kültür bu tüp içerisine aktarılarak karıştırıldı ve 100°C'de 20 dakika termal shaker ile 900 rpm'de çalkalanarak kaynatıldı. 12.500 rpm'de 5 dakika santrifüje edildikten sonra soğutuldu. Tüpün yüzeyinde kalan sıvıdan 200-300 µl alınarak başka bir tüpe aktarıldı. İçerisinde DNA bulunan bu yüzey sıvısı template (hedef DNA) olarak kullanıldı (16).

*L. garvieae* için dizayn edilmiş 16S rRNA spesifik gen bölgelerini çoğaltan ve 857 bp uzunluğunda bant oluşturan primerlerden; LgF: 5'-CCA ACT TCC GTG GTG TGA CG-3' ve LgR 5'-AGT GGC TCA ACC ATT GTG TGC-3' kullanılarak amplifikasyon yapıldı (17, GenBank accession number FJ915634). PZR işleminde pozitif kontrol olarak "Lgper" bakteri DNA'sı kullanıldı. Lgper bakteri suşu Türe ve ark. (8) tarafından Ordu/Perşembe'de enfeksiyon çıkan bir Gökkuşuğu alabalığı çiftliğinden izole edilmiş ve sekans analizleri yapılmıştır. Örnek DNA'sı içermeyen deiyonize steril su negatif kontrol olarak kullanıldı. Türe (18) tarafından bildirilen PZR prosedürü optimize edildi. Optimizasyon çalışmalarından sonra izolatların PZR incelemelerine başlandı. DNA yükseltgenmesi 25 µl'lik reaksiyon hacmi için, 5 µl master mix (SolisBioDyne, 5X Firepol Ready to load 12,5 mM. MgCl<sub>2</sub>), herbir primerden (ileri ve geri primer, 10 pmol) 0,5 µl, 3 µl hedef DNA ve 16 µl deiyonize steril su kullanıldı. Bakterilerin 16S rRNA spesifik gen bölgelerinin çoğaltılması için thermal cycler (Techne TC-512)'da; 95°C'de 15 dakika'lık ön denaturasyon yapıldıktan sonra döngülere geçildi. 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 58°C'de 50 saniye annealing, 72°C'de 1 dakika uzama işlemi için 35 döngü uygulandı. Reaksiyon 72°C'de 10 dakika son uzama ile tamamlandı. Amplifikasyon sonrasında örnekler 1x TBE tampon çözeltide, 2 µl etidium bromür (5mg/ml) içeren %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve ultraviole transilluminatör ile görüntülendi.

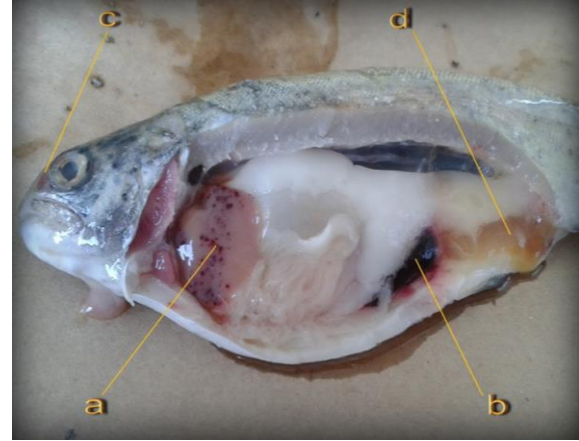
#### Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antibiyotik duyarlılık testi Kirby – Bauer Disk Diffüzyon yöntemiyle, Mueller – Hinton besiyerinde, Bauer ve ark. (19)'nın yöntemiyle, değerlendirilmesi ise Clinical and Laboratory Standards Institute (20), Ruangpan ve Tendencia (21) ile Becton Dickinson and Company (22) tarafından bildirilen prosedürlere göre yapıldı.

#### Klinik ve Nekropsi Bulguları

Salgın 2014 yılı Ağustos ayı içerisinde ve 21°C su sıcaklığında görüldü. Enfeksiyon bir aylık süre içerisinde % 70-75 oranında mortalite oluşturdu. Hastalıklı balıklarda; iştahsızlık, durgunluk, yüzme

bozuklukları, korneada konjesyon, solungaçlarda anemi, yüzgeç tabanlarında, burun-göz çevresi ile çene altında, böbrek, karaciğer ve dalakta hemoraji, splenomegali, hava kesesinde şişkinlik ve yangı tespit edildi. Barsakların sarımtırak bir sıvı ile dolu olduğu görüldü (Şekil 1).



**Şekil 1.** a: Karaciğerde hemoraji, b: Splenomegali, c: Burun-göz çevresinde hemoraji, d: barsakta sıvı birikimi.

**Figure 1.** a: Haemorrhage in the liver, b: splenomegaly, c: Haemorrhage around the nose-eye, d: Fluid accumulation in the intestine.

#### Bakteriyolojik Bulgular

Hastalıklı organ ve dokulardan direkt TSA, MCA, CA ve SWA'ya yapılan ekimler sonucunda; TSA, MCA ve SWA'da bakteri izolasyonu yapılırken, CA'da izolasyon yapılamadı. Bakteriyolojik incelemeler sonucunda 8 hastalıklı balığın 4'ünden, 4 izolat elde edildi. Bu izolatların besiyerlerinde yuvarlak, 1 mm'den küçük çaplı ve beyaz renkli koloniler halinde üredikleri (Şekil 2), mikroskopik muayenede, Gram pozitif, oval yapıda, 2-9 kottan oluşan kısa zincirler oluşturdukları (şekil 3), hareket, oksidaz ve katalaz negatif oldukları belirlendi. Defibrine %5 Koyun Kanlı Nutrient Agar'da alfa hemoliz özellik gösteren bu bakteriler, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterlerine göre (Tablo 1) *L. garvieae* olarak identifiye edildi.

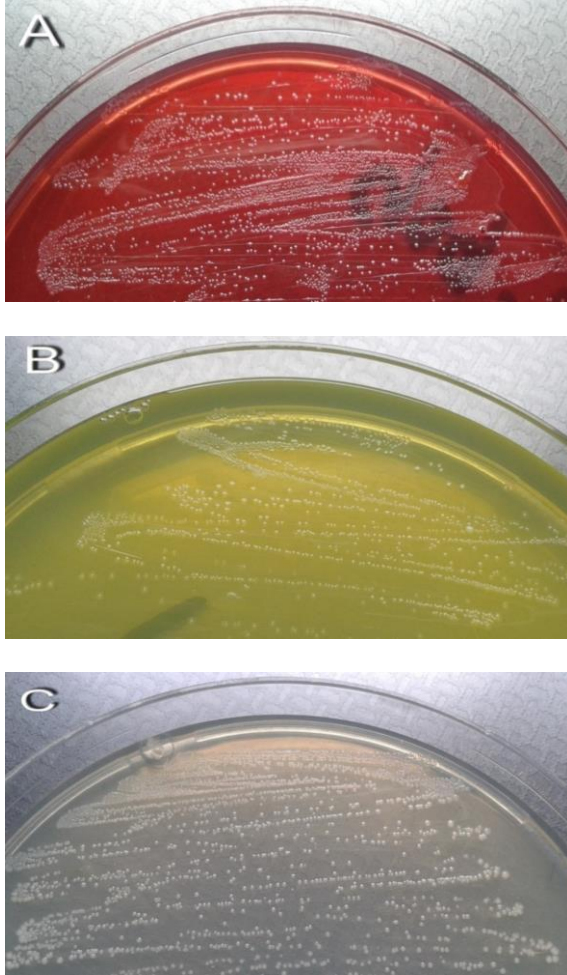
#### PZR Bulguları

*L. garvieae*'nın 16S rRNA gen bölgesini hedef alan 857 bp'lik LgF: 5'-CCA ACT TCC GTG GTG TGA CG-3', ve LgR 5'-AGT GGC TCA ACC ATT GTG TGC-3' primer seti kullanılarak amplifikasyonu yapıldı. PZR

sonucunda tüm suşlar agaroz jel elektroforezinde 857 bp'de spesifik bantları verdi (Şekil 4).

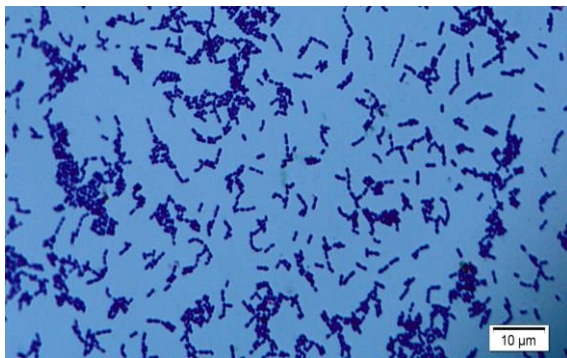
#### Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

İzolatların antibiyotik duyarlılık profilleri Tablo 2' de verilmiştir



Şekil 2. *L. garvieae*'nin koloni morfolojisi (A: MCA, B: SWA, C: TSA.).

Figure 2. Colony morphology of *L. garvieae* (A: MCA, B: SWA, C: TSA.).



Şekil 3. *L. garvieae*. Gram boyama  $\times 1000$ .

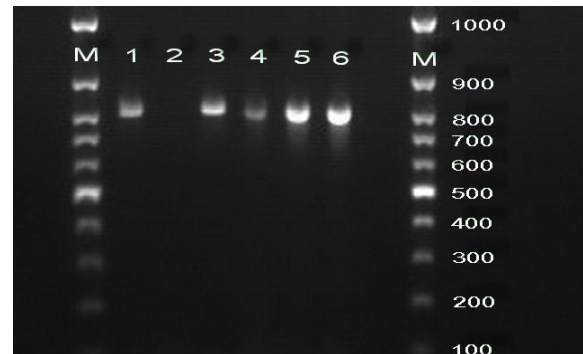
Figure 3. *L. garvieae*. Gram staining  $\times 1000$ .

**Tablo 1.** *L. garvieae* suşlarının konvansiyonel yöntemlerle belirlenen fenotipik özellikleri.

**Table 1.** Phenotypic properties of *L. garvieae* as determined by conventional methods.

Fenotipik Özellikler	İzolatlar	Fenotipik Özellikler	İzolatlar
Gram boyama	+	45 °C de üreme	+
Koloni formu	smooth	Eskulin	+
Hareket	-	Glikoz	+
Oksidaz	-	Laktoz	+
Katalaz	-	Sukroz	+
$\alpha$ Hemoliz	+	Mannitol	+
Betagalaktosid az	-	L-arabinoz	-
Hidrojen sülfid üretimi	-	Sellobiyoz	+
Arjinin dihidrolaz	d	İnositol	-
Lizin dekarboksilaz	d	Sorbitol	-
Ornitin dekarboksilaz	-	Maltoz	+
0129'a duyarlılık (150 $\mu$ g)	duyarlı	Ksiloz	-
MCA'da üreme	+	Dulsitol	-
SWA'da üreme	+	Galaktoz	+
TSA'da üreme	+	Ramnoz	-
TSB'de üreme	+	Fruktoz	+
10 °C de üreme	+	İnulin	-
30 °C de üreme	+	Adonitol	-

+ : Pozitif, - : Negatif, d : Değişebilir reaksiyon



Şekil 4. *L. garvieae* 857 bp. spesifik PCR. M: Moleküler ağırlık standardı, 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3,4, 5,6: Pozitif örnekler.

Figure 4. *L. garvieae* specific PCR, 857 bp. M: Standard of molecular weight, 1: Positive control, 2: Negative control, 3,4,5,6: Positive samples.

**Tablo 2.** *L. garvieae* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları.  
**Table 2.** Antimicrobial susceptibility of *L. garvieae* isolates.

Etken Madde	İzolat 1	İzolat 2	İzolat 3	İzolat 4	Etken Madde	İzolat 1	İzolat 2	İzolat 3	İzolat 4
Neomisin (30µg)	R	S	R	I	Florfenikol (30µg)	S	S	S	S
Oksitetrasiklin (30µg)	S	S	S	S	Sulfametoksazol /trimetoprim (25µg)	R	R	R	R
Enrofloksasin (5µg)	R	I	S	I	Kanamisin (30µg)	S	R	R	S
Amoksisilin (10µg)	S	S	S	S	Sefoperazon (75µg)	R	S	S	S
Ampisilin (10µg)	S	S	S	S	Okzolinik asit (2µg)	R	R	R	R
Eritromisin (15µg)	S	S	S	S	Gentamisin (10µg)	S	S	R	S
Trimetoprim (5µg)	R	R	R	R					

S : Duyarlı, R : Dirençli, I : Orta duyarlılık

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Laktokokkozis, Akdeniz ülkelerinde Alabalık çiftliklerinde önemli ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır. Hastalığın ortaya çıkışı çevre şartları ve stres faktörleri ile ilişkilidir. İnfeksiyon genellikle havuzlar aşırı derecede kalabalık olduğunda (13) ve su sıcaklığı 16°C'nin üzerine çıktığında ortaya çıkar (23). Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, *L. garvieae*'nin Tryptic Soy Agar, McConkey Agar, Brain Heart Infusion Agar, Nutrient Agar, Blood Agar, Bile Esculine Azide Agar, Man Rogosa Sharpe Agar, M17 Agar, M17 Broth, Nutrent Broth, Tryptic Soy Broth, Brain Heart Infusion Broth, Man Rogosa Sharpe Broth ve Todd-Hewitt Broth gibi besiyerlerinde 22 -37°C'ler arasında 24-72 saat gibi farklı sıcaklıklarda ve sürelerde ürettiği ve izole edildiğine dair raporlar bildirilmiştir (3,8-10,14,15,24-26). Bu çalışmada *L. garvieae*'nin hastalıklı balıkların iç organlarından Shotts Waltman Agar'da da 22°C'de 48 saat inkübasyon ile üreyebildiği gözlemlenmiştir.

Bu olgu sunumunda elde edilen izolatların fenotipik özellikleri Çağırğan (14) ve Altun ve ark. (15) ile benzerlik gösterdi. Genel olarak suşlar fenotipik özellikleri açısından birbirleriyle uyumlu bir yapı gösterdi. Elde edilen suşların Gram pozitif, mikroskopik bakıda kısa zincir oluşturdukları, oksidaz, katalaz ve betagalaktosidaz negatif, % 5 koyun kanlı agarda alfa hemolitik özellik gösterdikleri belirlendi.

Lizin dekarboksilaz ve arjinin dihidrolaz testlerinde değişkenlik saptandı.

*L. garvieae* suşları enrofloksasin, eritromisin, amoksisilin, ampisilin, oksitetrasiklin ve florfenikole duyarlı, neomisin ve sulfametoksazol/trimetoprim dirençli bulunmuştur (12). Alabalıklardan izole edilen suşlarda eritromisin ve amoksisilin'e (10) duyarlılık belirlenirken, Alrabadi (3) sığır, koyun ve keçi sütlerinden elde ettiği *L. garvieae* izolatlarının tamamına karşı trimetoprimi etkili antibiyotik olarak tespit etmiştir. Bu olgu sunumunda elde edilen veriler balık kaynaklı izolatlardan elde edilen verilere benzerlik gösterirken, Alrabadi'nin (3) çalışması ile kıyaslandığında trimetoprim belirlenen direnç, izolasyon kaynaklarının farklı olmasına ve/veya trimetoprimin balık çiftliklerinde sık kullanılmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Türe (18) *L. garvieae* suşlarının genel olarak oksitetrasiklin, amoksisilin ve florfenikol gibi antibiyotiklere karşı duyarlı, gentamisin ve sulfametoksazol/trimetoprim karşı ise dirençli olduklarını saptamıştır. Bunun yanı sıra enrofloksasin ve eritromisine belirli oranlarda direnç geliştiğini bildirmiştir. Çalışmamızda izolatların tamamı oksitetrasiklin, amoksisilin, ampisilin, eritromisin ve florfenikole duyarlı, trimetoprim, Sulfametoksazol/trimetoprim ve okzolinik asite dirençli bulunmuştur. Suşlarda enrofloksasin, gentamisin ve sefoperazona karşı düşük düzeyde,

kanamisin ve neomisine karşı ise daha yüksek düzeyde direnç belirlenmiştir. Türe (18)'nin çalışması ile çalışmamız arasında 2 yıllık bir zaman farkı olmasından ve aynı bölgede yürütülmüş olmaları nedeniyle antibiyotik duyarlılık testlerinin birbirleri ile uyumlu olduğu düşünülmektedir. Araştırmacılar *L. garvieae* suşlarını eritromisin, florfenikol, amoksisilin, ve oksitetrasikline duyarlı (2,10,12,18), sulfamethoksazol/ trimetoprim dirençli (2,10,12,15,18) bulduklarını çalışmalarında ortak olarak rapor etmişlerdir. Olgu sunumumuzda bahsi geçen antibiyotikler için aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak; bu olgu sunumunda aynı çiftlikten elde edilen izolatların fenotipik özelliklerinin birbirleriyle uyumlu olduğu saptandı. Hastalıklı organ ve dokulardan direkt vasatlarla yapılan ekim ile *Yersinia ruckeri* için selektif bir besiyeri olan SWA'da *L. garvieae'nin* izole edilebileceği ve bu besiyerinde *L. garvieae'nin* ürettiği tespit edildi. Araştırmaya konu olan bu salgın esnasında 21°C su sıcaklığında, % 70-75 oranında balık ölümleri gerçekleşmiştir. *L. garvieae* izolasyonunu takiben aynı gün PZR metodu ile identifikasyon yapılabilmektedir. PZR ile kısa sürede sonuca ulaşıldığından bu metot laboratuvar personeli ve balık yetiştiricileri lehine avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmada *L. garvieae* suşları florfenikol, eritromisin, amoksisilin, ampisilin ve oksitetrasikline karşı duyarlı bulunmuştur. Bu nedenle bu antibiyotikler Laktokokkozis'in tedavisinde önerilir. *L. garvieae* suşlarının test edilen antibiyotiklerden trimetoprim, sulfametoksazol /trimetoprim ve okzolinik asite karşı dirençli olduğu saptanmıştır. Çalışmada izole edilen *L. garvieae* suşlarının tamamı 3-6 arasında değişen antimikrobiyal ajana karşı çoklu ilaç direnci göstermişlerdir. Antibiyotik duyarlılık profilleri antibiyotiklere dirençli *L. garvieae* suşlarının izlenebilirliği ve takibi açısından dikkate alınmalıdır.

#### TEŞEKKÜR

Çalışmaya katkılarından dolayı Trabzon Merkez Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden Sayın Dr. Mustafa TÜRE'ye teşekkür ederiz.

#### KAYNAKLAR

1. Cai Y., Yang J., Pang H., Kitahara M., 2011.

*Lactococcus fujiensis* sp. nov, a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, 1590-1594.

2. Raissy M., Ansari M., 2011. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran fish farms. African Journal of Biotechnology, 10, 1473-1476.
3. Alrabadi IN., 2012. The effect of several antibiotics on *Lactococcus garvieae* isolated from Jordanian dairy products. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 4, 468-472.
4. Kav K., Erganiş O., 2007. Konya Bölgesi'nde bulunan gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. Veteriner Bilimleri Dergisi, 23, 7-17.
5. Timur G., Yardımcı ER., Ürkü Ç., Çanak Ö., 2011. Marmara Bölgesi kültür gökkuşacağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, L.) Lactococcosis'in bakteriyolojik ve histopatolojik metodlarla teşhisi. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 26, 63-81.
6. Chan JFW., Woo PCY., Teng JLL., Lau SKP., Leung SSM., Tam FCC., Yuen KY., 2011. Primary infective spondylodiscitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. Infection, 39, 259-264.
7. Ferrario C., 2012. *Lactococcus garvieae* and *Morganella morganii*: two bacterial models to study quality and safety of fish products. Scientific field AGR/16. PhD programme in Food Science. Technology and Biotechnology, Università degli studi di Milano.
8. Türe M., Haliloğlu H., Altuntaş C., Boran H., Kutlu I., 2014. Comparison of experimental susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), turbot (*Psetta maxima*), black sea trout (*Salmo trutta labrax*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to *Lactococcus garvieae*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14, 1-2.
9. Kia ER., Mehrabi Y., 2013. Detection and identification of different streptococcosis strains in farmed rainbow trout in Boyerahmad and Dena Regions (North South of Iran). World Journal of Fish and Marine Sciences, 5, 315-321.
10. 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. *Revue de Medecine Veterinaire*, 165, 12-19.
11. Evans JJ., Klesius PH., Shoemaker CA., 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *Journal of Fish Diseases*, 32, 943-951.
  12. Kav K., Erganiş O., 2008. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 52, 223-226.
  13. Avcı H., Aydoğan A., Tanrikul TT., Birinciöglü SS., 2010. Pathological and microbiological investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) naturally infected with *Lactococcus garvieae*. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 313-318.
  14. Çağırğan H., 2007. Gökkuşluğu alabalığı hastalıkları, Doğu Anadolu kalkınma programı ve kırsal kalkınma bileşeni. *Van. S*, 29-32.
  15. Altun S., Onuk EE., Çiftçi A., Büyükekiz AG., Duman M., 2013. Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 375-381.
  16. Englen MN., Kelley LC., 2000. A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 421-426.
  17. Altınok I., 2011. Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout. *Diseases of Aquatic organisms*, 93, 199-206.
  18. Türe M., 2012. PFGE Metodu kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin genetik çeşitliliğinin ve yayılımının belirlenmesi. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü-Trabzon. (TAGEM/HS/10/09/02/179) Proje Sonuç Raporu. 68pp.
  19. Bauer AW., Kirby WMM., Sherris JC., Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
  20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)., 2004. Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; proposed guideline. M42-P, CLSI, Wayne, PA.
  21. Ruangpan L., Tendencia AE., 2004. Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment. *Aquaculture. Extension Manual No 37*. Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan. 5021, Iloilo, Philippines.
  22. Becton Dickinson and Company (BD)., 2011. Antimicrobial susceptibility test discs. 7 Loveton Circle Sparks, USA.
  23. Avsever ML., Tanrikul TT., Güroy D., Metin S., Hasan AH., Tunalıgil S., 2014. Investigation of certain blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) naturally infected with *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fisheries Sciences*.com, 8, 114-120.
  24. Miyauchi E., Toh H., Nakano A., Tanabe S., Morita M., 2012. Comparative genomic analysis of *Lactococcus garvieae* strains isolated from different sources reveals candidate virulence genes. *International Journal of Microbiology*, 1-7.
  25. Suneel D., Basappa K., 2013. Identification and characterization of *Lactococcus garvieae* and antimicrobial activity of its bacteriocin isolated from cow's milk. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6, 104-108.
  26. Halkman AK., Sağdaş EÖ., 2014. Mikrobiyoloji el kitabı. 3. Baskı, 7-211, Prosigma Tasarım, Ankara.