



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİK-D-2013-0001

**ALABALIKLARDA GÖRÜLEN STREPTOKKOSİS
VAKALARI İLE İLİŞKİLİ BAKTERİYEL PATOJENLERİN
MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (mPCR)
İLE TANIMLANMASI**

Uzm. Su Ürünl. Müh. Saadet GÜRPINAR

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Şükrü KIRKAN**

AYDIN - 2013

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK-D-2013-0001**

**ALABALIKLARDA GÖRÜLEN STREPTOKKOSİS
VAKALARI İLE İLİŞKİLİ BAKTERİYEL PATOJENLERİN
MULTİPLEKS POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (mPCR)
İLE TANIMLANMASI**

Uzm. Su Ürün. Müh. Saadet GÜRPINAR

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Şükrü KIRKAN**

AYDIN - 2013

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Uzm. Su Ürünleri Müh. Saadet GÜRPINAR tarafından hazırlanan "Alabalıklarda Görülen Streptokokkosis Vakaları ile İlişkili Bakteriyel Patojenlerin Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mPCR) ile Tanımlanması" başlıklı tez, 24/05/2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof. Dr. Osman KAYA

ADÜ, Veteriner Fakültesi

2- Prof. Dr. Ferda AKAR

ADÜ, Veteriner Fakültesi

3- Prof. Dr. K. Serdar DİKER

AÜ, Veteriner Fakültesi

4- Doç. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

5- Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
..... sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Dünyada birçok ülkede su ürünlerinden balık kolay sindirilebilir, kolay ulaşılabilir ve diğer protein kaynaklarına göre daha ucuz olması nedeniyle tercih edilen bir besindir. Kültür balıkçılığı, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de doğal kaynakların sürdürülebilmesi açısından önem kazanmış olup, hızla gelişen sektörlerden biri olmuştur. Kültür balıkçılığı faaliyetleri, Dünya’da son 30 yılda hızlı bir büyüme göstermiş olup, denizlerde ve iç sularda yapılan toplam kültür balıkçılığı faaliyetleri 2006 yılında 43.7 milyon ton iken 2011 yılında 63.6 milyon tona ulaşmıştır.

Ülkemizde olduğu gibi Dünya çapında da iç su ve denizlerde en fazla yetiştiriciliği yapılan balık türü Kuzey Amerika kökenli Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792)’dir. Kültür balıkçılığı endüstrisi, gram pozitif bakteriyel patojenlerin neden olduğu infeksiyonlar yüzünden ekonomik kayıplara uğramaktadır. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan önemli bakteriyel infeksiyonlardan Streptokokkal infeksiyonlar, ilk kez Japonya’da 1958 yılında rapor edilmiştir.

Klasik metotlarla bakteriyel patojenlerin teşhis ve identifikasyon, türler arasındaki yüksek benzerlik nedeniyle çok çeşitli biyokimyasal testlerin uygulanmasını gerektirmekte, bu testlerin uzun prosedürleri teşhiste, işgücü ve zaman kaybına neden olmaktadır. Moleküler tekniklerin gelişmesi ve kullanılmasıyla, teşhiste hız kazanılmış ve birbirine çok benzer özellikteki türlerin ayrımının kesin olarak yapılması imkanı sağlanmış, kontrol ve koruma önlemlerinin biran önce alınabilmesi imkanını sağlamıştır. Balık patojenlerinin identifikasyonu için günümüzde yaygın olarak kullanılan ve oldukça güvenilir olan bir diğer yöntem ise PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniğidir. Özellikle multipleks (çoklu) PCR’ın gelişmesi ile aynı anda birkaç farklı patojenin tespiti sağlanmıştır.

Streptokokkosis Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) yetiştiriciliğinde toplu ölümlerle ekonomik kayıplara neden olan önemli bir bakteriyel hastalıktır. Bu çalışmada, Streptokokkosis hastalığının bilinen başlıca etkenlerinden *Streptococcus inae*, *Streptococcus difficilis*, *Streptococcus parauberis* ve *Lactococcus garvieae*’nin multipleks PCR yöntemi ile teşhisinin yapılması hedeflenmektedir. Araştırmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilisel Araştırma Projeleri tarafından VTF-12015 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM	11
2.1. Gereç	11
2.1.1. İzolasyon Örnekleri	11
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Solusyonlar, Ayıraçlar	11
2.1.2.1. Besiyerleri	11
2.1.2.1.1. İzolasyon Besiyeri	11
2.1.2.1.1.1. Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458)	11
2.1.2.2. Solusyonlar	11
2.1.2.2.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer	12
2.1.2.2.2. Gel Loading Buffer (6X)	12
2.1.2.2.3. Tris (1M)	12
2.1.2.2.4. NaCl (1M)	12
2.1.2.2.5. TE Buffer (10mM tris + 1mM EDTA)	13
2.1.2.3. Ayıraçlar	13
2.1.2.3.1. Katalaz	13
2.1.3. PCR	13
2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar	13
2.1.3.2. MgCl ₂ , Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set	13
2.1.3.3. Primerler	14
2.1.4. Elektroforez Cihazı	14
2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı	14
2.1.4.2. Marker	15
2.1.4.3. Etidyum Bromür	15
2.1.4.4. Pozitif Kontrol	15
2. 1.5. DNA Ekstraksiyon Kiti	15

2. 2. Yöntem	15
2. 2.1. Örneklerin Alınması	15
2.2.2. <i>Streptococcus spp.</i> ve <i>Lactococcus spp.</i> İzolasyonu	16
2.2.3. DNA İzolasyonu	16
2.2.2.1. PCR	17
2.2.2.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	18
2.2.2.3. Jelde Yürütme	18
2.2.2.4. Görüntüleme ve Değerlendirme	18
3. BULGULAR	20
3.1. İzolasyon Bulguları	20
3.2. PCR Bulguları	20
4. TARTIŞMA	23
5. SONUÇ	27
ÖZET	28
SUMMARY	29
KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	39
TEŞEKKÜR	40

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Multipleks PCR amplifikasyonlarında kullanılan primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları	14
Çizelge 2.2.	Mastermiks hazırlanma oranları	17
Çizelge 2.3.	PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	18
Çizelge 3.1.	Multipleks PCR Çalışması Sonunda İzole Edilen Türler	21
Çizelge 3.2.	İzolatların Çiftlik Bazında Dağılımı	22
Çizelge 3.3.	İzolatların Çiftlik Bazında Yüzde Dağılımları	22

ŞEKİLLER

Şekil 3.1

Multipleks PCR pozitif örneklerin elektroforez görüntüsü

21

1. GİRİŞ

Su ürünleri, besin bileşenlerinin incelenmesi ve besin maddelerinin insan sağlığı üzerindeki etkisinin bilinmesi ile önemli bir protein kaynağı haline gelmiştir (Turan ve ark. 2006). Dünya’da birçok ülkede su ürünlerinden kolay sindirilebilir, kolay ulaşılabilir ve diğer protein kaynaklarına göre daha ucuz olması nedeniyle tercih edilen bir besindir (Arda ve ark. 2005). Kültür balıkçılığı, tüm Dünya’da olduğu gibi ülkemizde de doğal kaynakların sürdürülebilmesi açısından önem kazanmış olup, hızla gelişen sektörlerden biri olmuştur (Korkut ve ark. 2007).

Su ürünleri yetiştiriciliği, insanlar tarafından besin olarak tüketilmesi, istihdam oluşturması, sanayiye ham madde temini ve yüksek ihracat potansiyeli ile ülke ekonomisine katkısı açısından oldukça önemlidir (Karaman ve Yeşilayer 2012). Kültür balıkçılığı faaliyetleri, Dünya’da son 30 yılda hızlı bir büyüme göstermiş olup, denizlerde ve iç sularda yapılan toplam kültür balıkçılığı faaliyetleri 2006 yılında 43.7 milyon ton iken 2011 yılında 63.6 milyon tona ulaşmıştır (FAO 2012).

Ülkemiz, denizleri, iç su kaynakları ve iklimsel özellikleriyle kültür balıkçılığı açısından elverişli yetiştiricilik alanlarına sahiptir. Denizlerin yanı sıra göl, gölet, baraj gölü ve akarsu kaynaklarına sahip ülkemizde 25 milyon hektarlık su kaynakları ile verimli kültür balıkçılığı alanları bulunmaktadır (DTP 2013). Türkiye’de kültür balıkçılığı ile ilgili faaliyetler, 1969’lu yıllarda Gökkuşluğu alabalığı yetiştiriciliği ile başlamıştır (Türkmen ve ark. 2012, Arda ve ark 2005). 2011 yılı su ürünleri istatistiklerine göre, Türkiye’de toplam balık üretiminin % 26.8’i yetiştiricilik faaliyetleri elde edilmektedir. Bu oranın tür bazındaki dağılımına bakıldığında, en yüksek yetiştiricilik iç sularda, toplam üretimin %53.1’i ile alabalık oluşturmaktadır. Alabalığı % 24.9 ile levrek, %17.0 ile çipura takip etmektedir (TÜİK 2011).

Ülkemizde olduğu gibi Dünya çapında da iç su ve denizlerde en fazla yetiştiriciliği yapılan balık türü Kuzey Amerika kökenli Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792)’dir (Fitwi ve ark. 2012, Karaman ve Yeşilayer 2012, Atasever ve Bozkurt 2011, Korkmaz ve ark. 2008). Dünya’da ve Türkiye’de Gökkuşluğu alabalığı yetiştiriciliğinde genellikle üç farklı üretim tekniği kullanılmaktadır. Birincisi ekstansif; az yoğun yetiştiricilik örnek olarak midye yetiştiriciliği verilebilir. Bu tip yetiştiricilikte stok yoğunluğu düşük, su akışı ise fazladır. İkincisi, yarı entansif; yarı yoğun yetiştiricilik

sistemidir. Örnek olarak sazan balığı yetiştiriciliği verilebilir. Üçüncüsü entansif; yoğun sistemdir. Örnek olarak alabalık, çipura, levrek, salmon ve karides üretiminde kullanılan sistem verilebilir. Entansif yetiştiricilikte öncelikli olarak artan stok yoğunluğu ile balıkların yaşamı için uygun çevre koşullarının sağlanması amacıyla daha fazla oranda bir ekipman kullanımı dikkati çekmektedir (Fitwi ve ark. 2012, Atamanalp ve ark. 2007).

Karada yapılan entansif alabalık üretim çiftlikleri son yıllarda hızla fazlalaşarak sektörel bazda büyümesini arttırmıştır. Pazarın üreticiden yüksek kalitede balık talebi, bilimsel ve biyoteknolojik gelişmelerin izlenerek yetiştiricilik tekniklere yansıtılmasına ve bu alanda yapılan araştırmaların artmasına neden olmuştur (Karaman ve Yeşilayer 2012, Korkmaz ve ark. 2008).

Alabalık yetiştiriciliğinde dikkat edilmesi gereken önemli unsurlardan biri su sıcaklığıdır. Yetiştiriciliği yapılan suyun ısısı yaz-kış dönemlerinde yüksek değişimler göstermemeli ve 20°C'yi geçmemelidir. Kuluçka ve yavru dönemlerinde 7-13°C, büyüme döneminde 12-18°C ideal sıcaklıklardır. Bir diğer önemli parametre, oksijen miktarıdır. Sudaki oksijen miktarı 9 mg/l veya daha fazla olmalıdır. Önemli parametrelerden bir diğeri CO₂ miktarı ise, 25-30 ppm'i geçmemelidir. Suyun PH değeri 7.0- 8.5 arasında olmalı, sudaki amonyak birikimi önlenerek 0.25ppm'i geçmemesi sağlanmalıdır. Sudaki demir iyonu (Fe⁺⁺) ve bileşikleri 2.0 ppm, bakır iyonu (Cu⁺⁺) ve bileşikleri 1.0 ppm, kurşun iyonu (Pb⁺⁺⁺) ve bileşikleri 0.5 ppm'den yüksek olmamalıdır. Su berrak olmalı, içerisindeki süspansiyon maddelerin oranı 25 ppm'in altında olmalıdır (Akbulut ve Keten 2001). Gökkuşığı alabalıkları tatlı su ya da deniz suyunda yetiştiriciliği yapılabilen bir türdür (Shao 2001).

Kültür balıkçılığında hastalık yönetimi, balık türlerinin sağlıklı olarak yetiştirilmesi ve üretimi için önemlidir (Kohyani ve ark. 2011). Balıklarda hastalıkların şekillenerek gelişimi, konakçı, patojen ve çevre etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır (Toranzo ve ark. 2005). Balıklarda bakteriyel infeksiyonların nedenleri düşük ve değişken su kalitesi, havuzlardaki entansif yetiştiricilik koşulları, mevsime bağlı olarak değişen su sıcaklıkları ve yetersiz beslenmeye bağlı strestir (Dias ve ark. 2012, Altınok ve Kurt 2003). Mevcut taksonomik gruplarda, patojenik türlerin çoğunun tarif edilmiş olmasına rağmen, Dünya çapında, bu türlerden sadece küçük bir bölümünün önemli ekonomik kayıplardan sorumlu olduğu bilinmektedir (Pereira ve ark. 2011). Bu nedenle infeksiyonlara karşı kontrol ve korunma yöntemleri giderek önemini arttırmaktadır (Arda ve ark. 2005). Gökkuşığı

alabalığı üretiminde toplam maliyetlerin %10'luk bir bölümünü, doğrudan balık ölümleri oluşturmaktadır. Bu maliyetlerin içinde terapötik ilaçlar ve aşılarda bulunmaktadır (Georgiadis ve ark. 2001).

Kültür balıkçılığında kayıplarla sonuçlanan infeksiyöz hastalıklara, viruslar, mantarlar, parazitler ve bakteriler neden olmaktadır (Shao 2001). Alabalık kuluçkahanelerinde epizootik karakterdeki mantar infeksiyonlarına neden olan önemli etkenler, *Saprolegnia parasitica* ve *Saprolegnia invaderis* olarak sıralanabilir (Yılmaz ve ark. 2011).

Alabalıklarda görülen önemli viral hastalıklar, infeksiyöz pankreatik nekrozis virüsü (IPNV) ve infeksiyöz hematopoietik nekrozis virüsü (IHNV) tarafından oluşturulur (Yılmaz ve ark. 2011, Wiens ve ark. 2013).

Viral infeksiyonların ortaya çıkmasında en önemli etken su sıcaklığıdır. IPNV infeksiyonu genellikle su sıcaklığı 15 °C'nin altına düştüğünde ortaya çıkmaktadır. Klinik olarak hasta balıklarda rengin kararması, abdomenin belirgin olarak şişmesi ve zikzak çizerek yüzme davranışı, pankreasta nekrotik odaklar, dalak karaciğer ve solungaçlarda solgunluk, anüste yangı ve ventral bölgede kanamalar görülür (Wiens ve ark. 2013, Yılmaz ve ark. 2011).

IHNV infeksiyonu, alabalıklarda hematopoietik dokuların nekrozu ile karakterize akut ve subakut seyirli viral bir infeksiyondur ve su sıcaklığının 8-10 °C'ye düştüğü zamanlarda ortaya çıkar. Deride koyulaşma, abdomende, gözün içinde ve pupilla etrafında hemorajiler görülür (Yılmaz ve ark. 2011). Balıklarda görülen viral infeksiyonların antibiyotik ve kemoterapotik ilaçlarla tedavisi mümkün değildir. Bu sebeple bu tip hastalıklarda, çevre koşullarının optimizasyonu ve hijyenin sağlanması gibi korunmaya yönelik alınan önlemler en etkin mücadele yöntemleridir (Wiens ve ark. 2013).

Kültür balıklarında hastalık direncinde stres önemli bir etkidir. Bu bağlamda genellikle göz ardı edilen ve tanımlanamayan subklinik infeksiyonlar, üretimde kayıplara neden olurken, antibiyotik kullanımıyla yüksek tedavi maliyetlerinin nedenidir (Kapetanovic ve ark. 2005). Kültür balıklarında önemli infeksiyonlara neden olan gram negatif bakteriyel patojenler, *Aeromonas hydrophilia*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum*, *Flavobacterium*

psychrophilum ve *Yersinia ruckeri* olarak sıralanabilir (Kapetanovic ve ark. 2005, Yılmaz ve ark. 2011, Shao 2001).

Aeromonas salmonicida kültür balıkçılığında yüksek morbidite ve mortalite oranları ile ekonomik kayıplara neden olan ve frunkulozis hastalığı etkeni olarak bilinen majör patojenlerden biridir (Rattanachaikunsopon ve ark. 2012). Hastalığın akut formunda iç organlarda hemorajiler, deride nekrotik lezyonlar, ile hızlı gelişen septisemi sonucu kayıplar meydana gelir (Burr ve ark. 2005). *Aeromonas hydrophila*, alabalık ve salmon balıklarında bakteriyel hemorajik septisemiye neden olan bir diğer önemli etkindir (Meyer, 1991).

Vibrio anguillarum kültür balıklarında Vibriosis hastalığı etkeni olan önemli bir patojendir (Norqvist ve ark. 1989). Vibriosis hastalığından etkilenen türler arasında Gökkuşığı alabalıkları, levrek ve kalkan balığı bulunmaktadır (Vigneulle ve Laurencin 1991).

Salmonidlerin fry sendromu veya soğuk su hastalığına sebep olan *Flavobacterium psychrophilum* adıyla bilinen etken, Gram negatif, sporsuz, sarı pigmentli, kapsülsüz, aerobik veya fakültatif anaerobik çomak şeklindedir (Wiens ve ark. 2013, Yılmaz ve ark. 2011). Hastalık, daha çok 15 °C'nin altındaki su sıcaklıklarında görülmekte olup, son 15 yıldır tüm Dünya'daki Gökkuşığı alabalığı kuluçkahanelerinde ciddi balık kayıplarına neden olmaktadır (Yılmaz ve ark. 2011). Bu hastalık, balıklar 0,2 g ile 4 g arasında iken etkilidir ve mortalite oranı % 2 ile % 40 arasında değişir (Wiens ve ark. 2013).

Enterik kızıl ağız hastalığı (Enteric redmouth-ERM) salmonidlerde *Yersinia ruckeri* etkeninin neden olduğu sistemik bir hastalıktır (Wiens ve ark. 2010, Austin ve ark. 2003). Bu hastalık nedeniyle dünya genelinde salmon balıkları ve Gökkuşığı alabalığı çiftliklerinde ağır ekonomik kayıplar görülmektedir. Ancak bu kayıplar aşılama ile kontrol altına alınabilir. Bu etkene karşı aşılama çalışmaları ilk olarak 1970 yılında başlamıştır (Deshmukh ve ark. 2012). Enterik kızıl ağız hastalığı, Gökkuşığı alabalıklarının soğuk su hastalıkları ve viral hemorajik septisemi gibi alabalık çiftliklerinde önemli kayıplara neden olan hastalıklarla mücadele ilaç kullanımı, aşılama, sanitasyon ve eradikasyon gibi geleneksel yöntemlerle yapılmaktadır. Ancak son yıllarda bu hastalık etkenlerine direnç genlerinin araştırılması ile genetik olarak bu hastalıklara karşı dirençli türler oluşturmak amacıyla çalışmalar yürütülmektedir (Henryon ve ark. 2005).

Alabalıklarda ve salmon balıklarında bakteriyel infeksiyonlara neden olan diğer önemli patojenlerden *Cytophaga columnaris* kolumnaris hastalığına, *Renibacterium salmoninarum* bakteriyel solungaç hastalığı ve bakteriyel böbrek hastalığına neden olur (Meyer, 1991).

Son on yıl içerisinde Gram pozitif koklar önemli balık patojeni olarak tanımlanmışlardır. Dünya'nın çeşitli yerlerinde Gram pozitif patojenlerin neden olduğu epidemik ve sporadik hastalıklar rapor edilmiştir (Arda ve ark. 2005, Austin 1993). Singapur, Avustralya, İsrail, İtalya, İspanya, Güney Afrika ve Amerika, Gram pozitif kokların neden olduğu salgınlardan etkilenmiş ülkelerdir. Gram pozitif kokların taksonomik sınıflandırmasında altı adet farklı tür bulunur. Bunlardan en önemlileri Streptokok, Laktokok ve Vagonokok olarak sıralanabilir (Eldar ve ark. 1999).

Kültür balıkçılığı endüstrisi, Laktokokkosis ve Streptokokkosis gibi gram pozitif bakteriyel patojenlerin neden olduğu infeksiyonlar yüzünden ekonomik kayıplara uğramaktadır. Avustralya, Güney Afrika, Japonya, Tayvan, İngiltere, Türkiye ve İran gibi ülkelerde özellikle Gökkuşığı alabalığı çiftliklerinde bu patojenlerin neden olduğu salgınlar rapor edilmiştir (Kia ve ark. 2013, Raissy ve ark. 2011).

İlk Streptokokal infeksiyon salgınları Japonya ve Güney Amerika'da deniz ve tatlı su balıklarında rapor edilmiş, sonrasında tüm Dünya'ya yayılmıştır. Bu yayılmanın infekte çiğ balıkların yem olarak kullanılması yoluyla gerçekleşmiş olduğu düşünülmektedir (Arda ve ark. 2005). Ayrıca, balık parazitlerinin de vektör olarak etkili olduğu bildirilmiştir (Ringo ve Gatesoupe 1998).

Balıklarda Streptokokosis, benzer klinik belirtileri işaret eden genel bir tanım olarak kullanılır. Ancak, en az altı farklı Gram pozitif kok türünün neden olduğu farklı hastalıklardır. Bu farklı patojen türler içerisinde Streptokoklar, Laktokoklar, Vagokoklar ve Enterokoklar bulunmaktadır. Son yıllarda Dünya çapında 40 ayrı Streptokok salgını ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Mata ve ark. 2004, Bromage ve ark. 1999, Kia ve ark. 2013).

Hasta balıklardan, alfa-hemolitik, beta-hemolitik ve non-hemolitik olmak üzere üç grup Streptokok izole edilmiştir. Histopatolojik olarak alfa-hemolitik grup Streptokoklar tilapya ve sarıkuyruk balıklarında genellikle granulamatoz inflamasyonlara neden olur. Beta-hemolitik Streptokoklar Ayu balıkları ve Gökkuşığı alabalıklarında septisemi ile

gözlerde irinli yangılara neden olurken, non-hemolitik grup, gözlerde karaciğer ve böbrekte sistemik infeksiyonlar oluştururlar (Ferguson ve ark. 1994).

Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olan önemli bakteriyel infeksiyonlardan Streptokokkal infeksiyonlar, ilk kez Japonya'da 1958 yılında rapor edilmiştir. Bu infeksiyondan etkilenen diğer türler arasında, Sarıkuyruklar (*Seriola quinqueradiata*), Altın balıkları (*Notemigonus crysoleucas*), Yılan balıkları (*Anguilla japonicus*) ve tilapya (*Oreochromis spp.*) balıkları gibi tatlı su ve deniz kültür balıkları da bulunmaktadır. Streptokokkosis tatlı su ve tuzlu su balıklarını etkileyen septisemik bir infeksiyondur (Azad ve ark. 2012, Hurvitz ve ark. 1997, Bullock 1981). Streptokokkosis salgınları, Japonya'da kültürü yapılan Sarıkuyruk balıklarında (*Seriola quinqueradiata*) ve Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) son otuz yıldan daha fazla bir süredir salgınlara neden olmaktadır (Ringo ve Gatesoupe 1998).

Streptokokkal infeksiyonlar, daha sonraları 1966 yılında Robinson ve Meyer tarafından infekte tatlı su Altın balıklarında (*Notemignus crysoleucas*) rapor edilerek non-hemolitik B grubu Streptokok etkeni izole edilmiştir (Eldar ve ark. 1995).

Hastalık belirtileri arasında, balık hareketlerinde yavaşlama, iştahsızlığa bağlı yem almama, düzensiz yüzme, anal zonda sık sık hemoraji ve peteşiler görülür. İç organlarda septisemi ekzotoksin salgısı ve asitik sıvı mevcuttur (Ringo ve Gatesoupe 1998). Genellikle periagonik bölgede asitik sıvı birikmesi mevcuttur. Merkezi sinir sisteminin etkilenmesi nedeniyle, balıklarda aşağı ve yukarı yüzme hareketi, sağa ve sola keskin yan dönüş hareketleri tipik olarak görülür. Ölüm bir iki hafta içerisinde gerçekleşir. Bu semptomlar hastalığın perakut döneminde görülmezken ani ölümlerle balık kayıpları görülür (Haghighi ve ark. 2010, Eldar ve ark. 1995).

Pop-eye (patlak göz) hastalığı olarak bilinen Streptokokkosis, hemen hemen tüm ülkelerde Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) yetiştirilen çiftliklerde bilinen en önemli bakteriyel hastalıklardan biridir. Hastalıkta tanı konması, ancak Streptokoklar tarafından infekte edilmiş bir balığın organları ve beyninden izolasyon ile mümkündür. Bu güne kadar Streptokokosis veya Laktokokosis nedeni olarak *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysagalactiae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus difficile*, *Lactococcus garvieae* ve

Lactococcus lactis etkenleri ayrıca tanımlanmıştır (Haghighi ve ark. 2010, Hurvitz ve ark. 1997).

Streptokokosis genellikle yavru balıklarda düşük seviyeli kronik infeksiyon şeklinde seyrederek günlük ölümlere neden olur (Bromage ve ark. 1999, Eldar ve ark. 1995). Hastalığın klinik belirtileri arasında bilateral ekzoftalmi, balığın renginde koyulaşan pigmentasyon ve asites görülür. İlkbahar ve yaz aylarında sıcaklığın yükselmesiyle birlikte, akut epizootik salgınlarda, sadece gözde opaklık gibi sınırlı klinik rağmen gecelik balık ölümlerinin %70'lere ulaştığı rapor edilmiştir (Bromage ve ark. 1999).

Streptococcus agalactiae ya da diğer bir deyişle B grubu streptokoklar, çoğunlukla yeni doğan bebeklerde bakteriyel meningitis ve sepsisin nedenidir (Patterson ve ark. 2012). *Streptococcus agalactiae* gibi Lansfield B grubu olarak tanımlanmış koklar, daha çok ineklerde mastitis etkeni olarak bilinmektedir. Ancak, doğada yetişen kefallerde bu tür tanımlanmış ve ölümlere neden olduğu 2001 yılında Kuveyt'te bulunmuştur. İnfekte Tilapya'lardan (*Oreochromis spp.*) bir Streptokok türü izole edilmiş, bu tür başlangıçta *Streptococcus difficilis* olarak tanımlanmış ancak sonrasında *S. agalactiae* olarak tanımlanmıştır (Yuasa ve ark. 2008).

İsrail'de *Streptococcus inae* ve *Streptococcus difficilis* olmak üzere iki streptokok türünün meningosefalis ile karakterize, özellikle tilapya ve alabalıkların etkilendiği bir etiyolojik hastalık ajanı olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte infeksiyon yüzünden balık kayıplarının düşük su kalitesi ve sıcaklık değişimi ile oluşan stres koşullarında meydana geldiği bildirilmiştir (Hurvitz ve ark. 1997).

Yapılan çalışmalarda Streptokokların salmon balıklarının gastrointestinal sistemlerindeki mukozalarından izole edildiği bildirilmiştir (Ringo ve Gatesoupe 1998).

Streptococcus inae Dünya'da birçok bölgede majör bir balık patojenidir (Baiano ve Barnes 2009). *S. iniae* ilk olarak Amazon tatlı su yunuslarından izole edilmiştir (Michel ve ark. 1997). Bu bakteri aynı zamanda, zoonotik özellikte olup, infekte balıklara elle yapılan bazı uygulamalar sonucu insanlarda da infeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca *S. iniae* 2000 yılında yapılan yeniden ortaya çıkan enfeksiyöz hastalıklar üzerine yapılan uluslararası bir konferansta hayvansal gıdalar aracılığıyla insanlara geçen acil değerlendirilmesi gereken bir hastalık etkeni olarak bildirilmiştir (Baiano ve Barnes 2009).

Salgınlardan izole edilen patojen ilk önceleri *Streptococcus spp.* olarak tanımlansa da, patojen sonradan *Enterococcus seriolicida* ve daha sonrada *Lactococcus garvieae* olarak sınıflandırılmıştır (Ringo ve Gatesoupe 1998, Vendrell ve ark. 2006). *Enterococcus seriolicida* olan olarak bilinen *Lactococcus garvieae*, gram pozitif bir bakteridir ve tatlı su ve deniz balıklarında septisemi ile meningoensefalitis etkeni olan bir patojendir. *L. garvieae* salgınları, ilk olarak 1974 yılında Japonya da kültür Sarıkuyruk balıklarında ağır kayıpların nedeni olarak rapor edilmiştir. 1991 yılında yaz aylarındaki salgından bu yana İtalya ve İspanya’da Gökkuşığı alabalıklarında artan sıklıkta salgınların nedeni olarak rapor edilmiştir (Barnes ve ark. 2002).

Laktokokkosis, *Lactococcus garvieae*’nın neden olduğu önemli bir hastalık olup bir çeşit Streptokokkosis’tir (Vendell ve ark. 2006). Bu etken intensif kültür balıkçılığında, tatlı su ve tuzlu balıklarında zoonotik karakterde özellikle olan su sıcaklığının yükseldiği yaz aylarında infeksiyonlara neden olan bir patojendir (Sanchez ve ark. 2011). Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) Avrupa, Avusturalya, Güney Afrika, Japonya, Tayvan, ve İngiltere gibi ülkelerde salgınlara neden olmuştur (Ravelo ve ark. 2006, Vendell ve ark. 2006). Ayrıca, Japonya’da Sarıkuyruk balıklarında (*Seriola quinqueradiata*) önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Laktokokkosis karşı Gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) koruyucu aşılar geliştirilmiştir. Öte yandan bu aşılar intraperitonel uygulandığı zaman, *Streptococcus iniae* veya *Streptococcus parauberis* gibi diğer Gram pozitif balık patojenlerine karşı yüksek seviyede bir koruma sağlar (Ravelo ve ark. 2006.).

L. garviae ilk olarak Britanya’da sığır mastitislerinden izole edilmiştir. Daha sonra Gökkuşığı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792), Avustralya, Güney Afrika, Japonya, Tayvan, İngiltere gibi ülkelerde *L. garviae* salgınları rapor edilmiştir (Vendell ve ark. 2006).

L. garviae, Gram pozitif, hareketsiz, ovalimsi koklardır. Çiftler ya da kısa zincirler halinde görülebilirler. Kanlı agar üzerinde alfa-hemolitiklerdir. Oksidaz ve katalaz negatiflerdir sporsuz ve aside dirençli değildirler (Vendell ve ark. 2007, Ringo ve Gatesoupe 1998). Bu patojen Akdeniz bölgesinde tatlı su ve tuzlu sulardan kültür balıkçılığında artan sıklıklarla izole edilmiştir. Alabalıklarda bu ajanın klinik belirtileri tek ya da iki taraflı ekzoftalmi, perioküler alanda, buccal bölgede, operkulumda kuyruk yüzgeci bölgesinde hemorajiler, koyulaşmış bir deri ve karın bölgesinde şişlik ile

karakterizedir. Balığın içine bakıldığında ise, peritoneal boşlukta hemorojiler ve purulent eksudatlar görülür. Laktokokkosis antibakteriyel kimyasal tedavi uygulamalarının neden olduğu önemli ekonomik kayıplara yol açabilir. Bununla birlikte antibakteriyellerin yanlış kullanımı yasal kısıtlamalar ve anoreksia gibi beslenme zorluklarına ve antibiyotik direncine neden olabilir. Tüm bu nedenlerle güvenli ve etkin bir aşıya ihtiyaç duyulmaktadır (Vendell ve ark. 2007).

Günümüzde Streptokok türlerinin tanımlanmasında kullanılan birkaç teknik vardır. Bunlar besiyeri kültürü, biyokimyasal testler, enzim reaksiyonları, biyolog fenotipik analizler ve hücre yağ asidi analizleridir (Klesius ve ark. 2006). Ancak biyokimyasal testler kullanılarak yapılan identifikasyonda, veri bilgilerinin yetersizliği nedeniyle, bazı bakteriler zor teşhis edilirler. Bu nedenle artık günümüzde çok sık kullanılmamaktadır. (Actis ve ark. 1999).

Klasik metotlarla bakteriyel teşhis ve identifikasyon, türler arasındaki yüksek benzerlik nedeniyle çok çeşitli biyokimyasal testlerin uygulanmasını gerektirmektedir. Bu testlerin uzun prosedürleri teşhiste, işgücü ve zaman kaybına neden olmaktadır. Moleküler tekniklerin gelişmesi ve kullanılmasıyla, teşhiste hız kazanılmış ve birbirine çok benzer özellikteki türlerin ayrımının kesin olarak yapılması imkanı sağlanmış, kontrol ve koruma önlemlerinin biran önce alınabilmesi imkanı sağlamıştır (Türe ve ark. 2012).

Moleküler tekniklerin ortaya çıkışından bu yana 40 yıl içerisinde DNA teknolojisindeki gelişmelerle biyolojik araştırmalar devrim niteliğini kazanmıştır. Özellikle son 20 yılda, balık hastalıkları teşhisinde moleküler yöntemler kullanılmış ve büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Türe ve ark. 2012). Bu durum, balık hastalıklarının teşhisi ve kontrolü açısından hız sağlamış ve zaman açısından büyük faydalar sağlamıştır. Balık hastalıklarına neden olan patojenlerin moleküler tekniklerle tanısı incelenerek uygulama potansiyeli tartışıldı. Rutin teşhis laboratuvarlarında yeni moleküler tekniklerin uygulanması ve ilgili literatürler nadir olarak kullanılmaktadır. Ancak çok geniş bir sektör olan kültür balıkçılığında bu yöntemlerin kullanılması teşhiste hız sağlamakta ve tedavi sürecinde zaman kazanılmasını sağlamaktadır (Cunningham 2002).

Balık patojenlerinin identifikasyonu için günümüzde yaygın olarak kullanılan ve oldukça güvenilir olan bir diğer yöntem ise PCR (Polymerase Chains Reaction) tekniğidir (Actis ve ark. 1999).

Özellikle multipleks (çoklu) PCR'ın gelişmesi ile aynı anda birkaç farklı patojenin tespiti sağlanmıştır. Multipleks PCR'da, birden fazla primer çifti ile aynı reaksiyon içerisinde birden çok hedefin sekansı gerçekleşir. Bu teknik, işgücü, maliyet ve zaman açısından önemli avantajlar sağlamaktadır (Türe ve ark. 2012, Mata ve ark 2004).

Streptokokkosis Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) yetiştiriciliğinde toplu ölümlerle ekonomik kayıplara neden olan önemli bir bakteriyel hastalıktır. Bu çalışmada, Streptokokkosis hastalığının bilinen başlıca etkenlerinden *Streptococcus inae*, *Streptococcus difficilis*, *Streptococcus parauberis* ve *Lactococcus garvieae*'nin multipleks PCR yöntemi ile teşhisinin yapılması hedeflenmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İzolasyon Örnekleri

Araştırma için alabalık yetiştiriciliği yapılan 4 farklı çiftlikten alınan 220 adet 50-60 g ağırlığındaki Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) örnekleri Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Solusyonlar, Ayıraçlar

2.1.2.1. Besiyerleri

2.1.2.1.1. İzolasyon besiyeri

2.1.2.1.1.1. Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458)

Kazeinden Pepton	15,0 g
Soymealden Peton	5.0 g
Sodyum Klorür	5.0 g
Agar agar	15,0 g
Distile su	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,1 – 7,5'e ayarlanarak, 121 °C'de 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutuldu içine aseptik koşullarda %7 oranında steril defibrine koyun kanı ilave edildi ve 12,5 ml olacak şekilde steril petri kaplarına döküldü (Koneman ve ark. 1997, Holt ve ark. 1994).

2.1.2.2. Solusyonlar

2.1.2.2.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer

10X TBE Stok Solusyonu

Tris Base	121,1 g
Borik Asit	61,83 g
EDTA	5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklav edilip, pH 8.0 ayarlanarak buzdolabında saklandı.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu

10X TBE	50 ml
Distile su	950 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlandı.

2.1.2.2.2. Gel Loading Buffer (6X)

Bromfenol Mavisi	25 mg
Sükroz	4 g
H ₂ O	10 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlandı.

2.1.2.2.3. Tris (1M)

Tris Base	121 g
-----------	-------

Tris Base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7.6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 15 dk otoklav edildi.

2.1.2.2.4. NaCl (1M)

NaCl	58,44 g
Distile Su	800 ml

NaCl distile suda çözüldükten sonra son hacim 1000 ml' ye tamamlandı

2.1.2.2.5. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)

Tris (1M)	10 ml
EDTA(0,5 M)	2 ml

Karıştırıldıktan sonra karışım 1000 ml distile su ile tamamlandı.

2.1.2.3. Ayıraçlar

2.1.2.3.1. Katalaz

H ₂ O ₂	% 3
-------------------------------	-----

Katalaz, aerobik metabolizmaların hücrelerinde bulunan bir enzimdir. Koenzim olarak demir ve protoporfirin (hemin) içerir. Bu enzim, metabolik proseslerin ortaya çıkardığı toksik hidrojen peroksidi parçalar. İncelenecek kolonin bir kısmı steril öze ile kuru bir lam üzerine alınır. Üzerine katalaz ayracından 0,1 ml kadar bir damla damlatılır. Pozitif sonuçta bakteri kütlesi üzerinde gaz (oksijen) oluşumu gözlenirken, negatif reaksiyonda gaz çıkışı gözlenmez.

2.1.3. PCR

2.1.3.1. Kullanılan cihazlar

PCR 25 örnek kapasiteli Eppendorf Master Cycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.1.3.2. MgCl₂, Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set

25 mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer 1 (100 mM (Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 10X Taq Buffer 2 ((NH₄)₂ SO₄ -MgCl₂) 100mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas®) kullanıldı.

2.1.3.3. Primerler

Multipleks PCR yöntemiyle *S. difficilis*, *S. parauberis*, *S. iniae* ve *L. garvieae*'nin belirlenmesinde kullanılan primerler Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Multipleks PCR amplifikasyonlarında kullanılan primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları (Mata ve ark. 2004)

Primer Çifti	Oligonükleotiddizisi (5'-3')	Target Gen	Büyüklik (bp)	Patojen
Sdi 61 Sdi 252	AGGAAACCTGCCATTTGCG CAATCTATTTCTAGATCGTGG	16S-23S RNA intergenic spacer	192	<i>S. difficilis</i>
Spa 2152 Spa 2870	TTTCGTCTGAGGCAATGTTG GCTTCATATATCGCTATACT	23S rRNA	718	<i>S. parauberis</i>
LOX-1 LOX-2	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC ATATCTGATTGGGCCGTCTAA	<i>lctO</i>	870	<i>S. iniae</i>
pLG-1 pLG-2	CATAACAATGAGAATCGC GCACCCTCGCGGGTTG	16S rRNA	1.100	<i>L. garvieae</i>

2.1.4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Thermo marka, elektroforez tankında, görüntüleme işlemi VilberLourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)	2 g
TBE (0,5X)	100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50 °C'ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

2.1.4.2. Marker

Marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas) kullanıldı.

2.1.4.3. Etidium Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka % 1' lik Ethidium Bromür 500 ml 0,5X TBE ile hazırlanan %2' lik agaroz jelin içerisine 5 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

2.1.4.4. Pozitif Kontrol

Polimeraz Zincir Reaksiyonu çalışmalarının aşamalarında kullanılan *Streptococcus diffcilis*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae* ve *Lactococcus garvieae* türlerinin standart suşlarından purifiye edilen pozitif kontrol DNA'ları, Jose F. Fernandez-Garayzabal (Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain)'den temin edilmiştir.

2.1.5. DNA Ekstraksiyon Kiti

DNA ekstraksiyonu amacıyla birçok mikroorganizmadan yüksek kaliteli genomik DNA'nın izolasyonu için dizayn edilmiş genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas®) kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Alınması

Araştırma için alabalık yetiştiriciliği yapılan 4 farklı çiftlikten alınan 220 adet 50-60 g ağırlığındaki Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) örnekleri Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirildi.

2.2.2. *Streptococcus spp.* ve *Lactococcus spp.* İzolasyonu

Laboratuvara getirilen Gökkuşığı alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) nekropsi yapılarak, karaciğer böbrek ve dalaktan %7 defibrine koyun kanlı Tyryptic Soy Agara (TSA) aseptik koşullarda ekimler yapıldı. Ekimi yapılan agar plaklar, 25 °C derecede 24-48 saat süreyle aerobik koşullarda inkübasyona bırakıldı (Mata ve ark. 2004). Süre sonunda üreme şekillenen besiyerlerinden preparatlar hazırlanarak Gram boyama yapıldı. Boyama sonucunda belirlenen Gram-pozitif kokların ait olduğu kolonilere katalaz testi uygulanarak, katalaz negatif reaksiyon veren suşlar *Streptococcus spp.* ve *Lactococcus spp.* olarak tanımlanmıştır.

2.2.3. DNA İzolasyonu

220 adet Gökkuşığı alabalığı örneklerinden izole edilen saf *Streptococcus spp.* ve *Lactococcus spp.* suşları bakteri hücreleri toplandı ve DNA ekstraksiyonu aşamasına geçildi (Mata ve ark. 2004). İzole edilen suşların DNA izolasyonu genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas[®]) ile prosedüre uygun olarak yapılmıştır. Ayrılan DNA'lar PCR çalışmaları yapılana kadar cryo tüplerde -20 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

Fermentas[®] DNA Isolation Kit Prosedürü:

*Bir öze dolusu stafilokok kültürü 400 µl lizis solusyonu ile süspanse edildi. 65°C'de 5 dk inkübe edildi.

*600 µl kloroform ilave edildikten sonra 10.000 rpm.de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.

*800 µl presipitasyon solusyonu pelet üzerine ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.

*10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solusyonunda çözdürüldü.

*300 µl etanol eklendikten sonra 10 dakika -20°C'de bekletildi. 10.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra %70'lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü. Her bir PCR reaksiyonu için 5 µl template DNA kullanıldı.

2.2.3.1. PCR

Master Miksin Hazırlanışı: Araştırmamızda *Streptococcus diffıcilis*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae* ve *Lactococcus garvieae* türlerinin identifikasyonu için yapılan multipleks PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, 2 mM MgCl₂, her bir primerden 1 µM, her bir deoxynucleoside triphosphate'dan 0.25 mM ve 1.5 U of Taq DNA polymerase, 2 µl bakteriyel süspansiyondan ekstrakte edilmiş template DNA olacak şekilde gerçekleştirildi (Mata ve ark. 2004). Kullanılan malzemeler ve volümleri Çizelge 2.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Mastermiks hazırlanma oranları (Mata ve ark. 2004)

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Miktar (µl)
Taq Buffer 1(+KCl,- MgCl ₂) (10X)	3 µl
Taq Buffer 2 (+(NH ₄) ₂ SO ₄ - MgCl ₂) (10X)	3 µl
MgCl ₂ (25mM)	4 µl
dNTP (2mM)	1 µl
Primer 1 (Sdi 61)	1 µl
Primer 2 (Sdi 252)	1 µl
Primer 3 (Spa 2152)	1 µl
Primer 4 (Spa 2870)	1 µl
Primer 5 (LOX-1)	1 µl
Primer 6 (LOX-2)	1 µl
Primer 7 (pLG-1)	1 µl
Primer 8 (pLG-2)	1 µl
Pfu DNA Polimeraz (5U)	0.4 µl
ddH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır
Template DNA (200 nM)	2 µl
TOPLAM	50 µl

Mastermiks hazırlandıktan sonra 0,2 µL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 48'er µl hazırlanan mastermiksden ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. *Sdi 61* ve *Sdi 252*, *Spa 2152* ve *Spa 287*, *LOX-1* ve *LOX-2*, *pLG-1* ve *pLG-2* primerlerine özgü hazırlanan mastermiks PCR analizlerinde kullanılan ısıl döngü ve süre diyagramı (Mata ve ark 2004) Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı (Mata ve ark 2004)

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	5 dk
Denatürasyon	30	92°C	1 dk
Bağlanma		57°C	1 dk
Uzama		72°C	1,5 dk
Son Uzama	1	72°C	7 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

2.2.3.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

0,2 ml tüplerde oluşturulan 50 µl' lik PCR ürünlerinden 10' ar µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl 6x loading dye solusyonu ile karıştırıldı. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, % 2'lik agaroz jeldeki uygun pozisyonadaki kuyucuğa yöklendi.

2.2.3.3. Jelde Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 80V 500A akımda 40 dakika yürütüldü.

2.2.3.4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarıldı. Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki

transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı değerlendirildi.

Değerlendirme daha önce bildirilen şekilde yapıldı. PCR analizinde, *Sdi 61* ve *Sdi 252*, primerleri için 192 bp uzunluğunda, *Spa 2152* ve *Spa 287* primerleri için 718 bp uzunluğunda, *LOX-1* ve *LOX-2* primerleri için 870 bp uzunluğunda, *pLG-1* ve *pLG-2* primeri için 1.100 bp uzunluğundaki bant oluşumları arandı.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon Bulguları

Araştırma için alabalık yetiştiriciliği yapılan 4 farklı çiftlikten alınan 220 adet 50-60 g ağırlığındaki Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) örnekleri Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. Gelen örneklere nekropsi yapılarak %7 defibrine koyun kanlı TSA ağara karaciğer böbrek ve dalaktan ekimler yapılmıştır (Koneman ve ark. 1997, Holt ve ark. 1994). İnkubasyon periyodu sonunda agar plaklarda şekillenen koloniler, Gram boyama yöntemi ile mikroskopik morfoloji açısından incelenmiştir. Boyama sonucunda belirlenen Gram-pozitif kokların ait olduğu kolonilere katalaz testi uygulanmıştır (Koneman ve ark. 1997, Holt ve ark. 1994). Katalaz negatif olan koloniler, *Streptococcus spp.* ve *Lactococcus spp.* şüpheli koloniler olarak tanımlanmıştır.

Araştırmamızda 4 farklı çiftlikten toplanan 220 adet 50-60 g ağırlığındaki Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) örneğinin 138 (% 62,71)'inden *Streptococcus spp.* izole edilmiştir.

3.2. PCR Bulguları

Bu tez çalışması alabalık yetiştiriciliği yapılan 4 farklı çiftlikten toplanan 220 adet 50-60 g ağırlığındaki Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) örneklerinde yapılan multipleks PCR çalışmalarından toplam 138 adet *Streptococcus difficilis*, *Streptococcus parauberis*, ve *Lactococcus garvieae* tanımlanmış ve örneklerin hiçbirinden *Streptococcus iniae* tanımlanmamıştır.

Multipleks PCR sonunda tür tanımlamaları, *L. garvieae* 72 adet alabalıktan, *S. parauberis* 38 adet alabalıktan, *S. difficilis* 28 adet alabalıktan gerçekleştirilmiş olup, örneklerin hiç birinden *S. iniae* tanımlanmamıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Multipleks PCR Çalışması Sonunda İzole Edilen Türler

Multipleks PCR Hedef Patojenler	İzole Edilen Suşların Sayısı (adet)	İzolasyon Yüzdeleri (%)
<i>L. garvieae</i>	72	52,17
<i>S. parauberis</i>	38	27,54
<i>S. difficilis</i>	28	20,29
<i>S. iniae</i>	0	0
Toplam	138	100

Multipleks PCR çalışması sonucunda tanımlanmış hedef patojenlerin toplam örneklerin % 62,71'inden *Streptococcus spp.* ve *Lactococcus spp.* tanımlanmıştır. 220 adet örnekte yapılan Multipleks PCR tanımlaması sonucundaki tür bazındaki yüzde dağılımları, *L. garvieae* % 52,17, *S. parauberis* % 27,54 ve *S. difficilis* % 20,29'dir (Çizelge 3.1). Multipleks PCR ile elde edilen elektroforez görüntüleri Şekil 3.1.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Multipleks PCR pozitif örneklerin elektroforez görüntüsü **M:**100 bp DNA ladder, **1:** *L. garvieae*, *S. iniae*, *S. parauberis* ve *S. difficilis* pozitif kontrol, **2:** Negatif kontrol, **3-7:** *L. garvieae* PCR pozitif örnekler, **8-10:** *S. parauberis* PCR pozitif örnekler, **11-13:** *S. difficilis* PCR pozitif örnekler.

Multipleks PCR ile yapılan tanımlamalarda hedef patojen türlerinin çiftlik bazındaki dağılımları incelendiğinde, 1. çiftlikten alınan 55 alabalık örneğinin 25'inden *L. garvieae*, 18'inden *S. parauberis*, 10'undan *S. difficilis*; 2. çiftlikten alınan 55 alabalık örneğinin 17'sinden *L. garvieae*, 12'sinden *S. parauberis*, 6'sından *S. difficilis*; 3. çiftlikten alınan 55 alabalık örneğinin 16'sından *L. garvieae*, 2'sinden *S. parauberis*, 5'inden *S. difficilis*; 4. çiftlikten alınan 55 alabalık örneğinin 14'ünden *L. garvieae*, 6'sından *S.*

parauberis ve 7'sinden *S. difficilis* identifiye edilmiş olup, alabalık örneklerinin hiçbirinde *S. iniae* patojenine rastlanmamıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. İzolatların Çiftlik Bazında Dağılımı

İzolatlar	1. Çiftlik	2. Çiftlik	3. Çiftlik	4. Çiftlik	Toplam
<i>L. garvieae</i>	25	17	16	14	72
<i>S. parauberis</i>	18	12	2	6	38
<i>S. difficilis</i>	10	6	5	7	28
<i>S. iniae</i>	0	0	0	0	0
Toplam	53	35	23	27	138

Multipleks PCR ile yapılan identifikasyonlarda hedef patojen türlerinin çiftlik bazındaki % dağılımları incelendiğinde, *L. garvieae*'nin % 45,45 oranı ile 1. çiftlikten en çok izole edildiği görülmektedir. Çiftlik bazında genel bir değerlendirme yapıldığında, 1. çiftlikten % 38,41; 2. çiftlikten % 25,36; 3. çiftlikten % 16,67 ve 4. çiftlikten % 19,56 oranlarında izolasyon gerçekleşmiştir. İzolatların çiftlik bazında yüzde dağılımları Çizelge 3.3.'te gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. İzolatların Çiftlik Bazında Yüzde Dağılımları

İzolat	1.Çiftlik	2.Çiftlik	3.Çiftlik	4.Çiftlik
<i>L. garvieae</i>	% 45,45	% 30,91	% 29,09	% 25,45
<i>S. parauberis</i>	% 37,72	% 21,82	% 3,63	% 10,90
<i>S. difficilis</i>	% 18,18	% 10,91	% 9,09	% 12,72
<i>S. iniae</i>	%0	%0	%0	%0

4. TARTIŞMA

Gram pozitif koklardan Streptokok ve Laktokoklar tüm Dünya üzerinde balık patojenleri olarak tanımlanmaktadır. Gram pozitif koklar *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus difficilis*, *Lactococcus garvieae* gibi birkaç farklı türü içerir. Bu türler Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) Streptokokkosis ve Laktokokkosis'in majör etkenleri olarak bilinmektedir (Sudheesh ve ark. 2012).

Çeşitli doğa ve kültür balıklarının Streptokokkal infeksiyonlardan etkilendiği bilinmektedir (Toranzo ve ark. 2005). Streptokokkosis ilk olarak Gökkuşığı alabalıklarında (*Onchorhynchus myksis* Walbaum 1792) 1958 yılında rapor edilmiştir. Kuveyt, 2001 yılı Ağustos ayında doğal bir Streptokokkosis salgın vakasına tanık olmuştur (Azad ve ark. 2012).

Streptokok türleri, sağlıklı insan ve hayvan florasında normal olarak bulunabilirken, bazı türler, buldukları organizmada hastalığa neden olabilirler. Bilinen fenotipik identifikasyon metotları ile *S. pyogenes*, *S. agalactiae* gibi Streptokok türleri, fırsatçı patojen olarak kolayca tanımlanabilir. Bununla birlikte, viridans grup Streptokok ve *S. iniae* gibi diğer Streptokok türlerinden bazılarının kesin identifikasyonu problem olabilir (Goh ve ark. 1998).

Balıklarda görülen Streptokokkosis hastalığı su sıcaklığına bağlı olarak iki şekilde görülür. Soğuk su Streptokokkosis'i su sıcaklığı 15 °C'nin altına düştüğünde etkili olmaktadır. Sıcak su Streptokokkosis'i ise su sıcaklığının 15 °C'nin üzerine çıktığı koşullarda balık kayıplarına neden olmaktadır. *Lactococcus garviae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* ve *Streptococcus difficilis* sıcak su Streptokokkosis'lerinden izole edilmektedir. Ayrıca bu patojenler, potansiyel zoonotik ajanlardır ve insanlarda da hastalık oluşturabilirler (Toranzo ve ark. 2005).

Streptokokkosis, stres faktörlerinin varlığında ve özellikle su sıcaklıklarının 18 °C'nin üzerine çıkması ile birlikte Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus myksis* Walbaum 1792) % 80'lere varan mortalite oranlarına ulaşabildiği bildirilmiştir (Chang ve

ark. 2002, Soltani ve ark. 2005). Japonya’da Streptokokkosisin Japon kültür pisi balıklarında (*Paralichthys olivaceus*), çoğunlukla su sıcaklığının yüksek olduğu Haziran ve Ekim aylarında etkili olarak % 8 oranında ölümlere neden olduğu belirtilmiştir (Nguyen ve Kanal1999).

Araştırmamızda 4 farklı çiftlikten toplanan 220 adet 50-60 g ağırlığındaki Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) örneğinin 138 (% 62,71)’inden *Streptococcus* spp. izole edilmiştir.

Timur ve ark. (2011), 2010 yılında Marmara bölgesindeki bir Gökkuşığı alabalığı işletmesinden 150-180 gram ağırlığındaki 5 adet balıktan API20 STREP kiti ile *L. garvieae* izole ettiklerini bildirmişlerdir (Timur ve ark. 2011).

İtalya’da 10 adet alabalık örneğinden yapılan bir çalışmada (Zlokin ve ark. 1998), 7 adet örnekte, patojen *L. garvieae* izole edilmiştir. Yine bu çalışmada, *L. lactis* ile *L. garvieae* arasında fenotipik benzerlikler olduğu ortaya konmuştur. İtalya’da yapılan bir diğer çalışmada ise (Eldar ve ark. 1999), alabalıklarda farklı zamanlarda görülen 100 den fazla salgında 71 adet (% 87) *L. garvieae* izole edilmiştir. Ülkemizde ilk kez 2001 yılında Ege bölgesindeki gökkuşığı alabalığı çiftliklerinde *L. garvieae* izole edilmiştir. Kav ve ark. (2007), 2002-2004 yılları arasında Konya ili ve çevresindeki alabalık çiftliklerinden 180 adet hasta balıktan 30 adet *Lactococcus garvieae* suşu izole etmişlerdir. Bu izolatların 32’sinde pLG-1 ve pLG-2 primerleri ile PCR’da 1100 bp’de tür spesifik bantları görmüşlerdir (Kav ve ark. 2007).

Özer ve ark. (2008), Ocak-Aralık 2005 yılında Mersin ili ve çevresinden 260 Gökkuşığı alabalık örneği toplamışlardır. Bu Gökkuşığı alabalıklardan 63 (%24,23)ünde gram pozitif katalaz ve oksidaz negatif kok izole etmişlerdir. Çalışmada 1 suş canlandırılmamış ve 62 adet alabalığın 24 (%38,7) ünden *L. garvieae* izole ettiklerini bildirmektedirler (Özer ve ark. 2008).

Hasta kültür pisi balıklarında yapılan bir çalışmada, hastalığın klinik belirtileri olarak, gözlerde, tek ya da çift taraflı ekzoftalmi, operkulum ve solungaçlar üzerinde ve iç organlarda hemorajiler görülmüştür. Çalışmada 22 hasta balıktan 18 adetinde *S. parauberis*

izole edilirken, 3 adet *L. garviae* izole edilmiş, anti *S. iniae* serumu ile aglütinasyon gösteren *S. iniae* türüne rastlanamamıştır (Salvador ve ark. 2005)

Mata ve ark. (2004) sıcak su streptokokkosisi etkeni olarak bilinen *Lactococcus garviae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* ve *Streptococcus difficilis* etkenlerinin multipleks PCR yöntemi ile izolasyonuna yönelik olarak bir metot çalışması yapmışlar ve etkenlerin tamamını yüksek duyarlılıkla izole etmişlerdir (Mata ve ark. 2004).

Çalışmamızda multipleks PCR sonunda tür identifikasyonları, *L. garviae* 72 adet alabalıktan, *S. parauberis* 38 adet alabalıktan, *S. difficilis* 28 adet alabalıktan gerçekleştirilmiş olup, örneklerin hiç birinden *S. iniae* identifiye edilmemiştir.

Baek ve arkadaşları (2006), Mayıs 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada 22 alabalık örneği toplamışlar ve multipleks PCR ile *S. iniae* , *S. parauberis*, *L. garviae* varlığını incelemişlerdir. 3 izolat *L.garviae*, 18 izolat *S. parauberis* olarak identifiye edilmiş ve *S.iniae* bulunamamıştır (Baek ve ark. 2006).

Çalışmamızda, 220 adet örnekten yapılan multipleks PCR sonucunda izolatların tür bazındaki yüzde dağılımları, *L. garviae* % 52,17, *S. parauberis* % 27,54 ve *S. difficilis* % 20,29 olarak bulunmuştur. Multipleks PCR ile yapılan identifikasyonlarda hedef patojen türlerinin çiftlik bazındaki dağılımları incelendiğinde, 1. çiftlikten alınan 55 alabalık örneğinin 25'inden *L. garviae*, 18'inden *S. parauberis*, 10'undan *S. difficilis*; 2. çiftlikten alınan 55 alabalık örneğinin 17'sinden *L. garviae*, 12'sinden *S. parauberis*, 6'sından *S. difficilis*; 3. çiftlikten alınan 55 alabalık örneğinin 16'sından *L. garviae*, 2'sinden *S. parauberis*, 5'inden *S. difficilis*; 4. çiftlikten alınan 55 alabalık örneğinin 14'ünden *L. garviae*, 6'sından *S. parauberis* ve 7'sinden *S. difficilis* identifiye edilmiş olup, alabalık örneklerinin hiçbirinde *S. iniae* patojenine rastlanmamıştır. Multipleks PCR ile yapılan identifikasyonlarda hedef patojen türlerinin çiftlik bazındaki % dağılımları incelendiğinde, *L. garviae*'nin % 45,45 oranı ile 1. çiftlikten en çok izole edildiği görülmektedir. Çiftlik bazında genel bir değerlendirme yapıldığında, 1. çiftlikten % 38,41; 2. çiftlikten % 25,36; 3. çiftlikten % 16,67 ve 4. çiftlikten % 19,56 oranlarında izolasyon gerçekleşmiştir.

Gram pozitif balık patojenlerinden *Streptococcus iniae* balıklarda hemorajik septisemi ile birlikte meningoensefalitis, ekzoftalmi ve corneada opaklıklara neden olan bir etkidir. Son yıllarda *S. iniae* potansiyel bir zoonoz olarak tanımlanmış, bu bilgi insanlarda görülen 25 *S. iniae* infeksiyon vakası ile doğrulanmıştır. Kùltür balıkçılığı sektöründe *S. iniae* etkeninin neden olduğu infeksiyonlara bağlı maddi kayıplar 100 milyon dolara ulaşmıştır (Ra ve ark. 2010). Ancak araştırmamızda *S. iniae* identifikasyonu yapılmamıştır.

Araştırmamızda çiftliklerden *L. garvieae* en yüksek oranda identifiye edilmiş bulunmaktadır. Daha sonra sırasıyla *S. parauberis* ve *S. difficilis* identifikasyonları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre alabalık üretme çiftliklerinde görülen Streptokokkosis vakalarında bölgesel olarak *L. garvieae*'nin önemli bir yer tuttuğu gör÷lmektedir.

5. SONUÇ

Streptokokkosis, Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) yetiştiriciliğinde toplu ölümlerle ekonomik kayıplara neden olan önemli bir bakteriyel hastalıktır. Streptokokkosis hastalığının bilinen başlıca etkenleri *Streptococcus inae*, *Streptococcus difficilis*, *Streptococcus parauberis* ve *Lactococcus garvieae*'dir.

Klasik yöntemlerle yapılan identifikasyon çalışmaları, uzun sürmekte ve çok yakın türler klasik metotlarla ayırt edilememektedir. Bu durum teşhiste, zaman kaybına neden olurken, işletmelerde alınacak koruyucu önlemlerde gecikmelere ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Multipleks PCR yöntemi, aynı anda birkaç farklı patojenin tanımlanmasında ve klasik yöntemlere göre çok daha kısa sürede identifikasyon yapılmasına olanak vermektedir.

Araştırmamızda, Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) ölümlerle ekonomik kayıplara neden olan Streptokokkosis hastalığının bilinen başlıca etkenlerinden *Streptococcus inae* idendifiye edilmemiştir. Bunun yanında, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus parauberis* ve *Streptococcus difficilis*'in varlığı multipleks PCR ile ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak, Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde Streptokokkosis vakalarının ekonomik kayıplara yol açtığı ortaya çıkarılmıştır.

ÖZET

Alabalıklarda Görülen Streptokokkosis Vakaları İle İlişkili Bakteriyel Patojenlerin Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mPCR) İle Tanımlanması

Araştırma için alabalık yetiştiriciliği yapılan 4 farklı çiftlikten alınan 220 adet 50-60 g ağırlığındaki Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) örnekleri multipleks PCR (mPCR) yöntemi ile incelenmiştir.

Multipleks PCR çalışması sonucunda tanımlenen hedef patojenlerin toplam örneklerin % 62,71'inden *Streptococcus spp.* ve *Lactococcus spp.* tanımlanmıştır. 220 adet örnekte yapılan Multipleks PCR tanımlaması sonucundaki tür bazındaki yüzde dağılımları, *L. garvieae* % 52,17, *S. parauberis* % 27,54 ve *S. difficilis* % 20,29'dir

Multipleks PCR ile yapılan tanımlamalarda hedef patojen türlerinin çiftlik bazındaki % dağılımları incelendiğinde, *L. garvieae*'nin % 45,45 oranı ile 1. çiftlikten en çok izole edildiği görülmektedir. Çiftlik bazında genel bir değerlendirme yapıldığında, 1. çiftlikten % 38,41; 2. çiftlikten % 25,36; 3. çiftlikten % 16,67 ve 4. çiftlikten % 19,56 oranlarında izolasyon gerçekleşmiştir.

Araştırmamızda, Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus parauberis* ve *Streptococcus difficilis*'in multipleks PCR ile varlığı belirlenmiştir. Araştırmamızda, Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) ölümlerle ekonomik kayıplara neden olan Streptokokkosis hastalığının bilinen başlıca etkenlerinden *Streptococcus iniae* tanımlanmamıştır. Bunun yanında, Streptokokkosis vakalarında *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus parauberis* ve *Streptococcus difficilis*'in rol oynadığı multipleks PCR ile ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *S. difficilis*, *S. parauberis*, *L. garvieae*, *S. iniae*, gökkuşığı alabalığı, tanımlama, mPCR.

SUMMARY

Identification of Encountered Bacterial Pathogens Related With Streptococcosis Cases By Using Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR) In Trout

For this research a number of 220, weighing in 50-60 g rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) samples from 4 different fish farm were examined by multiplex PCR (mPCR).

At the end of multiplex PCR study, *Streptococcus spp.* and *Lactococcus spp.* target pathogens were identified at the rate of 62.71% from whole samples. The percentage distribution according to identified species were at the rate of *L. garvieae* 52.17%, *S. parauberis* 27.54% and *S. difficilis* 20.29%.

The identified target pathogens by multiplex PCR percentage distribution according to fish farms, *L. garvieae* was isolated at the highest rate of 45.45% from 1st fish farm. In general fish farm evaluations (1st, 2nd, 3rd, 4th) showed that performed isolations were at the rate of 38.41%; 25.36%; 16.67% and 19.56%, respectively.

In our study, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus parauberis* and *Streptococcus difficilis* presences in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) were determined by multiplex PCR. *Streptococcus iniae*; the main agent of streptococcosis which causes economic losses with mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) was not identified. Moreover, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus parauberis* and *Streptococcus difficilis* were found out by multiplex PCR which are main pathogens in streptococcosis.

Keywords: *S. difficilis*, *S. parauberis*, *L. garvieae*, *S. iniae*, rainbow trout, identification, mPCR.

KAYNAKLAR

Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH. *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*, Chapter 8. in: Fish disease and disorders., Volume: 3 Viral, bacterial and fungal infections. Ed: R., Kusuda, F., Salati. CAB International, Oxfordshire. 1999.

Akbulut S, Keten A. Düzce yöresindeki alabalık yetiştiriciliği üzerine bir çalışma Süleyman Demirel Üniv. Orman Fak. Derg. 2001, A(2):49-60.

Altınok İ, Kurt İ. Molecular diagnosis of fish diseases: a review. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Scienc. 2003, 3:131-138.

Arda M, Seçer S, Sarıeyyüpoğlu M. Balık Hastalıkları, Ankara, Medisan Yayınevi. 2. Baskı 2005, 34-36.

Atamanalp M, Kocaman EM, Dağdemir V. Farklı tip havuzlarda alabalık yetiştiriciliğinde karlılık üzerine etkisinin ekonomik analizi. OMÜ Zir. Fak. Derg. 2007, 22(1):1-4.

Atasever M, Bozkurt Y. Alabalık yetiştiriciliğinde damızlık stok yönetimi. Türk Bilims. Derl. Derg. 2011, 4(1): 25-30.

Austin B. Bacterial fish pathogens Disease in farmed and wild fish second edition. 1993 Part 5 Gram positive bacteria 'lactic acid bacteria' p. 23-42 .

Austin DA, Robertson PAW, Austin B. Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) System. Appl. Microbiol. 2003, 26:127–131.

Azad IS, Marzouk AA, James CM, Almatar S, Gharabally HA, Qasem JA. Outbreak of natural Streptococcosis in hatchery produced silver pomfret (*Pampus argenteus Euphrasen*) larvae in Kuwait. Aquacult. 2012, 330–333:15–20.

Baeck GW, Kim JH, Gomez DK, Park SC. Isolation and characterization of *Streptococcus sp.* from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island J. Vet. Sci. 2006, 7(1), 53–58.

Baiano JCF, Barnes AC. Towards control of *Streptococcus iniae*. Emerg. Infect. Dis. 2009, 15(12):1891-1896.

Barnes AC, Guyot C, Hansen BG, Horne MT, Ellis AE. Antibody increases phagocytosis and killing of *Lactococcus garvieae* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) macrophages. Fish & Shellfish Immunol. 2002, 12:181–186.

Bromage ES, Thomas A, Owens L. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Dis. of Aquat. Organisms. 1999, 36:177-181.

Bullock GL. Streptococcal infections of fishes. US Fish & Wildlife Publications Paper. 1981, 127.

Burr SE, Pugovkin D, Wahli T, Segner H, Frey J. Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. Microbiol. 2005, 151:2111–2118.

Chang PH, Lin CW, Lee YC. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 2002, 22(5): 319.

Cunningham CO. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. Aquacult. 2002, 206:19–55.

Deshmukh S, Raida MK, Dalsgaard I, Chettri JK, Kania PW, Buchmann K. Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet. Immunol. and Immunopathol. 2012, 145:379–385.

Dias C, Mota V, Murcia AM, Saavedra MJ. Antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas spp.* isolated from Ornamental Fish. J. Aquacult. Res. Dev. 2012, 3(3):2155-9546

DPT. T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı Dokuzuncu kalkınma planı (2007-2013) balıkçılık özel ihtisas komisyonu raporu. Ankara 2007.

Eldar A, Bejerano Y, Livoff A, Horovitz A, Bercovier H. Experimental Streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. Vet. Microbiol. 1995, 43:33-40.

Eldar A, Ghittino C. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. Dis. of Aquatic Organisms. Dis. 1999, 36: 227-231.

Eldar A, Gorla M, Ghittino C, Zlotkin A, Bercovier H. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia and Australia. Applied Environment Microbiology. 1999, 65(3):1005-1008.

FAO. Fisheries and Aquaculture Department. The state of world fisheries and aquaculture Rome. 2012.

Ferguson HW, Morales JA, Ostland VE. Streptococcosis in aquarium fish. Dis. of Aquat. Org. 1994, 19:1-6.

Fitwi BS, Nagel F, Meyer S, Schroeder JP, Schulz C. Comparative life cycle assessment (LCA) of raising rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in different production systems. Aquacult. Engin. 2012, 1675-8.

Georgiadis MP, Gardner IA, Hedrick RP. The role of epidemiology in the prevention, diagnosis and control of infectious diseases of fish. Preventive Vet. Med. 2001, 48:287-302.

Goh SH, Driedger D, Gillett S, Low DE, Hemmingsen SM, Amos M, Chan D, Lovgren M, Willey BM, Shaw C, Smith J. *Streptococcus iniae* a human and animal

pathogen: specific identification by the chaperonin 60 gene identification method. Journal of Clinical Microbiology. 1998, 36(7):2164-2166.

Haghighi KS, Soltani M, Nikbakhat BG, Ghasemi M, Skall HF. Molecular epidemiology of zoonotic Streptococcosis/Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture in Iran. Iranian J. of Microbiol. 2010, 2(4):198-209.

Henryon M, Berg P, Olesen NJ, Kjaer TE, Slierendrecht WJ, Jokumsen A, Lund I. Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome and viral haemorrhagic septicaemia. Aquacult.2005, 250:621–636.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Gram positive cocci: Group 17. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. USA, Williams & Wilkins; 1994. p.527-558.

Hurvitz A, Bercovier H, Rijn JV. Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) vaccinated against *Streptococcus iniae*. Fish & Shellfish Immunol. 1997, 7:45–53.

Kapetanovic D, Kurtovic B, Teskeredzic E. Differences in bacterial population in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) fry after transfer from Incubator to Pools. Food Technol. Biotechnol. 2005, 43(2):189–193.

Karaman S, Yeşilayer N. Alabalık tesisleri ve havuzlarının planlama ilkeleri. Türk Bilims. Derl. Derg. 2012, 5(2):138-146.

Kav K, Erganiş O. Konya bölgesinde bulunan Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. Vet. Bil. Derg. 2007, 1:7-17.

Kia ER, Mehrabi Y, Detection and identification of different streptococcosis strains in farmed rainbow trout in boyerahmad and dena regions (North South of Iran). World J. of Fish and Marine Sci. 2013, 5(3):315-321, ISSN 2078-4589.

Klesius P, Evans J, Shoemaker C, Yeh H, Goodwin AE, Adams A, Thompson K. Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. *Aquacult.* 2006, 258:180-186.

Kohyani AT, Keyvanshokoo S, Nematollahi A, Mahmoudi N, Zanoosi HP. Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish & Shellfish Immun.* 2011, 30:189-193.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Gram-positive cocci: Part-2: Streptococci, Enterococci, and the Streptococcus-like bacteria. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* Fifth Edition. New York: The Lippincott; 1997. p. 577-649.

Korkmaz AŞ, Zencir Ö, Coşkun T. Türkiye’de uygulanan alabalık yetiştirme teknikleri. *Süleyman Demirel Üniv. Eğirdir Su Ürün. Fak. Derg.* 2008, 4(1-2):58-64.

Korkut AY, Kop A, Demirtaş N, Cihaner A. Balık beslemede gelişim performansının izlenme yöntemleri. *EU Su Ürün. Derg.* 2007, 24 (1/2):201-205.

Mata AI, Gibello A, Casamayor A, Blanco MM, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water Streptococcosis in fish. *Appl. and Environment. Microbiol.* 2004, 70(5):3183-3187.

Meyer FP. Aquaculture disease and health management. *J. Anim. Sci.* 1991, 69: 4201-4208.

Michel C, Nougayrede P, Eldar A, Sochon E, DeKinkelin P. *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farming, *Dis. of Aquat. Org.* 1997, 30: 199-208.

Nguyen, HT, Kanai K. Selective agars for the isolation of *Streptococcus iniae* from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, and its cultural environment. *Journal of Applied Microbiology*. 1999, 86:769-786.

Norqvist A, Hagström A, Watz HW. Protection of rainbow trout against Vibriosis and Furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1989, 55(6):1400-1405.

Özer S, Bulduklu PS, Dönmez E Mersin ilinde yetiştiriciliği yapılan Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) streptokokkozis varlığı. *J. Of Fisher. Sci.* 2008, 2(3):272-283.

Patterson H, Saralahti A, Parikka M, Dramsi S, Cuot PT, Poyart C, Rounioja S, Ramet M. Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae*. *Infect. Devel. and Comp. Immunol.* 2012, 38:447–455.

Pereira C, Silva YJ, Santos AL, Cunha A, Gomes NCM, Almeida A. Bacteriophages with potential for inactivation of fish pathogenic bacteria: survival, host specificity and effect on bacterial community structure. *Mar. Drugs.* 2011, 9:2236-2255.

Ra CH, Park SJ, Kim KH, Kim SK. Production of recombinant ghost bacterial vaccine against streptococcal disease of olive flounder *Process Biochemistry*. 2010, 45:317–322.

Raissy M, Ansari M. In vitro antimicrobial effect of silver nanoparticles on *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae*. *African J. of Microbiol. Res.* 2011, 5(25): 4442-4445.

Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Detection of *Aeromonas salmonicida* by reverse transcription-multiplex polymerase chain reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012, 76(4):665-670.

Ravelo C, Magarinos B, Herrero MC, Costa L, Toranzo AE, Romalde JL. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquacult.* 2006, 251:153–158.

Ringo E, Gatesoupe FJ. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquacult.* 1998, 160:177–203.

Salvador R, Muller EE, Freitas JC, Leonhadt JH, Giordano LGP, Dias JA. Isolation and characterization of *Streptococcus spp.* group b in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Paraná State, Brazil. *Ciência. Rural, Santa Maria.* 2005, 35(6):1374-1378.

Sanchez TP, Balcazar JL, Merrifield DL, Carnevali O, Gioacchini G, DeBlas I, Zarzuela IR. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish & Shellfish Immunol.* 2011, 31:196-201.

Shao ZJ. Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Advanc. Drug Deliv. Rev.* 2001, 50:229–243

Soltani M, Jamshidi S, Sharifpour I. Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: Biophysical characteristics and pathogenesis. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 2005, 25(3): 95.

Sudheesh PS, Ghabshi AA, Mazrooci NA, Habsi SA. Comparative Pathogenomics of Bacteria Causing Infectious Diseases in Fish. *Int. J. of Evol. Biol.* 2012, ID:457264: 16.

Timur G, Yardımcı ER, Ürkü Ç, Çanak Ö. Marmara bölgesi kültür gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, L.) Lactococcosis'in bakteriyolojik ve histopatolojik metotlarla teşhisi. *İstanbul Üniv. Su Ürün. Derg.* 2011, 26:63-81.

Toranzo AE, Magarinos B, Romalde JL. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture.* 2005, 246:37– 61.

Turan H, Kaya Y, Sönmez G. Balık etinin besin değeri ve insan sağlığındaki yeri. *E.U. Su Ürünleri Dergisi* 2006, 23(1/3):505-508.

TÜİK. Su Ürünleri İstatistikleri, 2011.

Türe M, Erođlu O, Aksakal E. Balık hastalıklarında moleküler genetik belirteçler ve kullanımları. Yunus Araştırma Bülteni. 2012, (3):8-17 ISSN 1303-4456.

Türkmen G, Karadal O. The suggestion of integrated trout-crayfish culture in Turkey. J Black Sea/Mediterranean Environment. 2012, 18(3):400-413.

Vendrell D, Balcazar JL, Zarzuela IR, Blas I, Girones O, Muzquiz JL. Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Prevent. Vet. Med. 2007, 80:222–229.

Vendrell D, Balcazar JL, Zarzuela IR, DeBlas I, Girones O, Muzquiz JL. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. Comp. Immunol. Microbiol.&Infect. Dis. 2006, 29 177–198.

Vigneulle M, Laurencin FB. Uptake of *Vibrio anguillarum* bacterin in the posterior intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) after oral administration or anal intubation. Dis. of Aquat. Org. 1991, 11: 85-92.

Wiens GD, LaParta SE, Welch TJ, Evenhuis JP, Rexroad CE, Leeds TD. On-farm performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selectively bred for resistance to bacterial cold water disease: Effect of rearing environment on survival phenotype. Aquacult. 2013, 388(391):128–136.

Wiens GD, Vallejo RL. Temporal and pathogen-load dependent changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response traits following challenge with biotype 2 *Yersinia ruckeri*. Fish & Shellfish Immunol. 2010, 29:639-647.

Yılmaz E, Yılmaz A, Bilgin B. Alabalık kuluçkahanelerinde görülen önemli hastalıklar ve tedavi yöntemleri. Türk Bilims. Derl. Derg. 2011, 4(2):37-39.

Yuasa K, Kamaishi T, Hatai K, Bahnnan M, Borisutpeth P. Two cases of Streptococcal infections of cultured Tilapia in Asia. Dis. in Asian Aquacult. VI. 2008, 505:259-268.

Zlotkin A, Eldar A, Chittino C, Bercevier H. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 1998, 36(4):983-985.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Aydın'da doğdum. İlköğrenimimi Aydın'ın İncirliova ilçesinde, orta ve lise öğrenimimi Aydın'da tamamladım. 1997 yılında Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi'nde lisans eğitimime başladım ve 2002 yılında mezun oldum. 2002- 2004 yılları arasında bir okulda geçici olarak İngilizce dersleri verdim. 2004-2006 yılları arasında Aydın-Söke ilçesinde özel bir su ürünleri işleme fabrikasında kalite kontrol mühendisi olarak görev yaptım. 2005-2007 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimimi tamamladım. 2007-2011 yıllarında özel bir süt sığırcılığı işletmesinde laboratuvar sorumlusu olarak çalıştım. 2012 yılında 7 ay süreyle İtalya'da Camerino Üniversitesi'nde PCR ve mPCR konusunda çalıştım. 2009 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. Şu anda bir süt ve süt ürünleri fabrikasında kalite şefi olarak çalışmaktayım. İngilizce ve başlangıç seviyesinde İtalyanca bilmekteyim.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana destek olan danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Şükrü KIRKAN'a ve Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA' ya, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, alabalık materyallerini sağlamamda destek veren Prof. Dr. Ferda AKAR'a, laboratuvar çalıőmalarımnda desteğini esirgemeyen Araştırma Görevlisi Dr. Uđur PARIN'a, ve Vet. Hekim Neőe UÇAN'a, pozitif kontrol DNA'ların tedarik edilmesini sağlayan Jose F. FERNANDEZ-GARAYZABAL'a, beni bugünlere getiren, sabır ve emeklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.