

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Lactococcus garvieae'nin ANTİJENİK PROTEİNLERİNİN WESTERN BLOT
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Balıkçılık Tek. Müh. Meryem Cansu FİDAN

ARALIK 2014
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

***Lactococcus garvieae*'nin ANTİJENİK PROTEİNLERİNİN WESTERN BLOT
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

Balıkçılık Tek. Müh. Meryem Cansu FİDAN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ YÜKSEK MÜHENDİSİ”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05.12.2014
Tezin Savunma Tarihi : 25.12.2014

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İlhan ALTINOK
İkinci Danışmanı : Prof. Dr. Zihni Açar YAZICI

Trabzon 2014

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında
Meryem Cansu FİDAN tarafından hazırlanan

***Lactococcus garvieae*'nin ANTİJENİK PROTEİNLERİNİN WESTERN BLOT
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 09/12/2014 gün ve 1580 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof.Dr.Ersan KALAY

Üye : Prof.Dr.İlhan ALTINOK

Üye : Doç.Dr.Erol ÇAPKIN

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans programında yürütülmüştür. “*Lactococcus garvieae*’nın antijenik proteinlerinin Western Blot yöntemiyle belirlenmesi”adlı bu çalışma KTÜ Deniz Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Lactococcus garvieae Türkiye’de ilk olarak Ege Bölgesi’ndeki bir alabalık işletmesinde gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir. Daha sonra bölgeler arası kontrolsüz balık transferleriyle bu hastalık etkeni diğer bölgelere yayılmıştır. Bu nedenle hastalığa neden olan bakterinin moleküler profilinin çıkartılarak dağılımının tam olarak bilinmesi ve hastalıklara neden olan immunodominant proteinlerini belirlenmesi gerekmektedir. Bu araştırmayla mevcut ve elde edilen *L. garvieae* izolatları SDS-PAGE ve Western Blot metodu kullanılarak suşlar arası genetik benzerlikler ortaya koyulmuş ve suşların immunodominant proteini belirlenmiştir.

Tez danışmanlığımı üstlenerek bilgi ve desteğini esirgemeyen ve her konuda desteğini hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhan ALTINOK’a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen sayın hocalarım, Prof. Dr. Zihni Açar YAZICI’ya, Prof. Dr. Ersan KALAY’a, Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK’a ve Arş. Gör. Adem YILDIRIM’a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca fonksiyon laboratuvarlarının imkanlarından yararlanmamı sağlayan KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Deney hayvanlarının bakımı ve çalışmalarda yardımını esirgemeyen Veteriner Hekim Sait AL’a, çalışmanın başından sonuna kadar desteklerini ve yardımlarını her zaman yüreğinden hissettiğim sayın hocalarım Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ’a, Prof. Dr. Muhammet BORAN’a ve Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam süresince benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime ve her zaman yanımda olan arkadaşım Bal. Tek. Müh. Başak ESENSOY’a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmanın, konuyla ilgili yapılacak olan araştırmalara ışık tutmasını dilerim.

Meryem Cansu FİDAN
Trabzon, 2014

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Lactococcus garvieae*’nın Antijenik Proteinlerinin Western Blot Yöntemiyle Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İlhan ALTINOK’un sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

25/12/2014

Meryem Cansu FİDAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VIII
SUMMARY	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. <i>Lactococcus garvieae</i>	2
1.2.1. Morfoloji ve Kültür Özellikleri	3
1.2.2. Antijenik Karakter	3
1.2.3. Patojenite ve Hastalığın Klinik Semptomları	3
1.2.4. Epidemiyoloji	5
1.2.5. Teşhis.....	5
1.2.6. Tedavi	6
1.2.7. Koruma ve Kontrol	7
1.3. Proteinlerin Analizi ve Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ve Western Blot (Immunoblotting).....	7
1.4. Gram-Pozitif Bakterilerin Hücre Duvar Yapısı	9
1.5. Çalışmanın Amacı ve Önemi.....	10
1.6. Literatür Özeti.....	10
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	13
2.1. Bakteri Örnekleri	13
2.2. Bakterilerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	13
2.3. Antikor Eldesi.....	13
2.3.1. Deney Hayvanların Temini ve Bakımı	13
2.3.2. Anti-Serum Üretimi İçin Antijen Hazırlanması	15
2.4. SDS-PAGE ve Western Blotta Kullanılan Çözelti ve Jellerin Hazırlanması.....	16
2.4.1. SDS-PAGE Elektroforez Solüsyonları.....	16

2.4.1.1.	Akrilamid/Bis (%30 T, %2,67 C).....	16
2.4.1.2.	Sodyum Dodesil Sülfat (%10 SDS w/v).....	16
2.4.1.3.	Tris –HCl (1.5 M, pH 8.8).....	17
2.4.1.4.	Tris –HCl (0.5M, pH6.8).....	17
2.4.1.5.	Sample Buffer.....	17
2.4.1.6.	Running Buffer (10X).....	17
2.4.1.7.	Amonyum Persülfat (%10 APS).....	17
2.4.1.8.	Resolving Jel (Alt jel).....	17
2.4.1.9.	Stacking Jel (Üst Jel).....	18
2.4.2.	SDS-PAGE Jel Boyanması İçin Günlük Hazırlanması Gereken Solüsyonlar.....	18
2.4.2.1.	Fix/Stop Solüsyonu (100ml).....	18
2.4.2.2.	Staining Solüsyon (100ml).....	18
2.4.2.3.	Developer Solüsyonu (100ml).....	18
2.4.3.	Western Blot Solüsyonları.....	19
2.4.3.1.	Towbin Buffer (10X) (Transfer Tamponu).....	19
2.4.3.2.	%5 BSA (Bloklaama Solüsyonu).....	19
2.4.3.3.	PBS, % 0.05 Tween 20.....	19
2.4.3.4.	PBS, % 0.05 Tween 20, % 0.05 Triton X-100.....	19
2.5.	Proteinlerin Analizi Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ve Western Blot (Semi Dry Sistem).....	19
2.5.1.	Toplam Protein İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi.....	19
2.5.2.	Toplam Protein Analizi İçin SDS-PAGE Jel Hazırlanması ve Yürütülmesi.....	21
2.5.3.	Western Blot İçin SDS-PAGE Jel Hazırlanması ve Yürütülmesi.....	22
2.5.3.1.	Membranın Blotlanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi.....	23
3.	BULGULAR.....	26
3.1.	SDS-PAGE Profilleri.....	26
3.2.	Western Blot.....	29
3.3.	Farklı Suşlarınantijenik Özelliklerinin Perşembe ve ATCC Suşu ile Karşılaştırılması.....	30
3.3.1.	Örneklerin Karşılaştırılması.....	30
3.3.2.	ATCC ve Perşembe Suşunun Farklı Bakteri Türleriyle Karşılaştırılması.....	33
4.	TARTIŞMA.....	34

5.	SONUÇLAR.....	38
6.	ÖNERİLER.....	40
7.	KAYNAKLAR.....	42
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

Lactococcus garvieae'nin ANTİJENİK PROTEİNLERİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Meryem Cansu FİDAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İlhan ALTINOK

2014, 48 Sayfa

Kültür balıkçılığın gelişmesine paralel olarak işletmelerde görülen *L. garvieae*'nin neden olduğu salgınlar, yetiştiriciliği yapılan türler arasında tehdit oluşturmaktadır. Hastalık, ilk kez Ege Bölgesi ve civarındaki işletmelerde görülmesine rağmen kısa sürede her bölgeye yayılmış ve % 50'nin üzerinde mortaliteye sebep olmuştur. Bu araştırmada Türkiye, İspanya, İtalya ve Fransa'dan izole edilen *L. garvieae*'nin 43 suşunun, Western Blot tekniğini kullanılarak antijenik protein profillerinin karşılaştırmalı analizlerini yapılmış ve virülans proteinleri belirlenmiştir. Bakterilerin protein profilleri SDS-PAGE ile belirlenmiş, protein izolasyonu yapılmış, protein konsantrasyonu ayarlanmış ve SDS-PAGE elektroforeze yüklenerek yürütülmüştür. Daha sonra protein bantları membrana aktarılmış, blotlama yapılmış ve görüntü alınarak bakterilerin protein profilleri belirlenmiştir. Western Blot yöntemiyle yapılan karşılaştırma sonucunda, 37-50 kDa seviyesi immunodominant bant gözlemlenmiş ve bu bandın virülans proteinleri taşıdığı düşünülmektedir. SDS-PAGE metodunda ise benzerlik oranı düşük bulunan *L. garvieae* suşları toplam protein analizinde 6 kümede 36 protein tipi oluşturmuştur. Bu da suşlar arasında önemli heterojenitenin olduğunu göstermektedir. İzolatlar arası benzerlik oranlarının düşük olması bu izolatların birbirine uzak alanlardan izole edilmesi ve bakterilerin çevresel ya da kimyasal faktörlerden etkilenerek mutasyon ve benzeri bazı olaylar sonucu genetik yapılarının değişmesinden kaynaklanıyor olabilir.

Anahtar Kelimeler: *L. garvieae*, Antiserum, Western Blot, İmmunodominant, SDS-PAGE.

Master Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF ANTIGENIC PROTEINS OF *Lactococcus garvieae* BY
WESTERN BLOT ANALYSIS

Meryem Cansu FİDAN

Karadeniz Technical University
Institute of Science and Tecnology
Fisheries Technology Engineering Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. İlhan ALTINOK
2014, 48 Pages

Infections of fish with *Lactococcus garvieae* were increased with increasing aquaculture productions and *L. garvieae* outbreaks have become a threat on farmed species. The disease agent was first isolated in the Aegean Region and then it has spreaded to every region where rainbow trout cultured in a short time and it caused over 50% mortality. In this study, 43 strains of *L. garvieae*, isolated from Turkey, Spain, Italy and France were compared with Western Blot technique to determine proteins encoded by virulence gene and to determine total protein profile with SDS-PAGE. Having isolated total protein from bacteria, protein concentration was determined and protein was loaded to SDS-PAGE electrophoresis. After completing electrophoresis, protein bands were transferred to blot and then protein profiles were determined. Having compared Western Blot analysis, immunodominant protein bands between 37 and 50 kDa were observed and assumed that these bands were related to virulence gene. Based on SDS-PAGE method, *L. garvieae* strains formed 36 protein types in 6 clusters with low level of similarity. Thus, there was substantial heterogeneity among these strains. Lower similarity among isolates was observed. This can be explained due to possible mutation that can be caused by environmental or chemical factors.

Key Words: *L. garvieae*, Antiserum, Western Blot, Immunodominant, SDS-PAGE.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Lactococcus garvieae</i> ile enfekte olmuş alabalıkta görülen lezyonlar karın boşluğunda sıvı birikimi, karaciğerde nekroz ve dalağın şişmesi (üstteki resim) çift taraflı ekzoptalmia (alttaki resim).....	4
Şekil 2. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı	9
Şekil 3. Formaldehitte inaktif edilmiş <i>L. garvieae</i> ile Freund Complete Arjuvantın karıştırılarak tavşanın kasına enjekte edilmesi	15
Şekil 4. Tavşanların kulak arkası toplardamarlarından kan alınması.....	16
Şekil 5. Bakteri hücrelerinin prob sonikatör cihazı ile parçalanması	20
Şekil 6. Bakterilerin protein konsantrasyonlarının belirlenmesi	21
Şekil 7. SDS-PAGE için jellerin hazırlanması	23
Şekil 8. Hazırlanan bakteri örneklerinin jelde yürütülmesi.....	23
Şekil 9. SDS-PAGE'densonra proteinlerin jelden membrana aktarılması	24
Şekil 10. Membrana aktarılan proteinlerin antikor/blotlama (1:10000) solusyonu içerisinde roller mikser üzerinde çalkalanması ve TBST ile yıkama işlemi	25
Şekil 11. Bazı suşların toplam protein fragmentlerinin SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra gümüş nitrat ile boyanmasıyla fragmentlerin boyları ve görünüşleri	27
Şekil 12. Toplam proteinlerin dendogramı.....	28
Şekil 13. Farklı antikor titrasyonu sonucu Western Blot yapımından sonra <i>L. garvieae</i> suşlarının görüntüsü (24 saniye). Kolon 1-3 <i>L. garvieae</i> Perşembe ve kolon 4-6 <i>L. garvieae</i> ATCC	30
Şekil 14. <i>L. garvieae</i> suşlarınınve <i>L. lactis</i> 'in Western Blot görüntüleri.....	31
Şekil 15. Western Blotta <i>L. garvieae</i> antikorunun diğer bakterilerle olan reaksiyonu	33

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Lactococcus garvieae</i> Suşları, İzole Edildikleri Konakçılar, Yerler ve Yıllar.....	14
Tablo 2. Gümüş Boyama Yöntemi	22
Tablo 3. <i>Lactococcus garvieae</i> Suşlarının Profilinin Western Blotta Perşembe ve ATCC Suşları ile Karşılaştırılması	32

SEMBOLLER DİZİNİ

APS	: Amonyum Persülfat
BA	: Bile Agar
BEA	: Bile Eskulin Agar
BHIA	: Brain Heart Infizyon Agar
BHIB	: Brain Heart Infizyon Brot
BSA	: Bovin Serum Albumin
DDI	: De İyonize Su
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Buffer Saline
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilimit Jel Elektroforez
TBST	: Tris-Buffer Saline ve Tween
TSA	: Triptik Soy Agar
TSB	: Triptik Soy Brot

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliği, dünya besin gereksiniminin önemli kısmını karşılayan temel bir sektördür. Ayrıca su ürünleri yetiştiriciliği hayvansal üretim çalışmaları içinde önemini kabul ettirmiş ve hızla gelişen bir üretim dalı olmuştur. İnsan denetimi altında balık yetiştirme çalışmaları özellikle sazan kültürünün, ilk önce Çin ve Japonya'da başladığı daha sonra ise Avrupa'ya yayıldığı bilinmektedir. Tayland, Filipinler, Yunanistan ve Endonezya en yaygın uygulamaya sahip ülkeler arasındadır. Dünyadaki ilerlemeye paralel olarak Türkiye'de yetiştiricilik sektöründe önemli gelişmeler yaşanmıştır. Türkiye'de ticari anlamda su ürünleri yetiştiriciliği 1960'lı yıllarda gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) iç sularda toprak ve beton havuzlarda üretilmesiyle başlamış ve günümüze kadar hızla gelişerek ülke ekonomisi için önemli bir sektör olmuştur. 2013 yılında toplam su ürünleri üretiminin 233.394 ton olduğu Türkiye'de 128.060 ton alabalık, 103.614 ton çipura ve levrek, 1.575 ton diğer türlerin yetiştiriciliği yapılmaktadır (URL-1, 2013).

Kültür balıkçılığın gelişmesine paralel olarak işletmelerde uygun çevre şartları, su kalitesi, yem temini, pazarlama gibi sorunların yanında bakteriyel, fungal, paraziter ve viral hastalıklar dünyanın diğer ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de son yıllarda büyük tehdit oluşturmaktadır. Hem tatlı hemde tuzlu su balıklarında görülen önemli bakteriyel hastalıklarından biri lactococcosis'tir. Bu hastalığın etkeni *Lactococcus garvieae* dünyada ilk defa 1974 yılında sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*) balığından izole edilmiştir (Ksuda vd., 1991). Bu hastalık 1988 yılında İspanya'da bir alabalık işletmesinde görüldükten sonra tüm dünyaya yayılmıştır. *Lactococcus garvieae* Türkiye'de ilk olarak Ege Bölgesi'ndeki bir alabalık işletmesinde gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir (Diler vd., 2002). Daha sonra bölgeler arası kontrolsüz balık transferleriyle bu hastalık etkeni diğer bölgelere yayılmıştır (Ozturk ve Altınok, 2014).

Lactococcosis birçok balık türünü etkileyen sistemik bir balık hastalığıdır. Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*), pisi (*Paralichthys olivaceus*), kalkan (*Scophthalmus maximus*), kefal (*Mugil cephalus*), çipura

(*Sparus aurata*), mersin (*Acipenser naccarii*), tilapia (*Tilapia niloticus*) ve yılan balığı (*Anguilla japonica*)' ndan izole edilmiştir (Vendrell, 2006).

Hastalıklar ve yayılımının belirlenmesinde kullanılan moleküler biyolojideki gelişmelerin mikrobiyolojiye yansması sonucunda geliştirilen moleküler tanı yöntemleri gün geçtikçe daha da önemli hale gelmektedir. Bir protein analiz yöntemi olan “Western Blot”, protein karışımının jel elektroforezi ile ayrıştırıldıktan sonra uygun bir membrana transferini kapsar. Protein spesifik olarak işaretli antikor veya antijenle reaksiyona girerek tanımlanabilir. Antikorlar az miktarda proteinin fare veya tavşana (poliklonal antikorlar) veya hücre kültürlerine (monoklonal antikorlar) enjekte edilmesi sonucu hücreler tarafından üretilen biyolojik moleküllerdir. Antikorlar moleküler biyolojide birçok teknik ve analizde etkili bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu yöntem ile özel bir proteinin moleküler ağırlığı bilgisi ve izoformların ayırımı mümkündür. *Lactococcus garvieae* infeksiyonunun işletmelerde meydana getirdiği kayıpların önemine rağmen suşlar arasında epizootiyolojik ilişki konusunda bilgi yetersizliği vardır. Bu çalışmada ülkemiz ve yurt dışından izole edilen 43 *L. garvieae* ve 1 adet *Lactococcus lactis* olmak üzere toplam 44 bakteri izolasyonunun Western Blot tekniğini kullanarak antijenik protein profillerinin karşılaştırmalı analizlerini yaparak, virülans proteinlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

1.2. *Lactococcus garvieae*

Lactococcus garvieae, *Lactococcus* cinsi *Streptococceae* familyası içerisinde. Etken gram pozitif bakteri olan *Enterococcus*, *Vagococcus* ve *Cornobacterium* gibi yeni bakteri genumu içerisinde sınıflandırılrsa da, 1985'ten sonra *Streptococcus*'lardan ayrılmıştır. Önceleri *Enterococcus* benzeri olarak tanımlanan bu patojen; biyokimyasal karakterizasyonu, protein profili, 16S rRNA sekans analizleri ve DNA hibridizasyon gibi çalışmalar sonucu *L. garvieae* ile *Enterococcus serolicidae*'nin aynı türler (sinonim) olduğu belirlenmiştir (Eldar vd., 1996).

Lactococcus garvieae balıklar dışında diğer hayvan türlerinde ve ayrıca insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. *Lactococcus garvieae* hayvanlarda mastitise neden olurken; insanlarda endokarditise, karaciğerde apseye ve osteomyelitise neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *L. garvieae*, insanların deri, idrar ve kanından, kümes hayvanlarının etinden (Barakat vd., 2000), çiğ inek sütünden (Villani vd., 2001) ve et ürünlerinden izole

edilmiştir. (Alfonso vd., 2003, Wang vd., 2006). İlk defa 1991 yılında Amerika'da, Japonya'da ve Tayvan'da çiğ balık yiyen ve çiğ balıkla temas eden insanlarda görülmüştür (Wang vd., 2006). Etkenin birkaç vakada özellikle uzak doğuda insandan da izole edilmesi potansiyel zoonoz olabileceği görüşünü güçlendirmektedir.

1.2.1. Morfoloji ve Kültür Özellikleri

Lactococcus garvieae; Gram pozitif fakültatif anaerobik hareketsiz, sporsuz, oksidaz ve katalaz negatif, tek, çift ya da kısa zincirler oluşturabilen, kanlı agarda alfa (α) hemoliz özelliğine sahip, uygun besi ortamında 4 ile 45°C arasında üreyebilen bir bakteridir (Vendrell vd., 2006). Optimum üreme sıcaklığı 30°C'de 24 saattir. Ayrıca Brain Heart İnfizyon Agar (BHIA), Triptik Soy Agar (TSA), Triptik Soy Brot (TSB), Bile Agar (BA) ve Bile Eskulin Agar (BEA) gibi zenginleştirilmiş besi yerlerinde de üreyebilir. Yapılan çalışmalar *L.garvieae*'nin optimum gelişmesini BHIA'da pH 7-8 ve 25-30°C de gerçekleştirdiğini göstermiştir (Toranzo vd., 1994).

1.2.2. Antijenik Karakter

Lactococcus garvieae'nin serolojik karakterizasyonu hücre duvarından KG (-) ve KG (+) şeklinde iki antijenik tipi olduğu, bunlardan tavşan anti KG (-) serumu hem KG (-) hem de KG (+) serumlarıyla birleşip kompleks oluşturduğu, ancak; anti KG (+) serum sadece anti KG (+) serotip ile birleşip kompleks oluşturabildiği bildirilmiştir. KG (-) serotipte kapsül mevcuttur. Kapsüllü serotipler hidrofilik yapıya sahiptirler ve fagositoza karşı daha dirençlidirler bu da KG (-) serotipinin KG (+) serotipten daha virulent olduğunu göstermiştir (Okada vd., 2000; Hironu vd., 1999; Ooyama vd., 2002).

1.2.3. Patojenite ve Hastalığın Klinik Semptomları

Lactococcosis hiperakut ve hemorajik septisemi olarak belirtilmiştir (Eldar vd., 1996). Hastalığın gelişimi çevresel faktörlere, su sıcaklığına, suyun mikrobiyel yüküne ve balığın bakım şartlarına bağlı olarak değişmektedir (Prieta vd. 1993). Hastalıkta birçok vakada mortalite oranının %50'nin üzerine çıkması ve balığın büyüme oranının

düşmesinden dolayı etken çiftliklerde önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Vendrell vd., 2006). Etkenin inkubasyon periyodu kısa ve virülansı çok yüksektir. Deneysel enfeksiyonlarda mortalite oranı iki gün içerisinde %100'e kadar çıkabilmektedir (Chen vd., 2001).

Lactococcosis iştahsızlık, uyuşukluk, deride kararma ve düzensiz yüzme gibi genel hastalık semptomları şeklinde başlar. Baş ve göz çevresinde, anal bölgede ve yüzgeç kaidelerinde kanama, çift ya da tek taraflı ekzoftalmus ile kendini gösterir (Şekil 1). Ayrıca karın bölgesinde şişlik ve anüste prolapsus gözlenebilir (Eldar vd., 1999; Prieta vd., 1993; Muzquiz vd., 1999; Vendrell vd., 2004). Enfeksiyondan dolayı damar endotelinde oluşan lezyonlar iç organların yüzeyinde kanamalara sebep olur. Nekropside periton üzerinde genellikle asidik karakterde sıvı birikir, bu sıvı bazen irinli ya da kanlı da olabilir. Etkilenen balıktaki makroskopik lezyonlar herhangi bir sistemik akut hastalıktaki gibi tipiktir ve yüzme kesesi, karaciğer, beyin, böbrek, bağırsak, kalp ve periton gibi dokularda değişen düzeyde kanamalar mevcuttur (Şekil 1) (Türe ve Savaş, 2010). *L.garvieae* ile enfekte olmuş gökkuşuğu alabalıklarında gözlenen böbrekte liquafactive nekroz odaklarının yanı sıra böbreğin interrenal hemopoietik dokusunda erime, böbrek tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon ve ödem gibi başlıca histopatolojik bulgular görüldüğü bildirilmiştir (Ürkü,2011).



Şekil 1. *Lactococcus garvieae* ile enfekte olmuş alabalıkta görülen lezyonlar karın boşluğunda sıvı birikimi, karaciğerde nekroz ve dalağın şişmesi (üstteki resim) çift taraflı ekzoftalmia (alttaki resim)

1.2.4. Epidemiyoloji

Lactococcus garvieae ile yapılan patojenite çalışmalarında genç balıklarda (50 g) erişkin balıklara (100 g) oranla akut formun daha uzun süre devam edip mortalitenin daha yüksek olduğu rapor edilmesine rağmen (Muzquiz vd., 1999), son yıllarda gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde ki doğal enfeksiyonlarda etken 5 gramlık balıktan 1 kg ve daha büyük balıklara kadar tümünü etkilediği görülmüştür (Diler vd., 2002; Pereira vd., 2004).

Gökkuşağı alabalıkları diğer balıklarla karşılaştırıldığında en duyarlı ve mortalitenin en yüksek olduğu görülmüştür (Ghittino vd., 1998). Su sıcaklığının 15°C'nin üzerine çıkması, amonyum konsantrasyonunun artması ve ardından oksijen doygunluğunun azalması hastalığın ortaya çıkmasını ve şiddetini arttırmaktadır (Prieta vd., 1993; Ghittino vd., 1998). Ayrıca, kötü akuatik çevre, bakım şartları, beslenme ve yetersiz oksijen, etkenin yayılmasını ve balıklardaki ölüm oranını artırmaktadır (Fukuda vd., 1997).

Bakterinin bir işletmeye girişi ve hastalığı meydana getirmesi farklı yollarla ve farklı kaynaklarla gerçekleşmektedir (Vendrell vd., 2006). Enfekte balıkların çiftliğe transferi en sık görülen enfeksiyon kaynağıdır. Asemptomatik taşıyıcılar bakteriyi dışkı yolu ile havuza yayarlar ve böylece sağlıklı balıklar enfekte edilmiş olur. Ayrıca hastalığı geçirmiş balıklar da taşıyıcı konumundadır ve belirli periyotlarda etkeni yayabilirler (Ghittino vd., 1998). Çiftliklerde ki asemptomatik balıkların varlığı PZR metodu ile belirlenmiş ve çevre durumu bakteri lehine optimum olunca hastalığın ortaya çıktığı saptanmıştır (Cheng vd., 2002). Etken çiftliklerde balık dışında havuz suyundan, çamurdan, sedimentten ve akuatik ekipmanlardan da izole edilmiştir (Kusuda vd., 1991; Kitao vd., 1979). Hastalıkta bulaşma temelde horizontal yolla olmaktadır. Özellikle aynı ortamı paylaşan balıklar arasında yaralı balıkların birbirine teması yada fekal-oral yol ile bulaşma olmaktadır (Afonso vd., 2003). Ayrıca enfekte balık ya da diğer gıdaların yem olarak kullanılması ile de etken işletmelere bulaşabilir (Türe ve Savaş,2010).

1.2.5. Teşhis

Hasta balıklarda görülen lezyonlar ve karakteristik semptomlar benzer diğer hastalıklarda da görülebildiği için kesin teşhis için bakteriyel etkenin tanımlanması gerekmektedir (Vendrell vd., 2006). Hastalığın görüldüğü yerden ölü yada hasta görünümlü balıklar laboratuvara alındıktan sonra etken en uygun organlardan (böbrek,

beyin, dalak, karaciğer, bağırsak, göz ve kan) izole edilebilir (Ghittino vd., 1998). *Lactococcus garvieae*'yi izole etmek için BHIA, TSA gibi besi yerleri kullanılmaktadır. Etkenin biyokimyasal karakterini ortaya çıkarmak amacıyla klasik biyokimyasal metotlar kullanılabilir. Yine bu amaçla kullanılan API20 Strep, API-rapid ID32 ve API50CH gibi sistemler aynı zamanda bakterinin fenotipik karakterini ortaya çıkarmaktadır (Ravelo vd., 2001). *Lactococcus garvieae*'nin teşhisinde serolojik olarak lam aglütinasyon testi (Kitao vd., 1982; Eldar vd., 1995) ve florasan antikor tekniği (Kawahara vd., 1987) kullanılmaktadır. Son yıllarda geliştirilen PZR protokolü ile dizayn edilen primer setleri yardımıyla 16S rDNA sekans analizleri yapılarak *L. garvieae*'nin spesifik tür tayini kolayca yapılabilmektedir (Altınok, 2011). Yine son zamanlarda balıklarda bulunan birden fazla patojeni eş zamanlı olarak tespit için multipleks PZR metodu geliştirilmiştir. Bu teknik hem saf kültürlerden hem de doğal infekte balık dokusundan *L. garvieae*'nin dışında birden fazla etkeninde aynı anda tespitine kısa sürede olanak vermektedir (Altınok, 2011).

1.2.6. Tedavi

Balıklarda *Streptococcus* cinsi ve benzeri etkenlerden kaynaklanan infeksiyonlarda tedavi amaçlı olarak eskiden beri antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların yanlış kullanımı antibiyotiklere olan direnci arttırmıştır (Katao vd., 1982). Bu ilaçların bazılarının in vitro şartlarda *L. garvieae*'ye karşı etkili olmalarına rağmen, gerek balıkta ani gelişen iştahsızlık gerekse dirençli suşların oluşmasından dolayı in vivo şartlarda etkisiz oldukları gözlenmiştir (Bercovier vd., 1997). Gökkuşluğu alabalıklarında ortaya çıkan *Lactococcosis* salgınlarında hastalığı kontrol altına almak için çoğunlukla eritromisin, oksitetrasiklin, amoksisilin ve doksasiklin kullanılmaktadır (Munday vd., 1994).

Son yıllarda Türkiye'de yapılan çalışmalarda antibiyogram testi uygulanan suşların genel olarak; oksitetrasiklin, amoksisilin, tetrasiklin ve florfenikol gibi antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları, gentamisin ve sulfametoksazol+trimethoprim gibi antibiyotiklere karşı ise dirençli oldukları saptanmıştır. Bunun yanı sıra aynı bakterilerin siprofloksasine karşı %68, penisiline karşı %33, enrofloksasine karşı ise %40 ve eritromisine karşı %12'sinin direnç gösterdiği saptanmıştır (Türe ve Savaş,2010).

1.2.7. Koruma ve Kontrol

Lactococcus garvieae etkeninin bir çiftliğe girişini engellemek için koruyucu önlemler almak gerekir. Balığa elle müdahalenin minimuma indirilmesi, ölü ya da hasta balıkların hemen uzaklaştırılması, erken teşhis, stok yoğunluğunun düşük tutulması, alet ve ekipmanlarda hijyene dikkat edilmesi ve kaliteli yem kullanımı alınması gereken en önemli tedbirlerdir. Balık tanklarının periyodik temizliği alet ve ekipmanın formaldehit, kloramin-T, hidrojen peroksit ve potasyum permanganat gibi dezenfektanlar ile dezenfeksiyonu etkenin yayılmasının engellenmesi için faydalıdır (De Kinkelin vd., 1991; Romalde vd., 2004). Ayrıca etkenin girişini engellemek amacıyla tesise yumurta ve yavru balık girişlerinin kontrol altına alınması ve hastalıktan arındırılmış sağlık sertifikalı yumurtaların alınması gereklidir (Öztürk ve Altınok, 2014). Lactococcosis'i kontrol altına almak için duyarlı populasyon aşılabilir. Lactococcosis salgınları görülen yerlerden alınan *L. garvieae* izolatları ile inaktive aşılar geliştirilmiştir (Eldar vd., 1995; Eldar vd., 1997). İspanya'da balık çiftliklerinde bu tip aşilarla yapılan denemelerde aşılanmış balıklardaki mortalitenin aşılammış üstelik eritromisin ile tedavi edilen balıklarda ki mortalite oranına oranla üç kat daha düşük olduğu gözlenmiştir (Prieta vd., 1993). Son yıllarda farklı mineral yağlar ile adjuvantlı aşilar geliştirilmiştir. Bu aşiların aşilamadan sonraki koruma süresinin diğer aşilara göre daha uzun olduğu saptanmıştır (Vendrell vd., 2004; Ghittino vd., 1999).

1.3. Proteinlerin Analizi ve Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ve Western Blot (Immunoblotting)

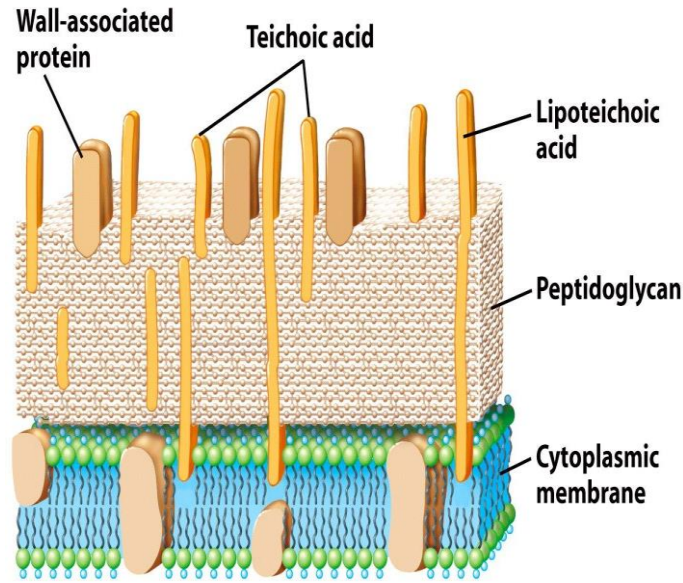
SDS-PAGE proteinlerin analizi için en çok kullanılan, pahalı olmayan, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Bu nedenle de kullanım alanı son derece geniştir. Elektroforez, elektrik yüklü bir alanda iyonların göçü olayıdır. Proteinlerin elektroforezinde, moleküler kütlesi, ortamın pH'ı ve proteinin anyon veya katyon olması gibi özellikleri nedeni ile farklı proteinler farklı göç hızı gösterirler ve ağırlıklarına göre hareket ederler (Stott, 1989). SDS-PAGE yönteminde, proteinler anyonik deterjan olan SDS ile reaksiyona girerek negatif yüklü kompleksler oluştururlar. Bu teknikte proteinler denatürasyona uğrayarak üç boyutlu yapıdan linear yapıya dönüşerek poliakrilamid jelde ayrılırlar (Aslan vd., 2006). Bu yöntem, proteinlerin molekül ağırlıklarının

belirlenmesinde, proteinlerin saflığının kontrolünde, türler arası benzerlik ve farklılıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Kompleks bir yöntem olan “Western Blot”, protein karışımının jel elektroforezi ile ayrıştırıldıktan sonra uygun bir membrana transferini kapsar. Bakterinin çeşitli antijenlerine karşı oluşan antikör yanıtını gösteren bir “İmmunoblotlama” yöntemidir. Protein spesifik olarak işaretli antikör veya antijenle reaksiyona girerek tanımlanabilir. Bu yöntem ile özel bir proteinin moleküler ağırlığı bilgisi ve işlenmiş ürünlerden izoformların ayırımı mümkündür. Ayrıştırılan proteinlerin jellerden membranlara transfer yöntemlerinin geliştirilmesi, proteinlerin elektroforetik analizi için yeni bir devir açılmasına neden olmuştur. Immunoblotting ya da Western Blotting adı verilen bu immunokimyasal yöntemler bir membran üzerine sabitleştirilmiş proteinleri tanımlamada, proteinlerin büyüklüğü, konsantrasyonu, konsantrasyon değişimleri, farklı gruplar arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Proteinlerin membranlara transferi de “Western Blotting”olarak isimlendirilmiştir. SDS-PAGE’den sonra jeldeki proteinlerin membrana aktarılması için kullanılan iki transfer yöntemi vardır. Biri yarı-kurutma ile blotting (Semi-dry blotting) yöntemi olup jel ve immobilize edilmiş membran, buffer ile ıslatılmış filtre kağıtları içinde tutularak 10-30 dakika akım geçirilmesidir. Diğeri ise ıslak (tank) blotting (Wet blotting) yöntemi olup jel membran sandwich sisteminin elektrotransfer için transfer buffer içine konularak en az 45 dakika ya da tüm gece boyunca transfer işleminin devam etmesidir. Birinci aşaması olan SDS-PAGE ile elektroforeze tabi tutulan proteinler transfere hazır hale gelirler. Bu aşamadan sonra uygulanacak olan Western Blot yönteminde ayrılmaya tabi tutulan proteinlerin nitroselüloza (ya da naylon veya benzeri materyallere) transfer edilmesi daha sonra non-spesifik bağlanmayı önlemek için membran üzerindeki protein bağlanma kısmının bloke edilmesi ve ardından transfer edilmiş ilgili proteine spesifik antikörün bağlanmasından sonra birinci antikora, enzim işaretli ikinci antikörün bağlanması son olarak enzim bağlı kompleksin membrana uygun enzim-substrat solüsyonu uygulanarak gösterilmesi şeklinde sıralamak mümkündür (Altıntaş ve Yolasığmaz, 1997).

1.4. Gram-Pozitif Bakterilerin Hücre Duvar Yapısı

Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı esas olarak tek tip bir molekülden oluşur ve sert bir tabaka içerir. Bu tabaka bakterinin şeklinin korunması, çevre şartlarına dayanıklılığını, fagositoza karşı korunması ve bakterilerin üremesi için bölünmesinde başlangıç rolü oynar. Gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerdeki sert duvar tabakasının kimyasal bileşimi çok benzerdir. Peptidoglikan adı verilen bu polisakkarit N-asetilglukozamin ve N-asetümuramik asit olmak üzere iki tip şeker türevidir ve az sayıda özgül amino asit içerir. Bu amino asitler L-alanin, D-alanin, D-glutamik asit ve ya lizin ya da diaminopimelik asittir. Bu yapılar birbirlerine peptid bağları ile (beta 1-4 glikozid) bağlanırlar ve tetrapeptidler arasındaki çapraz bağlar yapının dayanıklılığını sağlar. Bu çapraz bağlanma, farklı bakterilerde farklı ölçülerde gerçekleşir. Gram-pozitif bakterilerde hücre duvarının %90'ı peptidoglikandan oluşur bu tabaka ayrıca teikoik asit, lipoteikoik asit ve kompleks yapıdaki polisakkaritleride içerir (Şekil 2). Protein yapıda olan teikoik asit ve lipoteikoik asit antijeniktir ve önemli virülans faktörlerdendir (Arda, 1997).



Şekil 2. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı, (URL-2, 2013)

1.5. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliği hayvansal üretim çalışmaları içinde önemini kabul ettirmiş ve hızla gelişen bir üretim dalı olmuştur. Kültür balıkçılığının gelişmesine paralel olarak işletmelerde görülen *L. garvieae*'nin neden olduğu salgınlar yetiştiriciliği yapılan türler arasında önemli bir yere sahip olan gökkuşağı alabalığında tehdit oluşturmaktadır. Hastalık ilk kez Ege Bölgesi ve civarındaki işletmelerde görüldükten sonra kısa sürede her bölgeye ve özellikle Karadeniz Bölgesi'ne yayılmış, %50'nin üzerinde mortaliteye sebep olmuştur. Bu çalışmada ülkemiz ve yurt dışından izole edilen 43 *L. garvieae* ve 1 adet *Lactococcus lactis* olmak üzere toplam 44 bakteri izolatının toplam protein profillerinin karşılaştırılması ve antijenik protein profillerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

1.6. Literatür Özeti

Kültür balıkçılığının gelişimi ve yaygınlaşmasıyla birlikte bulaşıcı balık hastalıkları da artmıştır. Bu hastalıklardan kaynaklanan kayıpları azaltmak için patojenlerinin teşhisi, tedavisi ve moleküler metotlar ile ilgili yapılan çalışmalarda artmıştır. Bakterilerin teşhisinde kullanılan en yaygın yöntemlerin başında biyokimyasal testler gelmektedir. Klasik biyokimyasal testlerin yanında API kitleri de kullanılmaktadır. Ancak kullanılan API20 E, API20 NE ve API20 Strep gibi hazır kitler insan ve hayvan bakterilerine göre ayarlandığından balıklar gibi soğukkanlı hayvanlardan izole edilen bakterilerin teşhisinde inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak yanlış sonuçlar vermektedir (Türe, 2011).

Türkiye'de *Lactococcus garvieae* ile ilgili ilk çalışma Çağırğan (2004) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada alabalıklardan izole edilen 20 adet *L. garvieae* suşu fenotipik özellikleri, serolojik özellikleri ve kapsül oluşumu yönünden incelemiştir. Tüm suşlar API 20 Strep, API50 CH ve klasik biyokimyasal testlerle tanımlanmıştır. İzolatlar karşılaştırılmış ve biyokimyasal benzerlikleri ortaya koymuştur. Kav vd. (2007), Konya Bölgesi gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde Streptococcus etkeni olan *L. garvieae*'nin izolasyonu, tanımlama ve fenotipik özelliklerini belirlemeye çalışmışlardır. API20 Strep, klasik biyokimyasal yöntemler ve polimeraz zincir reaksiyonu metodunu kullanarak elde ettiği 30 saf kültürün homojen ve kapsüllü olduğunu ortaya koymuşlardır. Bakteriyel balık hastalıklarına sebep olan etkenlerin biyokimyasal olarak birbirine çok yakın olması ve

biyokimyasal testlerle suşlar arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya konamamasından dolayı biyokimyasal tekniklerin yerine moleküler teknikler kullanılmaya başlamıştır.

Vela vd. (2000) İspanya'daki salgınlardan izole edilen *L. garvieae* izolatları ile diğer ülke, kaynak ve ilk izolatu karşılaştırmıştır. RAPID ID 32, API50 CH gibi hazır kitler kullanılarak yapılan fenotipik denemeler PFGE moleküler metodu ile desteklenmiştir. Önemli bulgulara ulaşılan bu çalışmada biyokimyasal metotların moleküler metotla desteklenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Türe vd. (2014) klasik biyokimyasal testler, API20 Strep, PFGE ve ERIC-PZR metotlarını kullanarak farklı bölgelerden izole edilen *L. garvieae* suşlarını karakterize ederek suşlar arasındaki genetik bağı belirlemeye çalışmışlardır. Ayrıca aynı yöntemle ülkemiz suşları ile yurt dışından elde edilecek suşlar arasındaki genetik bağı ortaya koymaya çalışmış ve *ApaI* enzimi ile gerçekleştirilen PFGE işlemi sonucunda yakın coğrafik alanlardan izole edilen suşların benzer oldukları ve referans suşun İspanya suşları ile benzer olduğunu bulmuşlardır.

Moleküler tekniklerden biri olan 'Western Blot örneklerde bulunan birçok protein arasından istenilen proteini tespit etmede kullanılmaktadır. Ayrıca örneklerde istenilen spesifik proteinin olup olmadığını, farklı örnekler arasında istenilen proteinin miktarının karşılaştırılması, farklı biyolojik koşullar altında proteinin durumundaki değişimin belirlenmesi ve farklı protein örneklerinde bağıl protein miktarını belirlemek için yapılmaktadır. Bu konuda bu bakteriyle yapılan çalışmalar çok sınırlıdır.

Altun vd. (2007) 9 adet *L. garvieae* izolatu kullanarak yapmış oldukları Western Blot çalışmasında izolatların hepsi birbirinin aynısı 30, 37, 40, 46, 52 ve 66 kDa protein bant profili oluşturduğunu belirlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise 40 kDa proteini kodlayan genin glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) geni olduğu belirlenmiştir. Bu gen vektöre klonlanıp çoğaltıldıktan sonra tilapiyaya verildiğinde balıkları *L. garvieae* enfeksiyonuna karşı 100%'e yakın koruduğu bulunmuştur (Tsai vd., 2013). *Lactococcus garvieae*'nin bazı suşları kapsüllü bazıları da kapsülsüz olmasına ve kapsüllü olan suşlar kapsülsüze nazaran daha virulent olmasına rağmen, immunoglobulini (Ig) bağlayan baskın proteinler kapsüllü ve kapsülsüz suşlarda aynı olduğu belirlenmiştir (Barnes vd., 2002).

Yine benzer bir çalışmada Morita vd. (2011) balıklarda önemli kayıplara neden olan *L.garvieae*'nin virülans LG2 ve virülans olmayan ATCC 49156 genomlarının karşılaştırmalı analizlerini yapmış ve her iki suşun büyük ölçüde ortak olduğunu ancak

LG2 içinde mevcut olan 16,5 kilo bazlık bir kapsül kümesi varlığını ortaya koymaya çalışmış ve sonuçta kapsüllü suşların önemli derecede virulent olduğunu belirlemişlerdir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bakteri Örnekleri

Bu çalışmada 2001-2014 yılları arasında Ege ve Karadeniz Bölgesindeki çeşitli işletmelerden izole edilen 28 suş ile İspanya, İtalya ve Fransa'dan izole edilen 13 suş kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada Japonya'dan izole edilen ATCC suşu negatif kontrol ve Ordu'dan izole edilen Perşembe suşu pozitif kontrol olmak üzere toplam 43 adet *L. garvieae* ve 1 adet *Lactococcus lactis* suşu kullanılmıştır (Tablo 1).

2.2. Bakterilerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Derin dondurucuda (-80°C) stoklanan bakteriler çoğaltılmaları için TSA'ya ekilmiş, 25°C'de 24 saat inkubasyon sonunda oluşturduğu koloniler renk, şekil ve parlaklık gibi morfolojik özellikleri bakımından incelenmiştir. Farklı koloni morfolojisi gösteren bakteriler yeniden TSA'ya ekilerek saflaştırılmıştır. Saf bakterilerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile gram boyama yapılmış ve izolatların hareket özellikleri mikroskopta incelenmiştir. *Lactococcus garvieae* izolatlarının biyokimyasal özellikleri daha önce yapılan çalışmada belirlendiğinden (Türe vd., 2014) bu çalışmada tekrarlanmamıştır.

2.3. Antikor Eldesi

2.3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Antikor üretimi için 3 erkek Yeni Zelanda tavşanı (2,5-3 kg, 6 aylık) Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyle Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Hayvanların bakımı ve antikor eldesi Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezine yapılmıştır. Tavşanların on gün karantina süresi dahil olmak üzere deney süresince bakımı veteriner hekim kontrolünde yapılmıştır.

Tablo 1. *Lactococcus garvieae* Suşları, İzole Edildikleri Konakçılar, Yerler ve Yıllar

No	İzolat/Suş	Konakçı	İzole Edilen Yer	Yıl
1	ATCC 49156	Sarikuyruk	Japonya	1974
2	1684	Gökkuşacağı	İspanya	1997
3	2398	Gökkuşacağı	Fransa	1998
4	8053 C/02	Gökkuşacağı	İspanya	2000
5	164 A/03	Gökkuşacağı	İspanya	2000
6	04/8782 FTPI	Gökkuşacağı	İspanya	2001
7	04/8782 (532)	Gökkuşacağı	İspanya	2001
8	04/8782 (498)	Gökkuşacağı	İspanya	2001
9	M300	Keçi peyniri	İtalya	2001
10	M1	Gökkuşacağı	Muğla	2002
11	M2	Gökkuşacağı	Muğla	2002
12	A-58	Gökkuşacağı	İtalya	2002
13	04/8782 ITP109	Gökkuşacağı	İspanya	2002
14	M3	Gökkuşacağı	Muğla	2003
15	G-27	Sığır sütü	İtalya	2003
16	8740/03	Gökkuşacağı	İspanya	2003
17	PP6O	Gökkuşacağı	İtalya	2004
18	<i>L. lactis</i>	Sığır sütü	Akdeniz	2005
19	216-6	Gökkuşacağı	Rize	2007
20	Sider-17	Gökkuşacağı	Rize	2008
21	AA	Gökkuşacağı	Rize	2008
22	512-8	Gökkuşacağı	Rize	2008
23	AA-37	Gökkuşacağı	Rize	2008
24	OME	Gökkuşacağı	Rize	2008
25	511-15	Gökkuşacağı	Rize	2008
26	Pap 225-1	Gökkuşacağı	Artvin	2008
27	636-16	Gökkuşacağı	Gümüşhane	2008
28	671-14	Gökkuşacağı	Gümüşhane	2008
29	670-20	Gökkuşacağı	Gümüşhane	2008
30	673-5	Gökkuşacağı	Gümüşhane	2008
31	399-18	Gökkuşacağı	Artvin	2008
32	BB	Gökkuşacağı	Artvin	2008
33	İyŞfk.	Gökkuşacağı	Rize	2009
34	Muğla	Gökkuşacağı	Muğla	2009
35	235-16	Gökkuşacağı	İzmir	2009
36	Ser114	Gökkuşacağı	Trabzon	2009
37	AF-14	Gökkuşacağı	Rize	2009
38	A30	Gökkuşacağı	Rize	2009
39	K9	Gökkuşacağı	Gümüşhane	2010
40	Perşembe	Gökkuşacağı	Ordu	2011
41	M4	Gökkuşacağı	Muğla	2011
42	Trb	Gökkuşacağı	Trabzon	2011
43	1073/03C	Gökkuşacağı	İspanya	2000
44	R-817	Gökkuşacağı	Trabzon	2014

2.3.2. Anti-Serum Üretimi için Antijen Hazırlanması

Antikor üretimi için deniz kafesinde yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *L. garvieae* Perşembe kullanılmıştır. Bakteri örnekleri TSA'ya ekim yapıldıktan sonra 29°C'de bir gece inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyondan sonra bakteriler BHI brota tekrar ekilerek 29°C'deki çalkalamalı inkübatörde 5 saat çoğaltılmış ve spektrofotometrede (Shimadzu 2550) 630 nm'de bakteri yoğunluğu 0,6 OD olacak şekilde ayarlanmıştır. Örnekler 4000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant döküldükten sonra PBS (Fosfat buffer saline) ile iki kez yıkanmıştır. Bakteriler 25 ml PBS bulunan tüplere alınarak 2 ml formaldehitte (%3'lük formalin) 24 saat bekletilmiştir. Örnekler daha sonra 4000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek üzerlerine 25 ml PBS eklenmiştir. Spektrofotometrede 630 nm'de bakteri yoğunluğu 1,4 (10⁹ CFU/ml) olarak ayarlanmış ve örnekler 0,5 mililitrelik tüplere alınarak 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Antijen hazırlanması için 3ml formaldehitte inaktif edilmiş bakteri örneği üzerine, 3ml Freund Complete Arjuvant eklenerek karıştırılmıştır. Veteriner hekim kontrolünde her bir tavşanın kas içine 1ml enjekte edilmiştir (Şekil 3). Tavşanlara ikişer hafta aralıklarla üç benzer enjeksiyon uygulanmıştır. İkinci ve üçüncü enjeksiyonda In Complete Arjuvant kullanılmıştır. Son enjeksiyondan iki hafta sonra kulak arkası toplardamardan kan alınmış ve serum temin edilmiştir (Şekil 4). Kullanana kadar serum -80°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. Formaldehitte inaktif edilmiş *L. garvieae* ile Freund Complete Arjuvantın karıştırılarak tavşanın kasına enjekte edilmesi



Şekil 4. Tavşanların kulak arkası toplardamarlarından kan alınması

2.4. SDS-PAGE ve Western Blotta Kullanılan Çözelti ve Jellerin Hazırlanması

SDS-PAGE ve Western Blot yönteminde kullanılan çözeltiler ve jeller Bio-Rad Mini-Protein (katalog numarası 165-800) el kitabında belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

2.4.1. SDS-PAGE Elektroforez Solüsyonları

2.4.1.1. Akrilamid/Bis (%30 T, %2,67 C)

14,6 g akrilamid ve 0,4 g N'N'-metilen-bis-akrilamid tartılarak karıştırılmış DDI (De iyonize su) H₂O ile 50 ml tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon filtreden geçirilmiş ve 4°C 'de muhafaza edilmiştir.

2.4.1.2. Sodyum Dodesil Sülfat (%10 SDS w/v)

5g SDS tartılarak DDI H₂O ile 50 ml tamamlanmıştır.

2.4.1.3. Tris –HCl (1.5 M, pH 8.8)

9,1g Tris base tartılarak DDI H₂O ile 50 ml tamamlanmış ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.4.1.4. Tris –HCl (0.5M, pH6.8)

3g Tris base tartılarak DDI H₂O ile 50 ml tamamlanmış ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.4.1.5. Sample Buffer

1,25ml 0,5M Tris base, 2,5ml gliserol, 0,2µl bromophenol blue ve 2ml SDS karıştırılarak hazırlanmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

2.4.1.6. Running Buffer (10X)

6,06g Tris Base, 2,8g glycine, 2g SDS karıştırılarak DDI H₂O ile 200 ml'ye tamamlanmış ve 1/9 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

2.4.1.7. Amonyum Persülfat (%10 APS)

Günlük 100 mg amonyum persülfat tartılarak üzerine 1ml DDI H₂O eklenmiştir.

2.4.1.8. Resolving Jel (Alt jel)

Alt jel %12'lik; 3,4 ml DDI H₂O, 4,0 ml %30 Acrylamide/Bis, 2,5 ml Jel bufer, 0,1 ml %10 (w/v) SDS eklenerek hazırlanmıştır. Jelin donmasını sağlamak için 50 µl %10 APS ve 5µl TEMED eklenmiştir.

2.4.1.9. Stacking Jel (Üst Jel)

Üst jel %4'lük; 6,1 ml DDI H₂O, 1,3 ml %30 Acrylamide/Bis, 2,5 ml Jel bufer, 0,1 ml %10 (w/v) SDS eklenerek hazırlanmıştır. Jelin donmasını sağlamak için 50 µl %10 APS ve 10µl TEMED eklenmiştir. Jel cam plaklar arasına konulduktan sonra üzerine hava ile temasının kesilmesi ve daha çabuk polimerizasyonu için etanol eklenmiştir.

2.4.2. SDS-PAGE Jel Boyanması İçin Günlük Hazırlanması Gereken Solüsyonlar

2.4.2.1. Fix/Stop Solüsyonu (100 ml)

10 ml glacial asetik asid üzerine 90 ml deiyonize su eklenerek çözelti 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.4.2.2. Staining Solüsyon (100 ml)

0,1g gümüş nitrata 0,15 ml formaldehit eklenerek çözelti deiyonize su ile 100ml'ye tamamlanmıştır.

2.4.2.3. Developer Solüsyonu (100 ml)

0,15 ml %37 formaldehit, 20 mg/mL sodyum tiyosülfat, 3 g sodyum karbonat karıştırılmış ve çözelti deiyonize su ile 100ml'ye tamamlanmıştır.

Boyama işlemi bittikten sonra jelin resmi çekilerek bantların analizi Bionumerics Gelcompar II software'i (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak yapılmıştır.

2.4.3. Western Blot Solüsyonları

2.4.3.1. Towbin Buffer (10X) (Transfer Tamponu)

Protein transfer tamponu 5,82g Tris, 2,93g Glycine, 3,75g %10 (w/v) SDS 800ml DDI H₂O karıştırılarak hazırlanmış ve üzerine 200 ml methanol eklenmiştir.

2.4.3.2. %5 BSA (Bloklaama Solüsyonu)

5 g BSA 100 ml TBST (Tris-Buffer Saline ve Tween) içerisinde çözülerek 4 °C'de saklanmıştır.

2.4.3.3. PBS, % 0.05 Tween 20

100 ml 10 x PBS ve 5 ml Tween 20 çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.4.3.4. PBS, % 0.05 Tween 20, % 0.05 Triton X-100

100 ml 10 x PBS, 5 ml Triton X-100 ve 5 ml Tween 20 çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.5. Proteinlerin Analizi Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ve Western Blot (Semi Dry Sistem)

2.5.1. Toplam Protein İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi

Bakteri suşlarının TSA'a ekimi yapılmış ve 29°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra TSA'da çoğalan kolonilerden tek bir koloni alınıp 50 ml'lik santrifüj tüplerinde 40 ml BHIB besiyeri bulunan tüplere ekimi yapılmış ve 29°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bakteriler Fosfat Buffer Saline (PBS) ile 2 kez yıkanmış ve bakteri yoğunluğu spektrofotometrede (Shimadzu 2550)

630 nm’de her bir suş için 2 OD olacak şekilde sabitlenmiştir. Örnekler 1,5 ml’lik tüplere alınarak santifüj edilmiş ve süpernatantın 1ml’si atılmıştır. Tüpteki 0,5 ml bakteri örnekleri vortekslenmiş ve bakteri hücrelerinin hücre duvarlarının parçalanması için prob sonikatör cihazı (Bandelin HD2070, Berlin, Almanya) kullanılarak örnekler buz içerisinde 2 dakika 20 Watt gücünde sonikasyona tabi tutulmuştur (Şekil 5). Sonikasyona tabi tutulan örneklerin üzerine 0,9 ml fosfat buffer ve 0,1ml %20’lik SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) eklenerek kaynayan suda 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra buz içerisinde soğutulan örnekler 10000 x g’de 4°C’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant alınmış ve -20°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 5. Bakteri hücrelerinin prob sonikatör cihazı ile parçalanması

Jele yüklenecek proteinlerin konsantrasyonları aynı olması gerektiğinden tüm protein örneklerinin konsantrasyonları BCA (Protein Assay Kiti) (BioVison Incorp, California, ABD) kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 6). Ölçüm kitin önerdiği protokole göre yapılmış ve örneklerin konsantrasyonunun belirlenmesinde 0 µg/ml (Blank) ile 2 000 µg/ml konsantrasyonları arasında standartlar oluşturulmuştur.



Şekil 6. Bakterilerin protein konsantrasyonlarının belirlenmesi

2.5.2. Toplam Protein Analizi İçin SDS-PAGE Jel Hazırlanması ve Yürütülmesi

Cam tabakalar önce %70 etanol, sonra saf su ile temizlenmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama standına yerleştirilmiştir. Hazırlanan %12'lik jel karışımına polimerleşmeyi sağlayacak olan TEMED ve APS eklenmiş, karışım kısa camın üst kısmından 1 cm aşağısına gelecek şekilde camlar arasında hava kabarcığı bırakmadan aktarılmıştır. Arta kalan jel baz alınarak polimerizasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edilmiştir.

Hazırlanan yükleme jeli camlar arasında kalan 1 cm'lik boşluğa aktarılmış ve tarak dikkatlice camlar arasına yerleştirildikten sonra polimerizasyon için beklenilmiştir. Polimerizasyonun tamamlanmasından sonra camlar tanktaki haznesine dikkatlice yerleştirilmiş tank solüsyonu belirtilen noktalara kadar doldurulduktan sonra tarak kuyucuklara zarar vermeden çıkartılmış ve jel, örneklerin yüklenmesi için hazır hale getirilmiştir (Şekil 7).

SDS-PAGE iki defa yapılmıştır. İlk denemede bakterilerden izole edilen toplam protein profilleri arasındaki benzerlik ya da farklılıkları belirlemek için yapılmıştır. Elektroforez işlemi Bio-Rad Mini-Protein jel elektroforezi kullanılarak yapılmıştır (Şekil 8).

Hazırlanan jeller tanka yerleştirildikten sonra her bir 50 µl örnek 15 µl sample buffer ile karıştırıldıktan sonra 15 µl örnek ve 3 µl protein marker kuyucuklara yüklemiştir. Örnekler 125 Volt ve 41 mA'de 65 dakika yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan

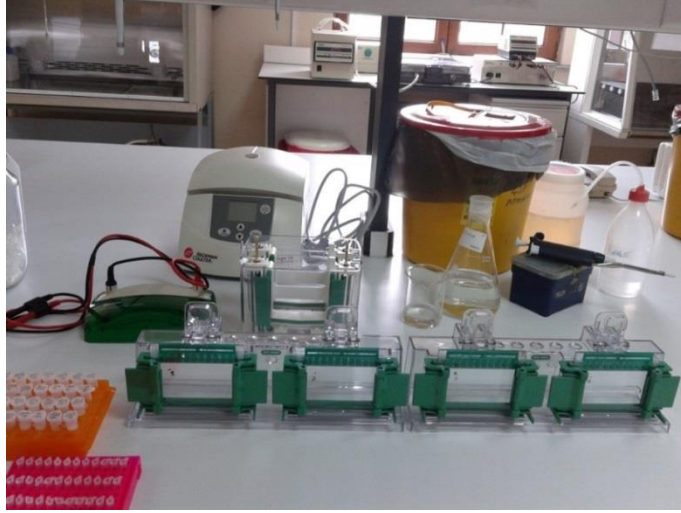
sonra, jeldeki bantların görüntülenme için gümüş boyama yapılmıştır. Bu yöntem Tablo 2'de gösterilen aşamalar takip edilerek yapılmıştır. Boyama işlemi bittikten sonra jelin resmi çekilerek bantların analizi Bionumerics Gelcompar II software'i (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak yapılmıştır. Farklı izolatların bantları arasındaki benzerlik, %2,5 tolerans ve %1 optimizasyon yapılarak Dice benzerlik katsayısı ile hesaplanmıştır. Kümeleme analizi ile dendrogram [unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA)] oluşturulmuştur.

Tablo 2. Gümüş Boyama Yöntemi

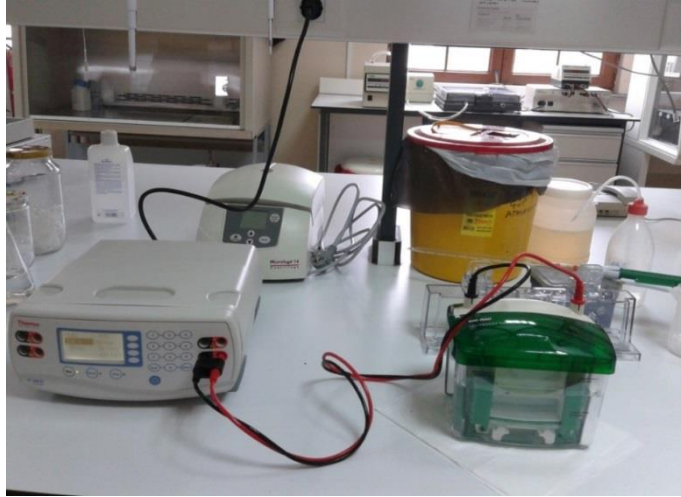
Aşama	Solüsyon	Süre
1	Fix/stop solüsyonu	30dakika
2	Deiyonize su	2dakika
3	1. adım 2 kez tekrarlandı	2x2 dakika
4	Staining solüsyonu	30dakika
5	Deiyonize su	10saniye
6	Developer solüsyon (4-10°C)	45-60dakika
7	Fix/stop solüsyonu	10dakika
8	Deiyonize su	2dakika

2.5.3. Western Blot İçin SDS-PAGE Jel Hazırlanması ve Yürütülmesi

Yukarıda açıklandığı gibi protein izolasyonu yapılan örnekler vortekslendikten sonra 20 µl örnek üzerine 5 µl sample buffer eklenmiştir. Örnekler 100°C'de 5 dakika kaynatılmış ve 2 saniye santrifüj edilmiştir. Kuyucuklara 10 µl örnek ve 5 µl marker yüklenmiştir (BioRad 15 X kuyu için). Örnekler 80 Voltta (500mA, 150W) 10 dakika yürütüldükten sonra 110 Voltta 1,5 saat yürütülmüştür (Şekil 8).



Şekil 7.SDS-PAGE için jellerin hazırlanması



Şekil 8.Hazırlanan bakteri örneklerinin jelde yürütülmesi

2.5.3.1. Membranın Blotlanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra camlar spatula yardımıyla ayrılarak jel çıkartılmış ve jelin atık kısımları (yükleme jeli, jelin kenar kısımları gibi) kesilip atılmıştır. Jelin sağ alt tarafı işaretlemek amacıyla hafifçe kesilmiş ve jel membranın üstüne uygun bir biçimde yerleştirilmiştir. Sandviç oluşturulduktan sonra tüm hava boşluklarının giderilmesi için yuvarlak bir silindir ile hafif basınç uygulanmıştır. Blotlama için 4 tane ince Watmann kağıdı kullanılmıştır. Blotlama 35 Voltta (500mA, 150W) 1 saat yürütülmüştür (Şekil 9).

Blotlama için hazırlanan 10 ml blotlama solüsyonu 50 ml falkon içerisinde, oda sıcaklığında 1 saat roller mikserde inkübasyona bırakılmıştır. Blotlanan membran, daha önce hazırlanmış olan birinci antikor/blotlama (1:1000) solüsyonu içerisinde roller mikser üzerinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Birincil antikor inkübasyonundan sonra membran 3 defa 10'ar dakika TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır.

Daha sonra membran birincil antikorlara uygun ikincil antikor 1/10000 oranında eklenmiş ve %1'lik BSA içerisinde roller mikserde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu inkübasyondan sonra membran tekrar 3 defa 10'ar dakika TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Üçüncü yıkamadan sonra membran kuruması sağlanmış ve temiz bir kaba aktarılmıştır. İmmünokimya ile saptamak için hazırlanan 1 ml ECL solüsyonu ile muamele edilmiştir (1-2 dk), (Şekil 10). Bu aşamadan sonra ChemiDoc (Bio-Rad) oluşan fragmentlerin resimleri çekilmiştir ve alınan her bir fotoğraf için maruz kalma süresi (exposure time) kaydedilmiştir. Maruz kalma süresi bantların kalitesine göre ayarlanmıştır. Görüntüleme yaklaşık 5-6 saniye sürmüştür.

Tavşanlardan elde edilen antikorların *L. garvieae*'ya özgü olup olmadığı ya da başka bakterilerle reaksiyona girip girmediğini belirlemek için *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio fluvialis*, *P. putida*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus*'dan da protein izolasyonu yapılarak Western Blot yapılmıştır.



Şekil 9.SDS-PAGE'densonra proteinlerin jelden mebrana aktarılması



Şekil 10. Membrana aktarılan proteinlerin antikor/blotlama (1:10000) solusyonu içerisinde roller mikser üzerinde çalkalanması ve TBST ile yıkama işlemi

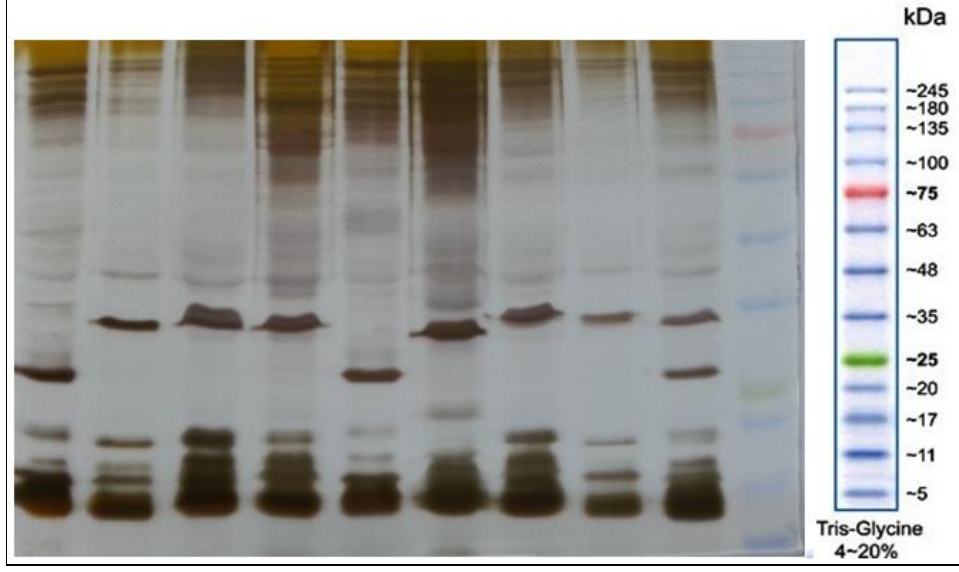
3. BULGULAR

Bu çalışmada SDS-PAGE ve Western Blot kullanarak 43 adet *L. garvieae* suşunun toplam protein profilleri ve antijenik profilleri karşılaştırılmıştır. Literatür bilgilerine göre ATCC 49156 suşu avirürent karakterde olup *L. garvieae* Perşembe suşu ise laboratuvarında yapılan virürentlik denemelerinde en virürent suş olarak belirlendi ve bu suş tavşanlardan antikor elde etmek için kullanıldı.

3.1. SDS-PAGE Profilleri

Ülkemizdeki farklı bölgelerden ve dünyanın farklı ülkelerinden izole edilen ve *L. garvieae* olduğu biyokimyasal testler ve PZR ile tanımlanan 43 izolatın toplam protein izolasyonu yapıldıktan sonra SDS-PAGE tekniği kullanılarak suşlar arasındaki benzerlikler karakterize edilmiştir (Şekil 11).

SDS-PAGE *L.garvieae* izolatlarının genotiplendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada 43 adet *L. garvieae* ve 1 adet *L. lactis* olmak üzere toplam 44 farklı suşun genetik benzerlikleri karakterize edilmiştir. Bunun sonucunda *L. garvieae*'nin yayılımı hakkında daha derin bilgi edinilmiştir. SDS-PAGE jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra gümüş boyama ile boyanan jelde, oluşan bantların yeri ve sayısı kıyaslanmıştır. Bantların boyutlarına bağlı olarak oluşan bant farklılıkları, *L. garvieae*'nin farklı tiplerini ortaya koymaktadır. SDS- PAGE sonucuna göre bakterilerin oluşan protein bantlarının boyutu 8 ile 140 kDa arasında oluşmasına rağmen suşlar arasında ki değişken bantlar 17 ile 48 kDa arasındaki bantlarda görülmüştür.

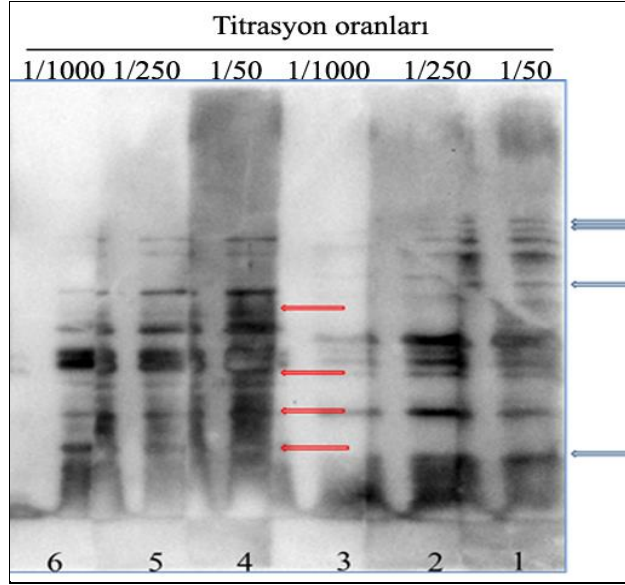


Şekil 11. Bazı suşların toplam protein fragmentlerinin SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra gümüş nitrat ile boyanmasıyla fragmentlerin boyları ve görünüşleri

Lactococcus garvieae suşunun toplam protein profillerinin SDS-PAGE’de analizi sonucu 7 ile 17 arasında farklı fragmentler oluşarak 6 adet farklı küme belirlenmiştir (A-F) (Şekil 12). Bu sonuçlara göre suşlar arasında benzerlik oranlarının düşük olduğu tespit edilmiştir (\leq %40). A kümesi iki alt kümeden oluşmakta olup, A1 alt kümesi %55,8 \pm 5,9 benzerlik oranıyla İspanya ya ait 5 suş ile Doğu Karadeniz’e ait 4 suştan oluşmaktadır. Muğla (M1) İzmir (235-16), ATCC ve İtalya (A58) suşları %57,8 \pm 1,8 benzerlik oranıyla A2 kümesini oluşturmuştur. A1 ile A2 arasındaki benzerlik ise %53 \pm 8’dir. B kümesi en büyük küme olup 3 alt kümeden oluşmaktadır. Bu kümede 17 suş bulunmakta olup, bir adet Muğla suşu (M4)’nun yanında Doğu Karadeniz’den izole edilen suşlarla beraber 3 adet İspanya suşu mevcuttur. Ayrıca Fransa (2398) suşu tek başına B kümesinin bir alt kümesini oluşturmaktadır. Bu kümedeki suşların birbirleriyle benzerlik oranları 59,9 \pm 3,9’dur. A ile B kümeleri arasındaki benzerlik oranı da %52 \pm 7,9 olarak belirlenmiştir. C kümesi sadece Muğla (M2) suşundan oluşmaktadır. Bu kümenin diğer ilk iki kümeyle olan benzerlik oranı ise %49,4 \pm 4,5’dur. İspanya (8782), Muğla (M5), Ordu (Perşembe), Rize (Sider17), Muğla (M3), Artvin (399-18) ve Rize (AF-14) suşları %56,6 \pm 3,8 benzerlikle D kümesinde bulunmaktadır. E kümesinde Gümüşhane (676-5) ve Trabzon (Ser114) suşu bulunmakta iken İtalya M300 suşuda tek başına F kümesini oluşturmakta olup diğer suşlarla olan benzerlik oranı %38,9 \pm 5,3 olarak tespit edilmiştir (Şekil 12).

3.2. Western Blot

Bu çalışmada formaldehit ile inaktif hale getirilmiş Perşembe suşuna karşı antikor üretimi için 3 farklı tavşan kullanılmıştır. Tavşanlardan elde edilen serumun immün yanıtını görmek amacıyla yapılan deneme çalışmasında Perşembe ve ATCC suşuları kullanılmış, 3 farklı tavşandan alınan antikorlar karıştırılarak 1/50, 1/250 ve 1/1000 olmak üzere 3 farklı titrasyon uygulanmıştır (Şekil 13).



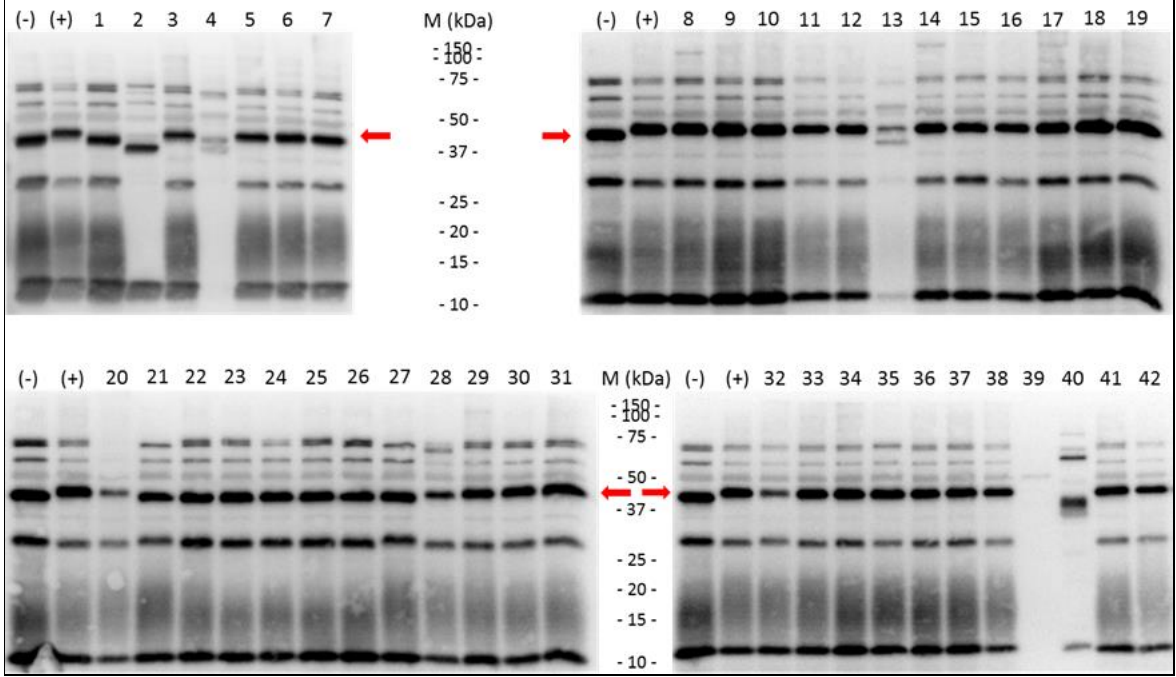
Şekil 13.Farklı antikor titrasyonu sonucu Western Blot yapımından sonra *L. garvieae* suşlarının görüntüsü (24 saniye). Kolon 1-3 *L. garvieae* Perşembe ve kolon 4-6 *L. garvieae* ATCC

Elde edilen sonuçlara göre tavşanların immuno yanıt verdiği ve *L.garvieae* izolatların arasında virülant ve virülant olmayan suşun benzerlik gösterdiği görülmüştür. Mavi okla gösterilen bantlar sadece Perşembe suşunda mevcutken, kırmızı okla gösterilen bantlar sadece ATCC suşunda görülmüştür. (Şekil 13).

3.3. Farklı Suşların antijenik Özelliklerinin Perşembe ve ATCC Suşu ile Karşılaştırılması

3.3.1. Örneklerin Karşılaştırılması

L.garvieae'nin Perşembe suşuna karşı tavşanlar tarafından üretilen antikorlar kullanılarak bu suş ile diğer 42 farklı suşun karşılaştırılması Western Blot tekniği ile yapılmıştır. Negatif kontrol literatürde non-virulent olarak kabul edilen ATCC suşu, pozitif kontrol olarak ise virulent olan Perşembe suşu kullanılmıştır. Dolayısıyla örnekler ATCC (-) ve Perşembe (+) suşlarının bant paterni ile karşılaştırılmış benzeyen ve benzemeyen olarak sınıflandırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda 25 ile 75 kDa seviyeleri arasında farklı bantlar görülmüştür. Ayrıca 37-50 kDa seviyesi arasında değişken bir bant gözlemlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. *L. garvieae* suşlarının ve *L. lactis*'in Western Blot görüntüleri

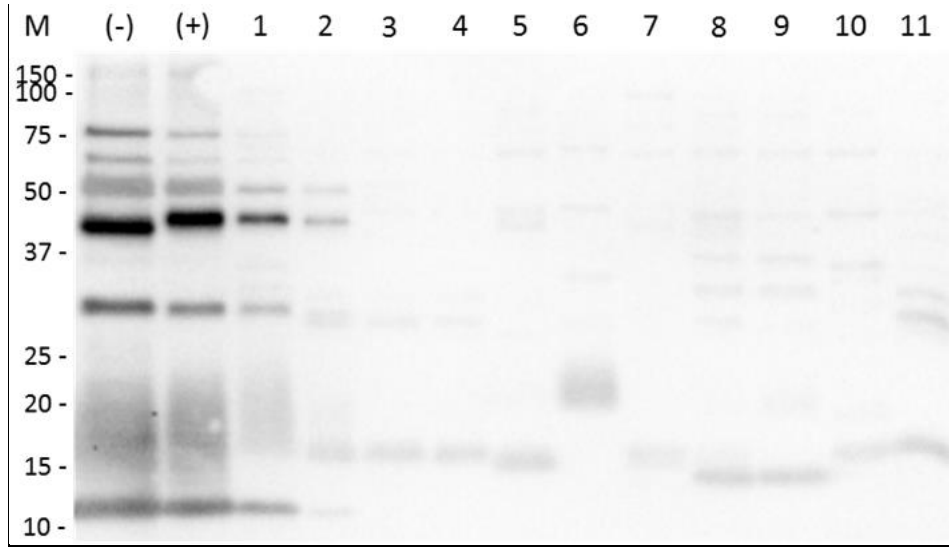
Yapılan Western Blot çalışmalarında, fragmentlerin boylarına göre 29 suş pozitif (+) kontrole (Perşembe) benzeyen paterne sahip bantlar gösterirken, 8 suşda ise negatif (-) kontrole (ATCC 49156) benzer bantlar görülmüştür. Diğer 5 suşda kontrol guruplarından farklı bantlar gözlemlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. *Lactococcus garvieae* Suşlarının Profilinin Western Blotta Perşembe ve ATCC Suşları ile Karşılaştırılması

	İzolat	Kaynak	Patern
(-)	ATCC 49156	Japonya	(-)
(+)	Perşembe	Ordu	(+)
1	1684	İspanya	(-) Benzer
2	2398	Fransa	Benzemeyen
3	M1	Muğla	(+) Benzer
4	<i>L.lactis</i>	Akdeniz	Benzemeyen
5	AA	Rize	(+) Benzer
6	225-1	Artvin	(+) Benzer
7	K9	Gümüşhane	(+) Benzer
8	8053 C/02	İspanya	(+) Benzer
9	164 A/03	İspanya	(+) Benzer
10	04/8782 FTPI	İspanya	(+) Benzer
11	04/8782 (532)	İspanya	(+) Benzer
12	04/8782 (498)	İspanya	(+) Benzer
13	04/8782 ITP109	İspanya	Benzemeyen
14	8740/03	İspanya	(+) Benzer
15	1073/03C	İspanya	(+) Benzer
16	M300	İtalya	(+) Benzer
17	A-58	İtalya	(+) Benzer
18	G-27	İtalya	(+) Benzer
19	AF-14	Rize	(+) Benzer
20	PP6O	İtalya	(+) Benzer
21	M2	Muğla	(-) Benzer
22	M3	Muğla	(-) Benzer
23	M5	Muğla	(-) Benzer
24	M4	Muğla	(-) Benzer
25	216-6	Rize	(-) Benzer
26	AA	Rize	(-) Benzer
27	512-8	Rize	(-) Benzer
28	OME	Rize	(+) Benzer
29	511-15	Rize	(+) Benzer
30	İSfk.	Rize	(+) Benzer
31	Sider-17	Rize	(+) Benzer
32	399-18	Artvin	(+) Benzer
33	BB	Artvin	(+) Benzer
34	636-16	Gümüşhane	(+) Benzer
35	671-14	Gümüşhane	(+) Benzer
36	670-20	Gümüşhane	(+) Benzer
37	673-5	Gümüşhane	(+) Benzer
38	235-16	İzmir	(+) Benzer
39	R-817	Trabzon	Benzemeyen
40	Ser114	Trabzon	Benzemeyen
41	Trb	Trabzon	(+) Benzer
42	Ard30	Rize	(+) Benzer

3.3.2. ATCC ve Perşembe Suşunun Farklı Bakteri Türleriyle Karşılaştırılması

Elde edilen serumun özgünlüğünü kontrol etmek amacıyla 11 farklı bakteri kullanılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda *Enterobacter cloacae* ve *A. hydrophila*'da (+) kontrole benzeyen patern görülürken diğer bakterilerde ise çok zayıf non-spesifik bağlanmalar görülmüştür (Şekil 15). Deney sonucunda tavşanlardan elde edilen serumun *L. garvieae*'a özgün olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 15. Western Blotta *L. garvieae* antikorunun diğer bakterilerle olan reaksiyonu. M: Marker, (-) ATCC, (+) Perşembe, 1: *Enterobacter cloacae*, 2: *Aeromonas hydrophila*, 3: *Pseudomonas fluorescens*, 4: *A. hydrophila*, 5: *Yesinia. ruckeri*, 6: *Vibrio fluvialis*, 7: *P. fluorescens*, 8: *P. putida*, 9: *Vibrio anguillarum*, 10: *Vibrio parahemaliticus*, 11: *A. hydrophila*

4. TARTIŞMA

Lactococcus genusu bünyesinde yedi tür barındırmakta olup, bunlar; *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. chungangensis*, ve *L. fujiensis* (Cai vd., 2011). Bu türler arasında sadece *L. garvieae* balıklar için patojen olup, hemorajik septisemiyaya neden olmaktadır. Aynı zamanda *L. garvieae* hem insanlardan hem de hayvanlardan izole edildiğinden hem veteriner hemde insan tıbbında klinik açıdan giderek artan bir öneme sahip zoonozpatojen olarak kabul edilmektedir. *L.garvieae*'nın patojenik mekanizması çok iyi anlaşılmasına rağmen, yapılan çalışmalar hücre yüzeyinde bulunan polisakkarid bir kapsülün balıklarda hastalık oluşturma faktörlerinden biri olduğunu göstermiştir (Aquilanti vd., 2007). Bu dayanak virüent *L. garvieae* suşlarında kapsül bulunduğu ve virüent olmayan hatta avirüent suşlarda ise kapsül bulunmamasından kaynaklanmaktadır (Aquilanti vd., 2007; Kawanishi vd., 2007). Bu çalışmada Western Blot yapmak için tavşanlarda üretilen antikör virüent *L. garvieae* Perşembe suşuna karşı geliştirilmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda kapsüle rastlanırken bazılarında da rastlanmamıştır. Klasik boyama yöntemiyle yapılan çalışmada *L. garvieae* Perşembe suşunda zayıf bir kapsül olduğu belirlenirken, *L. garvieae* ATCC 49156 suşunda kapsüle rastlanmamıştır. Genetik olarak kapsülün varlığına bakıldığında ise çalışılan hiçbir bakteride beklenen 17,322 baz çifti uzunluğunda amplifikasyon olmazken 747 baz çifti uzunluğunda amplifikasyon olmuştur. Bu sonuca göre de tüm çalışılan *L. garvieae* suşları kapsülsüz denebilir. 17,322 bazlık amplifikasyon zor olduğundan belkide amplifikasyon yapılamamış olabilir. Sonraki çalışmalarda amplifikasyon uzununu birkaç bin bazı geçmeyen spesifik primerler kullanılarak kapsül geninin varlığı mültipleks PZR ile belirlenmelidir.

Lactococcus garvieae'nin virüentliği kapsülün varlığına bağlıdır. Barnes vd. (2002) yaptıkları çalışmada gökkuşağı alabalıklarında hastalığa sebep olan bakteri suşları arasında antijenik profillerinin immünolojik gücüne göre farklılıklarını belirlemek ayrıca *L. garvieae*'nin kapsüllü ve kapsülsüz suşlarının virülanslığını incelemek amacıyla Japonya, İspanya ve Kanada'dan 5 adet *L. garvieae* ve 1 adet *Vibrio anguillarum* suşu kullanarak yaptıkları Western Blot çalışmasında izolatların baskın proteini 52 kDa seviyesinde baskın bir protein varlığını ortaya koymuşlar ve immunoglobulini (Ig) bağlayan baskın proteinlerin kapsüllü ve kapsülsüz suşlarda aynı olduğu belirlenmiştir. Kapsül varlığının

öneminin vurgulandığı çalışmada kapsüllü İspanya suşlarının yüksek derecede mortaliteye sahip olduğu, ATCC Japonya suşunun sadece bir balık öldürdüğü ve kapsülsüz Japonya suşunun ise hiç balık öldürmediği belirlenmiştir.

Lactococcosis birçok balık türünü etkileyen sistemik bir balık hastalığıdır. Hastalığın birçok ülkede görüldüğü ve yüksek mortaliteye neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle Avrupa'nın farklı ülkelerinde, araştırmacılar hastalığın epidemiyolojisi ile ilgili çok sayıda araştırma yapmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda hastalıktan korunmak için antibiyotik kullanılmış ve ticari aşilar geliştirilmiştir. Aşilar genellikle inaktif aşilar olduğu için sadece enjeksiyonla balıklara verildiğinde koruma sağlamıştır. İmmersiyon ya da yemle oral olarak verildiğinde koruma sağlamamaktadır. Diğer taraftan da hastalığın tedavisinde eritromisin yaygın olarak kullanıldığından, *L. garvieae* bu antibiyotiğe karşı direnç kazanmaya başlamıştır. Karadeniz Bölgesi'nde hastalık bir baraj gölünde ilk ortaya çıktığında izole edilen *L. garvieae* 20 mg eritromisin'e karşı hassas iken, son yıllarda aşırı antibiyotik kullanımından dolayı bakterinin hassasiyet derecesi 120 mg eritromisine çıkmıştır. Çevre kirliliğinin önlenmesi adına antibiyotik kullanımını azaltacak ve mevcut aşılara nazaran daha koruyucu aşiların geliştirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda subunit aşilar geliştirilebilir. Elde edilen veriler ışığında ve yapılan karşılaştırma sonucuna göre 25 ile 75 kDa seviyeleri arasında farklı bantlar görülmüştür. Ayrıca 37-50 kDa seviyesi arasında değişken bir bant gözlemlenmiştir ve bu bantın virülans proteinleri taşıdığı düşünülmektedir. Bu çalışmada elde edilen bir diğer değişken ve baskın proteinlerin hangi gen tarafından kodlandığı belirlenerek subunit aşı çalışmalarında kullanılabilir.

Tavşanlardan elde edilen serumun immün yanıtını görmek amacıyla yapılan deneme çalışmasında Perşembe ve ATCC suşuları kullanılmıştır, 3 farklı tavşandan alınan antikorlar karıştırılarak 1/50 1/250 ve 1/1000 olmak üzere 3 farklı titrasyon uygulanmıştır. Ön denemelerde bakteriler saflaştırılmadığında ve total protein miktarları eşit olarak yüklenmediğinde Western Blotta non-spesifik bağlanmalar olduğu görülmüştür. Bu tür istenmeyen bağlanmaların engellenmesi için asıl çalışmada bakteriler saflaştırılmış ve her bir suşun protein miktarı ölçülerek eşit miktarda kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen serumun özgünlüğünü kontrol etmek amacıyla 8 farklı bakteri türü kullanılmış, yapılan değerlendirme sonucunda *Enterobacter cloacae* ve *A. hydrophila*'da pozitif (+) kontrole benzeyen patern görülürken diğer türlerde kayda değer non-spesifik bağlanmalar görülmemiştir. Bu bağlanmaların da poliklonal proteinlerden kaynaklanan bağlanmaların

olduğu düşünölmektedir. Deney sonucunda tavşanlardan elde edilen serumun *L. garvieae*'a özgün olduğu doğrulanmıştır.

Altun vd. (2007) gökkuşağı alabalıklarında immünolojik yanıtı incelemek ve bakteri suşları arasında antijenik profillerinin immünolojik gücüne göre farklılıklarını belirlemek için Türkiye, İspanya ve İngiltere'den dokuz adet *L. garvieae* izolatı kullanarak yaptıkları Western Blot çalışmasında izolatların 30, 37, 40, 46, 52 ve 66 kDa protein bant profili oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ancak bu bantların kalitesi oldukça düşük olup nonspesifik bağlanmalar söz konusudur. Yapılan bu çalışmada ise yoğun sinyal veren bant sayısı iki ile üç arasındadır ve daha önce yapılan çalışmayla uyumlu en fazla 30 ve 37 kDa protein bandı oluşmuştur. Bu çalışmada elde edilen antikorlar diğer bakterilerle kros reaksiyona girmemişlerdir. Altun vd. (2007) yapmış oldukları Western Blot çalışmasında *L. garvieae* dışında başka bakteri kullanmadıklarından kullandıkları antikorun kros reaksiyon verip vermediği belli değildir.

Proteinlerin analizi için en fazla kullanılan yöntemlerden birisi SDS-PAGE olup proteinlerin karakterizasyonunda ve karşılaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir (Altıntaş ve Yoladığmaz, 1997). İzole edilen birçok suşun birbirleriyle karşılaştırılması, suşlar arasında ayrımı geliştirmek ve suşların teşhisinin doğruluğunu ispatlamak zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Sınıflandırmaya yönelik ilk çalışmalar genelde morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyon temel alınarak yapılmıştır. Özellikle fenotipik özellikler suşların ayrımı için yeterli olmadığından değişik metotlar geliştirilmiştir (Bağcı vd., 1991). Mikrobiyal sistematikte protein jel elektroforezi, özellikle aynı türler veya alt türlere ait suşların hücresel proteinlerin karşılaştırılması ve ayrımı için hassas bir teknik olarak yıllardır kullanılmaktadır (Nick vd., 1999).

Bu çalışmada *L. garvieae* izolatlarının genotiplendirilmesi amacıyla SDS-PAGE metodu optimize edilerek kullanılmıştır. Bu çalışmada benzerlik oranı düşük bulunan *L. garvieae* suşları toplam protein analizinde 6 kümede 36 protein tipi oluşturmuştur. Birinci kümede 13, ikinci kümede 12, dördüncü kümede 7, beşinci kümede 2, üçüncü ve altıncı kümede bir kümede toplanmıştır. Bu da suşlar arasında önemli heterojenitenin olduğunu göstermektedir. Benzerlik oranları düşük bu izolatların farklı yerlerden elde edilmesi ve bakteri suşlarının mutasyon ve benzeri bazı olaylar sonucu genetik yapılarında değişiklik olabileceğini akla getirebilir. Protein profillerinin değerlendirmesinde, 8 İspanya suşunun genel olarak A, B ve D kümesinde bulunduğu tespit edilmiştir. İtalya suşu ise A ve F kümesinde bulunmaktadır. F kümesinde de İtalya M300 tek başına bulunmaktadır ve diğer

suşlara oldukça uzak genetik mesafede durmaktadır. Bunun nedeni de bu suşun keçi peynirinden izole edilmesinden kaynaklanıyor olabilir.

Lactococcus garvieae ülkemizde ilk defa Ege Bölgesi'nden izole edilmesine rağmen, alabalık yetiştirilen diğer bölgelere de yayılmıştır. Bu yayılımın ana nedeni çiftlikler arası ve bölgeler arası kontrolsüz balık transferidir. Çünkü SDS-PAGE toplam protein profiline bakıldığında Türkiye'den izole edilen bakteriler ile yurt dışından izole edilen bakterilerin aynı ve karışık kümelerde olması bu bakterilerin birbirleriyle genetik olarak yakın olduklarını göstermektedir.

5.SONUÇLAR

Lactococcus birçok ülkede yüksek mortaliteye sebep olmuştur. (Austin, 1999) *Lactococcus garvieae*'nin işletmelerde meydana getirdiği kayıpları azaltmak için patojenlerinin teşhisi, tedavisi hakkında araştırmalar yapılsada hastalığın yayılımını engellemek ve suşlar arasındaki epidemiyolojik ilişkinin belirlenmesi bakımından ülkemizde yapılan çalışmalar yetersizdir.

Son zamanlarda moleküler metotlar ile ilgili yapılan çalışmalar daha güvenilir sonuçlar vermiştir. Bu amaçla bu çalışmada ülkemizdeki farklı bölgelerden ve dünyanın farklı ülkelerinden izole edilen ve *L. garvieae* olduğu biyokimyasal testler ve PZR ile tanımlanan 43 izolatın toplam protein izolasyonu yapıldıktan sonra SDS-PAGE tekniği kullanılarak izolatlarının genotiplendirilmesi, suşlarıntoplam protein izolasyonu yapılarak belirlenmiş ve benzerlikler karakterize edilmiştir.

Çoğaltılan bantların yoğunluğuna bağlı olarak oluşan bir ya da daha fazla bant farkı, farklı tiplerini ortaya koymaktadır. SDS- PAGE sonucuna göre *L. garvieae* suşları 8 ile 140 kDa arasında 17 ile 48 kDa 'da değişken bantlar görülmüştür. *Lactococcus garvieae* suşunun toplam protein profillerinin SDS-PAGE'de analizi sonucu 7 ile 17 arasında farklı fragmentler oluşarak 6 adet farklı küme belirlenmiştir (A-F). Bu sonuçlara göre suşlar arasında benzerlik oranlarının düşük olduğu tespit edilmiştir (\leq %40). İtalya M300 suşuda tek başına F kümesini oluşturmakta olup diğer suşlarla olan benzerlik oranı %38,9±5,3 olarak tespit edilmiştir.

İzolatlar arası benzerlik oranlarının düşük olması bu izolatların çoğunun birbirine uzak alanlardan elde edilmesi ve bakteri suşlarının mutasyon ve benzeri bazı olaylar sonucu genetik yapılarında değişiklik olabileceğini akla getirebilir. Bu tarz genetik kökenli olaylar antibiyotik kullanımını sınırlandırarak bakteri ile mücadeleyi güçleştirmekte, dolayısı ile etkenin yayılmasını kolaylaştırmaktadır.

Ayrıca bakterinin hastalığa neden olan spesifik proteinleri Western Blot metodu ile araştırılmış ve çalışmada İspanya, İtalya, Fransa, Japonya suşları ile Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden izole edilen suşlar kullanılmıştır. Bu metoda göre izolatlar pozitif kontrole benzeyenler, negatif kontrole benzeyenler ve her ikisinden farklı olanlar olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Japonyadan izole edilen ve non- virulent olduğu bilinen ATCC 49156 referans suşuna İspanya (1684), Muğla (M2, M3, M1, M4) ve Rize (216-6, AA. 512-8)

suşlarının benzediği; Trabzon (R-817, Ser14/deniz) , İspanya (04/8782 ITP109), *L. Lactis* ve Fransa (2398) suşlarının referans suşlardan farklı olduğu diğer suşların ise virülans olduğu bilinen Perşembe suşuna benzediği ve toplam suşların 29'nun (+) kontrole, 8'nin (-) kontrole benzediği 5'nin ise farklı paternde bantlara sahip olduğu görülmüştür. Yapılan karşılaştırma sonucunda 37-50 kDa seviyesi arasında değişken bir bant gözlemlenmiş ve bu bandın virülans proteinleri taşıdığı düşünülmektedir.

6. ÖNERİLER

Su ürünleri yetiştiriciliği, hızla gelişen ve dünya besin gereksiniminin önemli kısmını karşılayan temel bir sektördür. Gerçekleşen yoğun yetiştiricilik faaliyetleri sonucunda hastalıkların ortaya çıkması üretimi sınırlandıran en önemli sorunların başında gelmektedir. Ayrıca hastalıkların tedavisinde kullanılan aşular genellikle inaktif aşular olduğu için sadece enjeksiyonla balıklara verildiğinde koruma sağlamıştır immersiyon ya da yemle oral olarak verildiğinde koruma sağlamamaktadır. Diğer taraftan, tedavide kullanılan antibiyotiğe karşı *L. garvieae* direnç kazanmaya başlamış ve hastalık yayılmaya başlamıştır. Bu bağlamda farklı bölgelerden elde edilen bu suşların protein profillerinin belirlenmesi, toplam protein profillerinin karşılaştırılması ve antijenik genlerinin kodladığı protein profillerinin belirlenmesine yönelik yapılan bu tez çalışması önemli sonuçlar ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar ışığında, su ürünleri yetiştiriciliği yapan işletmelere, konu ile ilgili bilimsel çalışmalar yürüten araştırmacılara ve yeni yasal düzenlemelere katkı sağlayabilecek öneriler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. Western Blot metodu ile antijenik genlerinin kodladığı immunodominat proteinin sonraki çalışmalarda ileri karakterizasyonu yapılabilir ve bu genlerin nerelerde lokalize olduğu belirlenebilir.
2. Çalışmada tesbit edilen immunodominat protein genleri klonlanarak, rekombinant olarak üretilip deney hayvanlarına verilir hayvanlardan monoklonal antikor üretilir.
3. Bu çalışma sonucunda immunodominant olarak baskın olduğu düşünülen protein genetik olarak mutasyona uğrattırılıp virülanslığın bu genden kaynaklanıp kaynaklanmadığına bakılabilir.
4. Balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen direnç ilerde bakteriyel hastalıkların tedavisinde zorluklar yaşanacağını göstermektedir bu nedenle hastalıklarla mücadelede koruyucu subunit aşı çalışmaları yapılabilir.
5. Yapılan çalışmalarda virülanslığın kapsül geniyle ilişkili olduğu belirtilse de yaptığımız çalışmalara göre balıklarda hastalık yaptığı bilinen *L.garvieae*'da kapsüle rastlanmadığı görüldü. Yeni çalışmalarda hastalığın kapsül geniyle ilişkisi incelenebilir.

6. Sonraki çalışmalarda amplifikasyon ürünü birkaç bin bazı geçmeyen spesifik primerler kullanılarak kapsül geninin varlığı mütipleks PZR ile belirlenmelidir.
7. *Lactococcus garvieae* suşaları arasında benzerlik oranları düşük izolatların farklı yerlerden elde edilmesi, bakteri suşlarının mutasyon ve benzeri bazı olaylar sonucu genetik yapılarında değişiklik olup olmadığını akla getirmektedir. Bu neden de suşların genetiği araştırılıp karşılaştırılabilir.
8. *Lactococcus garvieae* ve benzeri hastalık etmenlerinin yayılmasında en önemli etken olan balık hareketlerinin mümkünse Tarım Bakanlığı ya da üniversiteler kontrolünde olmalıdır. Büyük çapta üretim yapan işletmeler sertifikalandırılmalı ve diğer üreticiler hastalıktan sertifikalı yavru ve yumurta alımı konusunda bilgilendirilmelidir.
9. Yetiştiriciler, üretimdeki en önemli maddi kayıp nedenlerinden biri olan balık hastalıkları konusunda bilinçli olmalı, bünyesinde ya da yakınında ki uzmanlar ile iletişim halinde olmalıdır.
10. Benzer çalışmalar mortalitesi yüksek diğer balık hastalıklarında da uygulanmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- Aquilanti, L., Garofalo, C., A. Osimani, Silvestri, G., Vignaroli, C., ve Clementi, F., 2007. "Isolation and molecular characterization of antibiotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine meat products," Journal of Food Protection, 70, 3, 557–565.
- Aguirre, M. ve Collins, MD., 1993. Lactic Acid Bacteria and Human Clinical Infection.
- Alfonso, A., Joana, C.R., Silva, J. ve Gomes, S., 2003. *Lactococcus garvieae* trout infections in Portugal: A new challenge on fish vaccinology, IBMC News, 7, 4-5.
- Altınok, I., Grizzle, J.M. ve Liu, Z., 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in Rainbow Trout Blood by Use of Polymerase Chain Reaction, Dis. Aquat. Org., 44,29-34.
- Altınok, I., 2011. Multiplex PCR Assay for Detection of Four Major Bacterial Pathogens Causing Rainbow Trout Disease. Dis. Aquat. Org., 93, 199–206.
- Altınok, I. ve Ozturk, R.C., 2014. Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences., 14, 275-297.
- Altıntaş N. ve Yolaşğmaz A., 1997. Proteinlerin analizi ve SDS-PAGE. Özcel MA, Altıntaş N. ed. Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No, 15 İzmir. 321-341.
- Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A., Diler, O., Delibas, N. ve Sutcu, R. 2007. Immunogenic and Antigenic Profiles of Nine *Lactococcus garvieae* Strains from Different Rainbow Trout Farms. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 59,2, 111-116.
- Altun, S., Adiloğlu,A.K.,Kubilay,A.,Diler,O.,Delibas,N. ve Sutcu,R., 2007. Immunogenic and Antigenic Profiles of Nine *Lactococcus garvieae* Strains from Different Rainbow Trout Farms, Faculty of Fisheries, Department of Aquaculture, Suleyman Demirel University, 32500, Egirdir, Isparta, Turkey.
- Arda, M., 1997. Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayın, 25 Ankara, 490.
- Aslan, A., 2006. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Proteinlerin Analizi, Yüksek Lisans Semineri, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Elazığ.
- Austin, B. ve Austin, D.A., 1999. Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish, Third (Revised) Edition, Praxis Publishing Chichester, U.K., Appl. Bacteriol., 75, 95–107.

- Bağcı, H., Shareef, S.R. ve Özdamar, K., 1991. *Bacillus thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması, Doğa Tr of Biology 5, 70-81.
- Bark, S. ve Mc Gregor, D., 2001. The First Occurrence of Lactococcosis in Farmed Trout in England. Trout News, 31, 9–11.
- Barakat, R.K., Griffiths, M.W. ve Haris, L.J., 2000. Isolation and Characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus spp.* from Cooked, Modified Atmosphere, Packaged, Refrigerated, Poultry Meat. Int. J. Food Microbiol., 62, 83–94.
- Barnes A.C., Guyot C., Hansen B.G., Mackenzie K., Horne M.T. ve A.E. Ellis, 2002. Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *FishShellfish Immunol.*, 12, 2, 155-168.
- Bercovier, H., Ghittino, C. ve Eldar, A., 1997. Immunization with Bacterial Antigens: Infection with *Streptococci* and Related Organisms. Dev. Biol. Stand., 90, 153–160.
- Cagirgan, H., 2004. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 21, 3-4, 267-269.
- Cai, Y., Yang, J.H. Pang ve M. Kitahara, 2011. “Lactococcus fujiensis sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter,” International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, 7, 1590–1594.
- Chen, S.C., Lin, Y.D., Liaw, L.L. ve Wang, P.C., 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., Liu, C.H. ve Chen, J.C., 2002. Effect of Nitrite on Interaction Between The Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its Pathogen *Lactococcus garvieae*. Dis. Aquat. Org., 50, 189–197.
- De Kinkelin, P., Michel, C.H. ve Ghittino, P., 1991. Tratado de Las Enfermedades de Los Peces, Editorial Acribia, Zaragoza.
- Diler, O., Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A. ve Işıklı, B., 2002., First Occurrence of *Streptococcosis* Affecting Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 22, 21–25.
- Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C. ve Zlotkin, A., 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Fish in Europe, Asia, and Australia. Applied and Environmental Microbiology, 1005–1008.

- Eldar, A. ve Ghittino, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Similar but Different Diseases. *Dis. Aquat. Org.*, 36, 227–231.
- Eldar, A., Horovitz, A. ve Bercovier, H., 1997. Development and Efficacy of a Vaccine against *Streptococcus iniae* Infection in Farmed Rainbow Trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 56, 175–83.
- Eldar, A., Shapiro, O., Bejerano, Y. ve Bercovier, H., 1995. Vaccination with Whole-cell Vaccine and Bacterial Protein Extract Protects Tilapia against *Streptococcus Difficile* Meningoencephalitis. *Vaccine*, 13, 867–870.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bvozzetz, E. ve Gorla, M., 1996. *Enterococcus seriolicida* is a Junior Synonym of *L. garvieae*, a Causative Agent of Septicemia and Meningoencephalitis in Fish. *Curr. Microbiol.*, 32, 85–88.
- Eliot, J.A., Collins, M.D., Pigott, N.E. ve Facklam, R.R., 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from Humans by Comparison of Whole-cell Protein Patterns. *J. Clin. Microbiol.*, 20, 2731–2734.
- Fukuda, Y., Maita, M., Satoh, K. ve Okamoto, N., 1997. Influence of Dissolved Oxygen Concentration on The Mortality of Yellowtail Experimentally Infected with *Enterococcus seriolicida*. *Fish Pathol.*, 32, 129–130.
- Ghittino, C. ve Prearo, M., 1992. Report of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy, *Boll. Soc. Patol. Ittica.*, 8, 4–11.
- Ghittino, C. ve Muzquiz, J.L., 1998. La *Estreptococosis* de la Trucha Arco Iris en Espana.
- Ghittino, C., 1999. La *Estreptococosis* en Los Peces. *Rev. Aquatic*. “Biochemical Identification of Meat Species” R.L.S. Patterson (Ed). Elsevier Applied Science Publishers Ltd., England, 40–49.
- Hirono, I., Yamashita, H., Park, C.I., Yoshida, T., Aoki, T., 1999. Identification of genes in a KG—phenotype of *Lactococcus garvieae*, a fish pathogenic bacterium, whose proteins react with antiKG—rabbit serum. *Microb. Pathog.* 27, 407–417.
- Høyem T ve Thorson B., 1970. Myoglobin Electrophoretic Patterns in Identification of Meat From Different Animal Species. *J. Agr. Food Chem.* 18, 737–742.
- Işdan H ve Bolat Y., 2011. A Survey of Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 11, 507–513.
- Katao, H., 1982. Erythromycin: The Application to *Streptococcal* Infections in Yellowtails. *Fish Pathol.*, 17, 77–82.

- Kitao, T., Aoki, T. ve Iwata, K., 1979. Epidemiological Study on *Streptococcosis* of Cultured Yellowtail. Distribution of *Streptococcus spp.* In Sea Water and Muds Around Yellowtails Farms. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 45, 567–572.
- Kitao, T., 1982. The Methods for Detection of *Streptococcus sp.* Causative Bacteria of *Streptococcal* Disease of Cultured Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Fish Pathol., 17, 17–26.
- Kusuda, K., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. ve Fryer, J.L., 1991. *Enterococcus seriolicida sp. nov.*, a Fish Pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 406–409.
- Kusuda, K. ve Hamaguchi, M., 1989. Determination of The Median Lethal Dose of Cell-Associated Toxins from *Streptococcus sp.* in The Yellowtail. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 9, 117–128.
- Kav, K. ve Erganiş, O., 2007. Konya Bölgesinde Bulunan Gökkuşığı Alabalığı (*Onchyrnus mykiss*) Çiftliklerinden *L. garvieae* İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi. Vet. Bil. Derg., 23,3, 7-17.
- Kawahara, E. ve Kusuda, R., 1987. Direct Fluorescent Antibody Technique for Diagnosis of Bacterial Diseases in Eel. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 395–399.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Kijima M., 2007. “Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG+ phenotype, lack of virulence and absence of a capsule,” Letters in Applied Microbiology, 44, 5, 481–487.
- Mata, A.I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M., Dominguez, L. ve Fernandez-Garaizabal, J.F., 2004. Multiplex PCR Assay for Detection of Bacterial Pathogens Associated with Warm-Water Streptococcosis in Fish. Appl. Environ. Microbiol., 70, 3183–3187.
- Morita H., Toh H., Oshima K., Yoshizaki M., Kawanishi M., 2011. Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Fish Pathogen *Lactococcus garvieae*. PLoS ONE., 23184-10,1371.
- Muzquiz, J.L., Royo, F.M., Ortega, C., de Blas, I., Ruiz, I. ve Alonso, J.L., 1999. Pathogenicity of Streptococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Dependence of Age of Diseased Fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 19, 114–119.
- Munday, B.L., 1994. Fish. In: Coopert SB, editor. Antimicrobial Prescribing Guidelines for Veterinarians: a Post Graduate Foundation Publication. University of Sydney, Australia, In association with the National Health and Medical Research Council, 305–325.

- Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B.D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M. ve Lindstrom, K., 1999, *Sinorhizobium arboriz* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from Leguminous trees in Sudan and Kenya, *Int. Syst. Bacteriol.*, 49, 1359-1368.
- Okada, T., Minami, T., Ooyama, T., Yasuda, H. ve Yoshida, T., 2000. Capsular and non-capsular antigen localization on *Lactococcus garvieae* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish. Sci.*, 66, 992–994.
- Ooyama, T., Kera, A., Okada, T., Inglis, V. ve Yoshida, T., 1999. The protective immune response of yellowtail *Seriola quinqueradiata* to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Dis. Aquat. Org.* 37, 121–126.
- Ooyama, T., Hirokawa, Y., Minami, T., Yasuda, H., Nakai, T., Endo, M., Ruangpan, L. ve Yoshida, T., 2002. Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis. Aquat. Org.* 51, 169–177.
- Pekmez, N., 2008. Dispeptik hastalarda elisa ve Western Blot yöntemleri ile *Helicobacter pylori* 'nin antijenik varyasyonlarının araştırılması.
- Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A.E. ve Romalde, J.L., 2004. *Lactococcus garvieae*, an Emerging Pathogen for The Portuguese Trout Culture. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 24, 274–279.
- Prieta, J., Domenech, A.M., Fernandez-Garaizabal, J.F., Collins, M.D., Rodrigues, U.M. ve Jones, D., 1993. Lactococcosis De la Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Med. Vet.*, 10, 367–373.
- Ravelo, C., Magarinos, B., Romalde, J.L. ve Toranzo, A.E., 2001. Convencional versus Miniaturizad Systems for The Phenotypic Characterization of *Lactococcus garvieae* Strains. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, 21, 136–144.
- Romalde, J.L., 2004. Present and Future of Aquaculture Vaccines against Fish Bacterial Diseases. In: Seminario Internacional Enfermedades Emergentes En la Acuicultura. Chile: Puerto Varas.
- Robinson, J.A. ve Meyer, F.P., 1996. Streptococcal Fish Pathogen. *J. Bacteriol.*, 92, 512.
- Soltani, M., Nikbakht, G., Mousavi, H.A.E. ve Ahmadzadeh, N., 2008. Epizootic outbreaks of *Lactococcus garvieae* in rainbow trout in Iran, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 28, 5, 207.
- Stott DI, 1989. Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Methods*, 119: 153-187
- Tanrikulu, T.T. ve Gultepe, N., 2011. Mix infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): *Lactococcus garvieae* and *Vibrio anguillarum* O1. *J. Animal Vet. Adv.*, 10, 8, 1019-1023.

- Türe,M. ve Savaş, H., 2010. *Lactococcus garvieae*'nin Genetik Çeşitliliğinin ve Yayılımının Belirlenmesi Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Proje Sonuç Raporu Trabzon-2010.
- Türe, M., 2014. Antimicrobial resistance gene profiles of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish., central fisheries research institute,department of fish health,61250,Trabzon-2014.
- Tokşen E.,2008. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, İzmir, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32, 4, 386 – 389.
- Tsai,A., Wang, C., Yoshida,T., Liaw, L. ve Chen,S.,2013. Development of a sensitive and specific LAMP PCR assay for detection of fish pathogen *Lactococcus garvieae* 54-46.
- URL-1, <http://www.tuik.gov.tr> Su Ürünleri İstatistikleri.15 Ekim 2014.
- URL-2, <http://www.biyolojidersnotlari.com> Gram Pozitif Bakteriler. Nisan 2013.
- Ürkü,Ç., 2011. ‘Gökkuşacağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*,W.) Deneysel olarak oluşturulan *Lactococcosis*'in Bakteriyolojik ve Serolojik Metotlarla Teşhis’, Yüksek Lisans Tezi.,İ.Ü.Fen Bilimleri Enst.İstanbul.
- Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, P., Riaza, A., Nunez, S. ve Barja, J.L., 1994. Streptococcosis in Cultured Turbot Caused by an *Enterococcus*-like Bacterium. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 14, 19–23.
- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A. ve Liebana, P.,2000. Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from *Lactococcosis* Outbreaks in Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. J. Clin. Microbiol., 38, 3791–3795.
- Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. ve Moschetti, G., 2001. Detection and Characterization of a Bacteriocin, Garviecin L. 1-5, Produced by *Lactococcus garvieae* Isolated from Raw Cow's Milk. J. Appl. Microbiol., 90, 430–439.
- Venderell, D., 2006. "Lactococcus garvieae in fish: A review.". Comparative Immunology, Microbiology, and Infectious Diseases. 29, 177–198.
- Vendrell, D., Balcazar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Girones, O. ve Muzquiz, J.L., 2004. Evaluation in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) of Ichtiovac-Lg, a Vaccine against *Lactococcus garvieae*. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Fish Immunology.
- Vendrell, D., Balcazar, J.L., Zarzuela, I.R., Blas, I., Girones, O. ve Muzquiz, J.L., 2006. Laboratory of Fish Pathology, Department of Animal Pathology, University of Zaragoza, C/. Miguel Servet 50013, 177.

- Yasunaga, N., 1982. Occurrence of *Streptococcus sp.*, A Pathogen of Cultured Yellowtail, in Muscle of Sardine for Diets. *Fish Pathol.*, 17, 195–198.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. ve Bercovier, H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 983–985.
- Wang, C.Y.C., Shie H.S., Chen, S.C., Huang, J.P., Hsieh, I.C., Wen, M.S., Lin, F.C. and Wu, D., 2006. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with Aquaculture outbreaks. *J. Clin. Pract.*, 10, 1-5.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Erzurum'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2007-2008 öğretim yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünde lisans öğrenimine başladı ve 2011 yılında bu fakülteden mezun oldu.

2011-2012 öğretim yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Yüksek lisans eğitimi süresince Fen Bilimleri Enstitüsü'nden burs aldı. İngilizce bilmektedir.