

## Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Staphylococcus warneri*' nin Teşhis ve Histopatolojisi

### Identification and Histopathology of *Staphylococcus warneri* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Öznur Diler<sup>1\*</sup>, Hasan Emre Yılmaz<sup>2</sup>, İfakat Tülay Çağatay<sup>3</sup>, Mevlüt Nazıroğlu<sup>1</sup>, Öznur Özil<sup>1</sup>, Şeydanur Kan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Isparta

<sup>2</sup>Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, Türkiye

<sup>3</sup>Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Temel Bilimler Bölümü, Antalya

\* Sorumlu Yazar: [oznurdiler@isparta.edu.tr](mailto:oznurdiler@isparta.edu.tr)

Received: 03.04.2023

Accepted: 11.07.2023

Published: 01.09.2023

**How to Cite:** Diler, Ö., Yılmaz, H. E., Çağatay İ. T., Nazıroğlu, M., Özil, Ö., & Kan, Ş. (2023). Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Staphylococcus warneri*' nin teşhis ve histopatolojisi. *Acta Aquatica Turcica*, 19(3), 277-288. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1276536>

**Özet:** Bu çalışma, Ege ve Akdeniz bölgesinde bulunan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde Mart 2022 tarihinde mortaliteye neden olan hastalığın tanımlanması amacıyla yürütülmüştür. Enfekte alabalıkların dış incelemelerinde gözlerde bilateral ekzoftalmus, alt çenede kanama, dropsi, internal olarak karaciğerde anemi, sindirim sisteminde sarı eksüdat birikimi, yağ dokusunda ve anüs bölgesinde kanama, dalakta büyüme görüldü. Enfekte balıkların karaciğer ve ön böbreğinden Gram-pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus warneri* izole edildi. *S. warneri*, morfolojik özellikleri, bazı geleneksel testler ve 16S rRNA ve *sodA* gen bölgeleri kullanılarak moleküler genetik yöntemler yardımıyla teşhis edildi. Histopatolojik incelemelerde enfekte balıkların karaciğer dokusunda infiltrasyon, dalak dokusunda hiperemi ve böbrek tübül epitelinde nekrotik değişiklikler saptandı. Disk difüzyon yöntemine göre *S. warneri* izolatının en duyarlı olduğu antibiyotik doxycycline olduğu belirlendi. Gökkuşuğu alabalıklarında yapılan daha önceki çalışmalarda *S. warneri* türü izole edilmekle birlikte bu çalışma ile ilk kez *S. warneri* türünün organlardaki histopatolojik etkileri belirlenmiştir.

#### Anahtar kelimeler

- Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)
- Staphylococcus warneri*
- 16 S rRNA
- sodA* geni
- Histopatoloji

**Abstract:** This study was conducted to identify the disease that caused mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in the Aegean and Mediterranean regions in March 2022. External examination of infected trout revealed bilateral exophthalmos, hemorrhage in the lower jaw, dropsy, anemia in the liver, yellow exudate accumulation in the digestive system, hemorrhage in the adipose tissue and anus area, and spleen enlargement. A Gram-positive bacterium, *Staphylococcus warneri*, was isolated from infected fish's liver and anterior kidney. *S. warneri* was identified using morphological features, some conventional biochemical tests, and molecular genetic methods utilizing the 16S rRNA and *sodA* gene regions. Histopathological examination showed infiltration in the liver tissue, hyperemia in the spleen tissue, and necrotic changes in the kidney tubular epithelium of infected fish. According to the disk diffusion method, doxycycline was determined to be the most sensitive antibiotic against the *S. warneri* isolate. Although *S. warneri* was isolated in previous studies on rainbow trout, its histopathological effects on organs were determined for the first time in this study.

- Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)
- Staphylococcus warneri*
- 16 S rRNA
- sodA* gene
- Histopathology

## 1. GİRİŞ

Balıkların yaşadığı su ortamı ve sediment mikrobiyotası deri, solungaç ve sindirim sistemindeki mikrobiyal çeşitliliğin ve miktarın belirlenmesinde etkin rol oynamaktadırlar. Bu ortamlarda bulunan fırsatçı patojenler ise balıkların bağışıklık sistemlerinin zayıflamasıyla birlikte yüksek ölüm oranları ile dikkati çeken hastalıklara neden olurlar (Korun vd., 2019; Atanasoff & Urku, 2022). Bu patojenlerden biri olan, *Staphylococcus warneri*, sağlıklı balıkların derisindeki mikrobiyotanın bir



bileşeni olarak bulunmaktadır. Gram pozitif bir bakteri olan *S. warneri*, ABD' nin New Mexico eyaletinde bulunan bir kuluçkahanede yetiştirilen sağlıklı gökkuşuğu alabalığının deri mukusundan izole edilmiştir (Musharrafieh, 2014). İspanya' nın kuzeybatısında yapılan bir diğer çalışmada enfekte gökkuşuğu alabalıklarının yüzgeçlerinde ülserli deri lezyonları ve ekzoftalmus dikkati çekmiş, inceleme sonucunda *S. warneri* türü tanımlanmıştır (Gil vd., 2000). Metin vd, (2014) yaptıkları çalışmada enfekte anaç gökkuşuğu alabalıklarında letarji yanı sıra göz, çene, ağız ve anüste hemoraji gibi belirtiler tespit etmişler ve inceleme sonucunda *S. warneri* enfeksiyonunu bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Sibiryâ mersin balıklarında (*Acipenser baerii*) ve hibrit mersin balıklarında (*Huso huso x Acipenser baerii*), *S. warneri* ve *S. putrefaciens* koenfeksiyon vakası bildirilmiştir (Rusev vd., 2016). Çin' de ise *S. warneri* enfeksiyonunun neden olduğu bir salgında *C. guichnoti* balık türünde çok sayıda ölüm gözlenmiştir (Xiao vd., 2022). Ayrıca zoonotik karakterde olan *S. warneri*' nin insanlarda menenjit, endokardit ve septik artrite neden olduğu bildirilmiştir (Wood, 1992).

Bu çalışmanın amacı Ege ve Akdeniz Bölgesinde yer alan farklı alabalık işletmelerinde mortaliteye neden olan hastalık etkeninin tespiti, identifikasyonu ve izole edilen etkenin dokulara verdiği hasarı tespit etmektir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Hasta balıkların örneklenmesi

Çalışmada, Ege (n=10) ve Akdeniz (n=15) bölgesinde yer alan iki farklı ticari alabalık işletmesinden ortalama ağırlığı 7,5-10 g olan toplam 25 adet balık temin edilmiştir ve Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları laboratuvarına canlı olarak nakledilmiştir. Örneklemeler, ilgili işletmelerden hastalık çıkışının bildirildiği Mart (2022) ayında yapılmıştır. Örneklemenin yapıldığı tarihte, yoğun yağmur yağışı olduğu belirtilmiş ve tesislerdeki su sıcaklığı 11°C, oksijen 10,8 ppm, pH 7,3 olarak ölçülmüştür.

Hastalık belirtisi gösteren yeni ölmüş balıkların dış yüzeyleri makroskobik olarak incelenmiş ve mikrobiyolojik incelemeler için deri, solungaç ve yüzgeç kısımlarından örnekler alınmıştır.

### 2.2. Patojenin izolasyon ve identifikasyonu

Patojenin izolasyonu amacıyla 25 adet balığın karaciğer, dalak ve ön böbreklerinden Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerlerine ekimler yapılmış ve petriyerler 25°C' de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteriler saflaştırılmış ve geleneksel teknikler (Gram boyama, katalaz ve sitokrom oksidaz testleri, hareket testi (asılı damla yöntemiyle), O/F testi (Hugh-Leifson vasatı) kullanılarak identifiye edilmiştir (Bergey & Holt, 1994; Gil vd.,2000).

### 2.3. Bakteriyal DNA izolasyonu ve PZR protokolü

Bakteri kültürlerinden tek koloniler alınarak 50 ml' lik nutrient sıvı besiyerinde (NB) (Merk, Almanya) 37°C' de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından suşlar 2000 rpm' de 5 dk santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Elde edilen peletteki bakteriler PBS (Merk, Almanya) tamponu ile 2 kez yıkandıktan sonra bu örnekler DNA izolasyonu için kullanılmıştır. DNA izolasyonu ticari bir kit olan DNeasy Blood&Tissue Kiti (Qiagen, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel DNA izolasyonu bu kitin protokolüne göre yapılmıştır. İzole edilen DNA' lar %1' lik agaroz jelde yürütülerek DNA kalitesi kontrol edilmiştir.

Bakterilerin moleküler tanımlanabilmesi için üç farklı primer kullanılmıştır. İlk olarak 16S rRNA gen bölgesini çoğaltmak için 16S rRNA evrensel primeri 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') ve 1387r (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') kullanılmıştır (Marchseive vd., 1998). *S. warneri* türlerini ayırt edebilmek ve doğrulayabilmek için türe özgü *sodA* gen bölgesini (superoxide dismutase A) çoğaltabilmek için iki ayrı primer daha kullanılmıştır (Kim vd., 2018). Bunlar *S. pasteurii* için PA237F (5'-GCTAATTTAGACAGTGTACCTTCTG-3') ve PA237R (5'-GCCCGTTATTTACTACTAACCA-3') primer çifti, *S. warneri* için SW110F (5'-GTAACAAAATTAATGCAGCTG-3') ve SW110R (5'-TCTTACTGCAGTTTGAATATCAGA-3') primer çiftidir.

16S rRNA gen bölgesinin Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması için 25 µL hacimde 1xPCR tamponu, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 pmol her bir primer, 0,1 mM dNTP karışımı ve 0,1 U Taq polimeraz (Fermantas, Almanya) enzimi içeren reaksiyon karışımı kullanılmıştır. PZR koşulları 95°C' de 5 dk başlangıç denatürasyonu ardından 30 döngü boyunca 95°C' de 1 dk, 55°C' de 1 dk, 72°C' de

1,5 dk ve son olarak 72°C' de 10 dk son uzama şeklinde ayarlanmıştır. *SodA* gen bölgelerini PZR ile çoğaltmak için hazırlanan karışımlar 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması koşullarıyla aynı olup için termal döngü şartları Kim vd. (2018)' e göre belirlenmiştir. Elde edilen tüm PZR ürünleri %1,5' luk agaroz (Amplichem, Almanya) jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Çoğaltılan 16S gen bölgesi Makrogen (Hollanda) firmasından hizmet alımı yoluyla çift yönlü olarak dizilenmiştir. Diziler gen bankasına OR144346 ve OR144247 numaraları ile kaydedilmiştir.

16S rRNA gen bölgesi ile ilgili elde edilen PZR-dizileri ve gen bankasında yer alan diğer 16S RNA gen dizileri ile karşılaştırılma yapılmıştır. 16S rRNA gen bölgesi dizileme sonucunda elde edilen kromatogramlar Codoncode Aligner 6.0.2 (CodonCode Corporation) programında açılarak piklerin kalitesi kontrol edilmiştir. Konsensus dizileri alınarak Genbank veri tabanında BLASTn (Altschul vd., 1997) algoritması kullanılarak veri tabanındaki dizilerle benzerliği kontrol edilmiştir.

Genbank veri tabanından çoğaltılan gen bölgesinin uzunluğuna uygun dizilerden rastgele seçilerek filogenetik ağaç inşası gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaç inşası için MEGA X (Kumar vd., 2018) programında ClustalW algoritması kullanılarak hizalanan dizilerin mutasyon modelinin belirlenmesi için jModelTest (Posada, 2008) programı kullanılmıştır. Filogenetik ağaç inşası Mr. Bayes v3.2 (Ronquist vd., 2012) programı kullanılmıştır. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) analizi 4 zincir üzerinden gerçekleştirilmiş ve split frequency 0.01' in altına düşene kadar 10 milyon jenerasyon boyunca analiz gerçekleştirilmiştir. Her 1000 jenerasyonda bir örnekleme yapılarak elde edilen ağaçların %25' i burn-in yapılarak uzaklaştırılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen konsensus ağacı Figtree v1.4.2 (Rambaut, 2014) programında düzenlenmiştir.

#### **2.4. Antimikrobiyal duyarlılık testi**

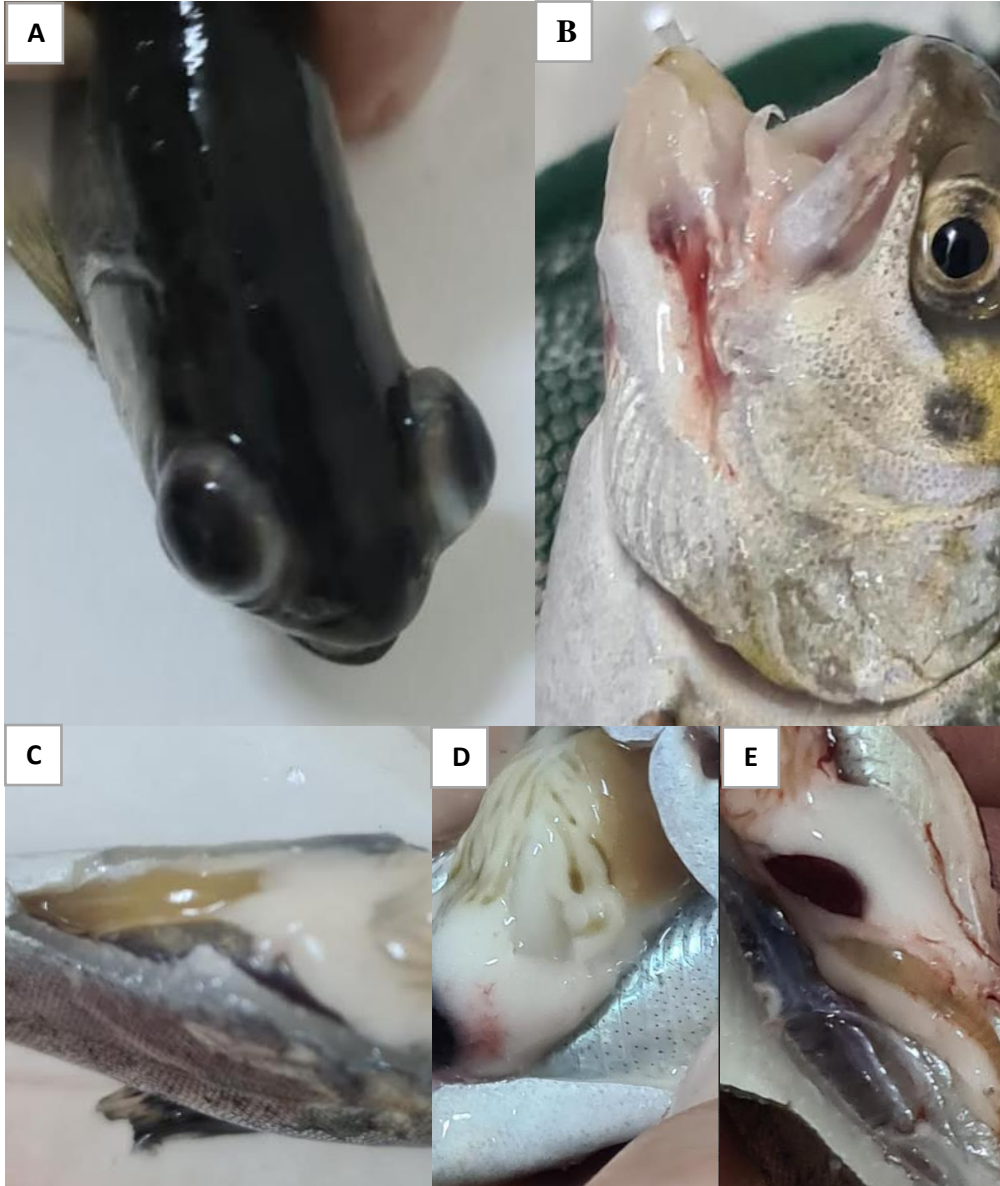
Antibiyotik duyarlılık testi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile Mueller Hinton Agar besiyerinde yapılmıştır. Bu testte oxolinic acid, gentamicin, penicillin, oxacillin, florfenicol, apramycin, ofloxacin, enrofloxacin, streptomycin, amoxicillin, colistin, cefoperazone, oxytetracycline, cephalothin, norfloxacin, tylosin, tetracycline, sulphamethoxazole, doxycycline, kanamycin, spectinomycin, pristinamycin, nalidixic acid, cefurocime, lincomycin, chloramphenicol, ampicillin, clindamycin, flumequine, nitrofurantoin, vancomycin, erythromycin ve ceftriaxone antibiyotikleri kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerine yerleştirilen antibiyotik diskler etrafındaki zon çapları ölçülerek NCCLS kriterlerine göre her bir antibiyotik için duyarlı veya dirençli olarak belirlenmiştir (Weinstein & Lewis, 2020).

#### **2.5. Histopatolojik incelemeler**

Ortalama ağırlığı 0,75-10 gr olan toplam 10 adet balık disekte edilmiş ve karaciğer, böbrek ve dalak dokuları %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde tespit edilmiştir. Tespit edilen doku örnekleri rutin doku takip işleminden geçirilerek parafine gömülmüştür. Dokulardan mikrotom ile 5 µm' lik kesitler alınmıştır. Daha sonra alınan doku kesitleri hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyanmış ve ışık mikroskobu (Olympus CX21, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) altında incelenerek değerlendirilmiştir (Bancroft & Stevens, 1990).

### **3. BULGULAR**

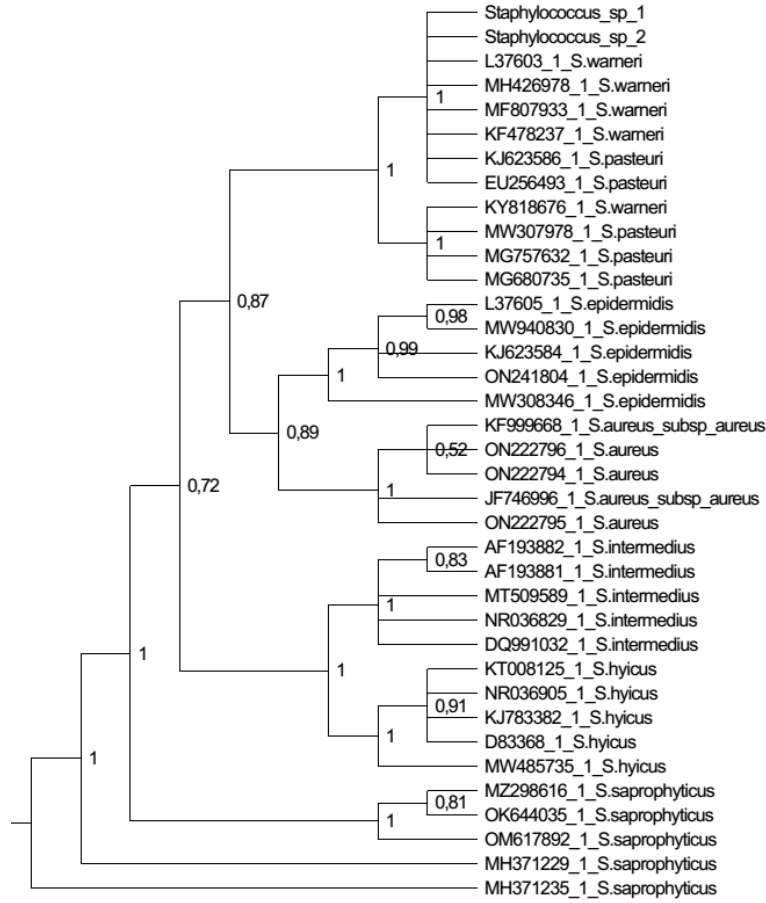
İşletmelerden alınan enfekte yavru gökkuşağı alabalıklarında yapılan dış incelemede; gözlerde bilateral ekzoftalmus, alt çenede kanama, dropsi, iç organlarda anemi (karaciğer ve böbrek), sindirim kanalında sarı yeşil sıvı, yağ dokuda hemoraji, anüs bölgesinde kanama, dalak dokusunda büyüme dikkati çekmiştir (Şekil 1). Aseptik koşullar altında hasta balıkların ön böbrek, karaciğer ve dalak dokularından TSA besiyerine yapılan bakteriyel ekim sonucunda 1,5-2 milimetre çapında küçük beyaz koloniler görülmüştür. Elde edilen izolatların Gram boyama sonucunda Gram pozitif, stafilokok morfolojisinde olduğu görülmüş olup oksidazı negatif, katalazı pozitif, O/F testi ise fermantatif olarak tespit edilmiştir.



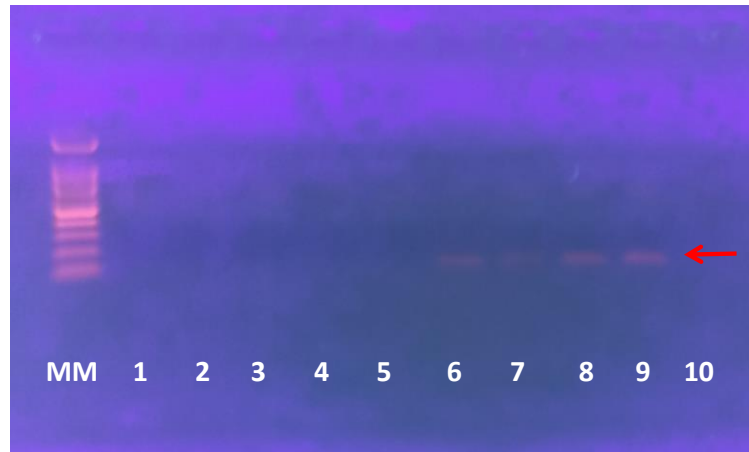
**Şekil 1.** A-Yavru balıklarda gözlerde ekzoftalmus, B-alt çenede kanama, C-sindirim sisteminde sarı eksudat, D-anemik solgun karaciğer, E-yağ dokuda kanamalar, dalakta büyüme

Alabalık örneklerinden izole edilen bakteri süşunun bazı biyokimyasal testlere ilave moleküler biyolojik tanımlama için 16S rRNA ve türe özgül teşhis için seçilen *sodA* gen bölgesini kullanılarak PZR analizleri yapılmıştır. Toplamda 88 mutasyon modeli üzerinden Bayesian Information Criteria (BIC) ile yapılan değerlendirme sonucunda mutasyon modeli JC olarak belirlenmiştir. Filogenetik analizlerdeki gen dizilerinin birbirine benzerlik oranı %98 ile *S. warneri* (Şekil 2) bulunmuştur.

Filogenetik analizlerdeki gen dizilerinin birbirine benzerlik oranı %98 yüksek olmasından dolayı daha tür özgül olan PA237F/ PA237R ve SW110F/ SW110R primerleri denenmiştir. Bu türe özgül belirleyici PZR analizlerinin sonucunda çalışılan örneğin *S. warneri* olduğu doğrulanmıştır (Şekil 3). Şekil 3' de agaroz jelde görülen bantlar *S. warneri* pozitif PZR gen bantlarını göstermektedir.

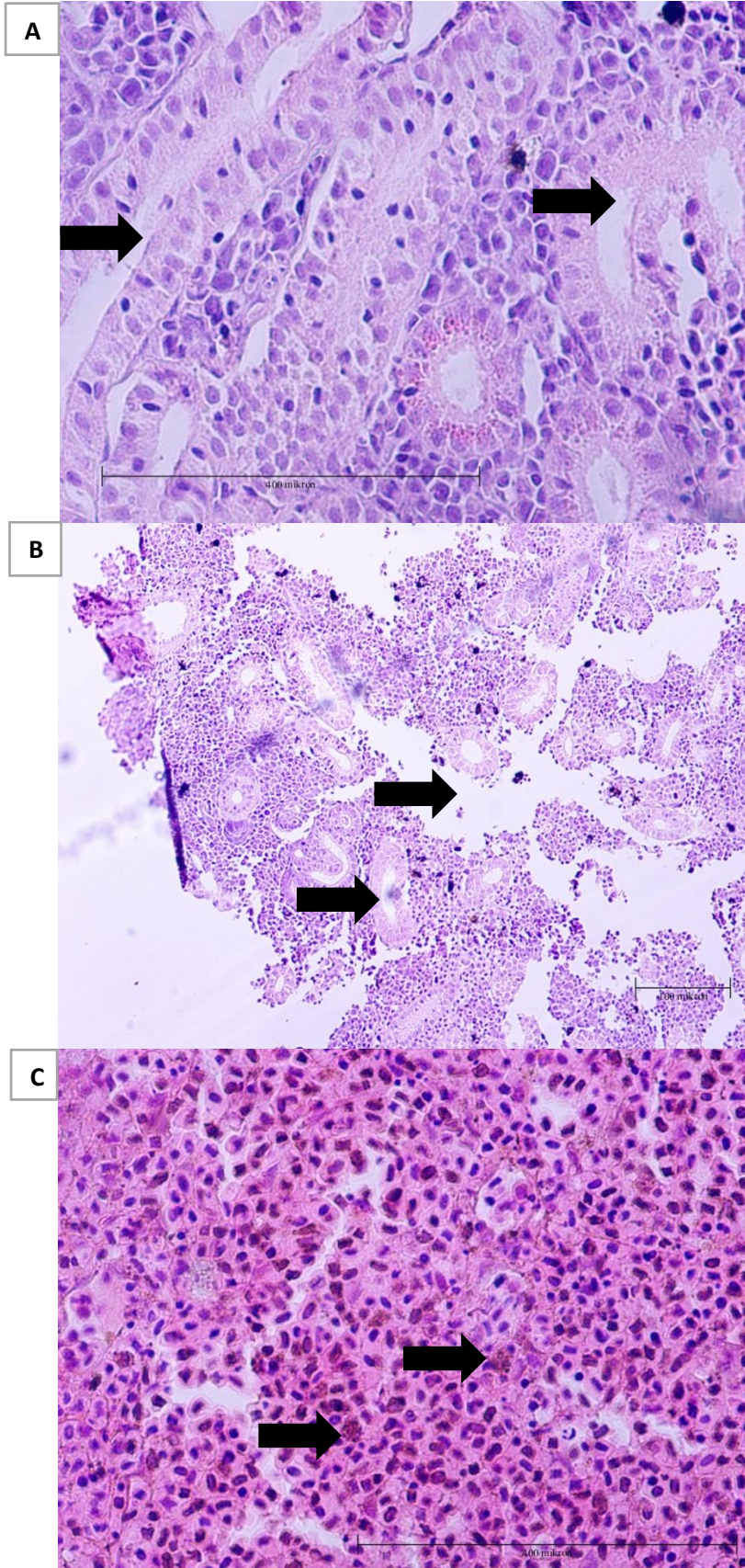


Şekil 2. 16S rRNA gen bölgesi kullanılarak çizilen filogenetik ağaç

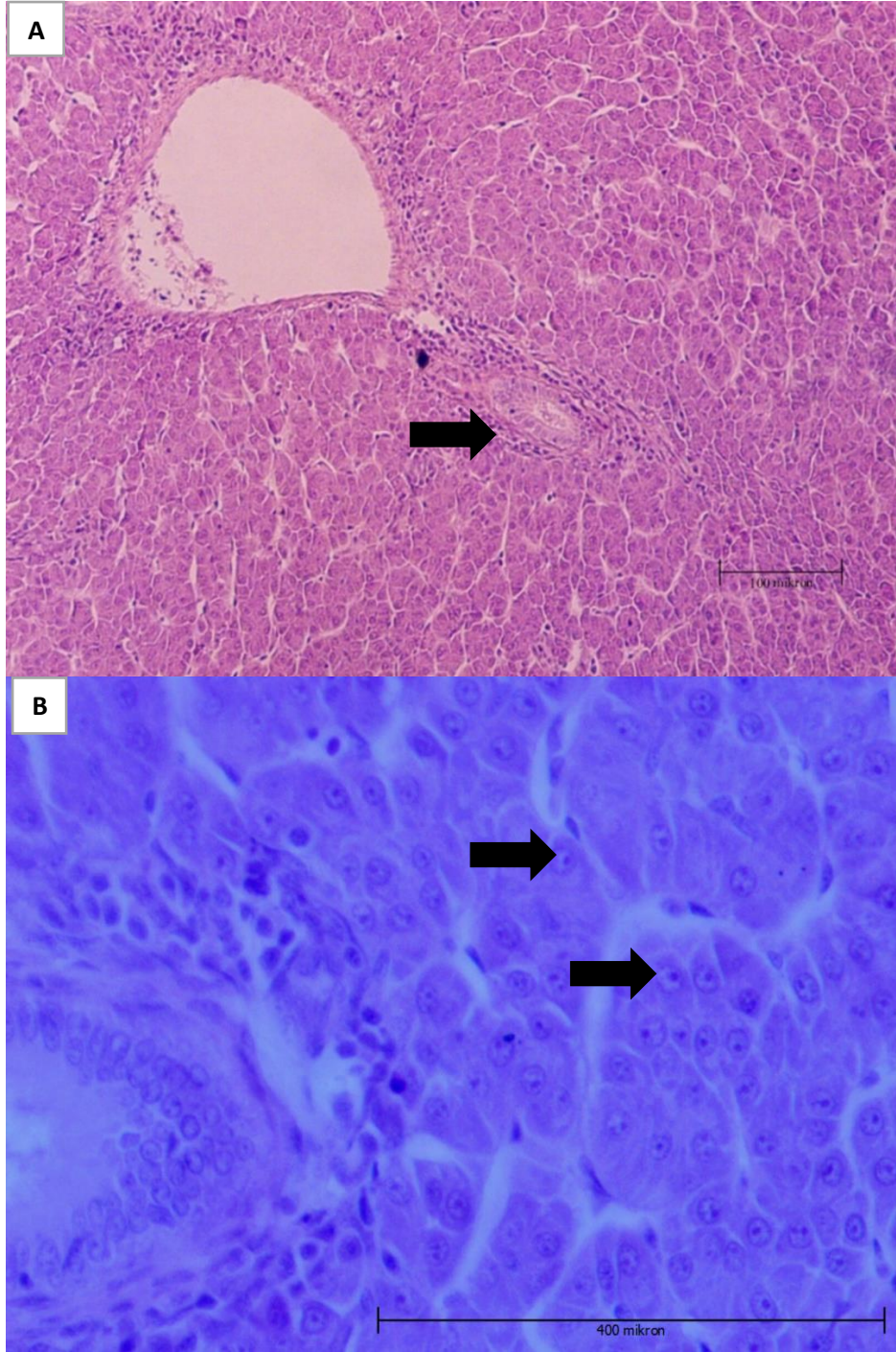


Şekil 3. Tür spesifik primerler kullanılarak elde edilen PZR ürünleri (Moleküler Markır; MM, 100 bp DNA markır; 1-4. *S. pasteuri* spesifik primeri (PA237) PZR ürünleri; 5. *S. pasteuri* spesifik primeri için negatif kontrol; 6-9. *S. warneri* spesifik primeri (SW110) PZR ürünleri; 10. *S. warneri* spesifik primeri için negatif kontrol

Histopatolojik incelemelerde, enfekte balıkların böbrek dokusunda tübüllerde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler, dalak dokusunda; kırmızı pulpa ve beyaz pulpa sınırında kayıp ve splenitis, karaciğer dokusunda vena centralis çevresinde yangısal infiltrasyon ve hepatositlerde dejenerasyon görülmüştür (Şekil 4 ve 5).



**Şekil 4.** A-B-Böbrek tübül hücrelerinde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler (oklar) H&E 400-100 $\mu$ m, C- Dalakta yangı hücreleri (oklar) H&E 400  $\mu$ m.



**Şekil 5.** A- Karaciğerde cenral vena evresinde yangısal infiltrasyon (ok) H&E 100 µm, B- Hepatositlerde dejenerasyon (oklar) H&E 400 µm.

Antibiyoqram testi sonucunda izole edilen etkenin gentamicin, florfenicol, apramycin, ofloxacin, enrofloxacin, streptomycin, cefoperazone, cephalothin, norfloxacin, sulphamethoxazole, doxycycline, kanamycin, pristinamycin, cefurocime, chloramphenicol, flumequine, vancomycin ve ceftriaxone antibiyotiklerine duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** *S. warneri* suşunun antibiyogram test sonuçları

Antibiyotik	Çap(mm)	Direnç/Duyarlılık
Oxolinic Acid	15	I
Gentamicin	21	S
Penicillin	11	I
Oxacillin	-	R
Florfenicol	28	S
Apramycin	17	S
Ofloxacin	32	S
Enrofloxacin	32	S
Streptomycin	25	S
Amoxicillin	15	I
Colistin	-	R
Cefoperazone	24	S
Oxytetracycline	10	R
Cephalothin	16	S
Norfloxacin	30	S
Tylosin	10	R
Tetracycline	14	I
Sulphamethoxazole	24	S
Doxycycline	34	S
Kanamycin	25	S
Spectinomycin	-	R
Pristinamycin	20	S
Nalidixic Acid	13	I
Cefurocime	28	S
Lincomycin	15	I
Chloramphenicol	29	S
Ampicillin	8	R
Clindamycin	-	R
Flumequine	33	S
Nitrofurantoin	15	I
Vancomycin	19	S
Erythromycin	8	R
Ceftriaxone	22	S

“S” = Duyarlı (d > 15 mm); “I” = Orta (10 mm < d ≤ 15 mm); “R” = Dirençli (d ≤ 10 mm)

#### 4. TARTIŞMA

*Staphylococcus* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar balıklarda septisemi ile karakterize sistemik hastalıklara neden olmaktadır (Shah & Tyagy 1986). *Staphylococcus* türlerinin sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*) ve kırmızı mercan (*Pagrus major*) (Kusuda & Sugiyama, 1981), gümüş sazanı (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Shah & Tyagi, 1986), ot sazanı (*Ctenopharyngodon idella*) (Wang vd., 1996), tilapia (*Oreochromis sp.*) (Huang vd., 1999), gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (Gil vd., 2000; Timur & Akaylı, 2003, Akaylı vd., 2011; Metin vd., 2014, Turgay vd., 2015), çipura (*Sparus aurata*) (Kubilay & Uluköy, 2004), levrek (*Dicentrarchus labrax*) (Korun vd., 2019; Çanak & Timur, 2020; Atanasoff & Urku, 2022), siraz (*Capoeta capoeta*) (Akaylı vd., 2019) ve sinarit (*Dentex dentex*) (Akaylı vd., 2011) balıklarında enfeksiyon etkeni olduğu tespit edilmiştir.

*S. warneri*, balık ve diğer hayvan türlerinden izole edilmiş bir bakteri türüdür (Metin vd., 2014; Çanak & Timur 2020; Haag vd., 2019) Gökkuşuğu alabalığında yüzgeçlerde ülserli deri lezyonları, ekzoftalmus, abdomende asidik sıvı birikimi, karaciğerde anemiye neden olduğu bildirilmiştir (Gil vd, 2000). 1500-2000 g ağırlığındaki anaç gökkuşuğu alabalıklarında *S. warneri*' nin neden olduğu enfeksiyonda letarji, anorexia, anal yüzgeç kaidelerinde aşınma, göz, çene ve ağızda kanama, renk koyulaşması, iç organlarda anemi, karaciğerde peteşiyel kanama, splenomegali ve barsakta sarı renkli eksudat bildirmiştir (Metin vd., 2014). Bu çalışmada ise, Gil vd. (2000), Metin vd. (2014)' den farklı olarak enfekte yavru gökkuşuğu alabalıklarının dış incelemesinde deride bir değişim olmadığı ancak balıklarda gözlerde bilateral ekzoftalmus, alt çenede kanama, dropsi, iç organlarda (karaciğer, böbrek) anemi, sindirim kanalında sarı eksudat, yağ dokuda hemoraji, anüs bölgesinde kanama, dalak dokusunda büyüme gibi belirtilerin benzer olduğu dikkati çekmiştir.

Histopatolojik çalışmalar, balık patojenlerinin dokuda bıraktığı hasarı ortaya koyan bunun yanında bazı hastalıkların teşhisine yönelik sonuçlar veren önemli bir araçtır. *S. warneri* ile enfekte balıklarda yapılan çalışmalarda hastalığın teşhisinde daha çok bakteriyolojik ve moleküler yöntemler kullanılırken, etkenin balık dokularında neden olduğu patolojik bozukluklar ile ilgili araştırmalar çok sınırlı kalmıştır. Rusev vd. (2016) yaptığı çalışmada mersin balıklarında (*Acipenser baerii*) ve hibrit



mersin balıklarında (*Huso huso x Acipenser baerii*) *Staphylococcus warneri* ve *Shewanella putrefaciens* ko-enfeksiyonunun balık dokularındaki etkilerini incelemişlerdir. Patolojik bulgularda, dalakta hiperemi, karaciğerde yüzeysel peteşiyal kanamalar ve mezenterik kan damarlarında hiperemi görülmüştür. Bir başka çalışmada, mersin balıklarında (*Acipenser gueldenstaedtii*) *Staphylococcus pasteurii*' nin neden olduğu enfeksiyonlarda histopatolojik incelemeler yapılmış ve nekrotik hepatosit hücrelerinin çevresinde lenfosit infiltrasyonu; böbrekte nekroz, dalakta hiperemi ve yoğun hemorajik alanlar belirlenmiştir (Atanasoff ve Urku, 2022). Bu çalışmada ise enfekte gökkuşuğu alabalıklarının karaciğer dokusunda yangı hücrelerinin infiltrasyonu, dalak dokusunda hiperemi, böbrek tübül epitellerinde nekrotik değişiklikler görülmüştür. Bulgularımıza benzer bir şekilde *S. warneri* ile enfekte *C. guichmoti*' nin kas, solungaç, karaciğer, dalak, böbrek dokusunda patolojik değişiklikler tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada enfekte balıkların karaciğer dokusunda, önemli derecede yangı hücre infiltrasyonu, dalak dokusunda hiperemi, böbrek dokusunda hiperemi ve tübüllerde nekrotik değişiklikler görülmüştür (Xiao vd., 2022).

*S. warneri* türünün streptomycin, doxycycline, ampicilin, florfenikol antibiyotiklerine duyarlı olduğu ve enfekte balıklarda hastalığın, doksisisiklin kullanıldıktan sonra etkili bir şekilde kontrol altına alındığı bildirilmiştir (Xiao vd., 2022). Metin vd., (2014) yaptığı bir başka çalışmada ise gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen *S. warneri*' nin florfenicol, enrofloxacin, doxycyclin, clindamycin, kanamycin, gentamicin, vancomycin antibiyotiklerine duyarlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da Metin vd., (2014)' nin sonuçlarına benzer bir şekilde *S. warneri*' nin söz konusu antibiyotiklere duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, yavru balıktan elde edilen ve konvansiyonel testlerle tanımlanamayan izolatlarının 16S rRNA gen bölgesinin PZR analizi ve sonrasında dizi analizi yapılmıştır. Genellikle moleküler bakteri tanımlanmasında kullanılan 16S rRNA universal gen bölgesi seçilmiştir. Şekil 2'de görülen 16S rRNA gen bölgesinin dizi analizi sonucunda elde edilen filogenetik ağaç bulgusunda *S. warneri*' nin diğer bir *Staphylococcus* türü olan *S. pasteurii*' ye benzerlik oranı %98 olarak bulunmuştur (Şekil 2). Metin vd., (2014) yaptığı bir çalışmada yetişkin gökkuşuğu alabalıklarından *S. warneri*' yi ilk kez izole etmişler ve konvansiyonel tanımlama yöntemlere ilave olarak 16SrRNA gen dizi analizi kullanarak bakteriyi *S. warneri* olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmaya göre izole edilen örnek filogenetik analiz sonucunda *S. warneri* ATCC 27836 %99,6 oranında ve *S. pasteurii* suşlarına ise %98 oranında benzer olduğu bulgusunu raporlamışlardır. Ancak *S. warneri* suşunun koloni renginin beyaz olduğu ve bu da sarı koloni oluşturan *S. pasteurii* türünden farklı olduğunu göstermektedir (Atanasoff ve Urku, 2022). Bizim sonuçlarımızda bu bulgularla örtüşmektedir.

Ancak, her ne kadar 16S rRNA filogenetik dizi analiz sonucu oldukça güvenilir olmasına rağmen yakın türlerin tanımlanmasında %98 gibi yüksek benzerlik vermesi durumda yeterli olmadığı ve yanlış tür tanımlamalarına neden olan sonuçlar verdiği düşünülmektedir (Kim vd., 2018; Ghebremedhin vd., 2008; Taponen vd., 2009). Çalışmamızda 16S rRNA gene dizi analizi benzerlik oranının oldukça yüksek çıkması nedeniyle daha tür spesifik ve korunmuş bir gen bölgesi olan *sodA* gen bölgesinin PZR analizleri yapılmıştır ve bunun sonucu olarak örneğimizin *S. warneri* türü olduğu doğrulanmıştır. Bu sonucun literatürde stafilokokusların tür tanımlanması için kullanılan korunmuş gen bölgesi ile yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu bulunmuştur (Kim vd., 2018).

## 5. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada enfekte yavru dönemdeki gökkuşuğu alabalıklardan fırsatçı bir patojen olan *S. warneri* türü teşhis edilmiş, ilk kez organlardaki histopatolojik etkileri belirlenmiş ve antibiyotik duyarlılık özellikleri de tespit edilmiştir.

## FİNANS

Bu çalışmanın yürütülmesinde herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

## TEŞEKKÜR

Yazarlar Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi ve Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarlarına teşekkür etmektedir.

## YAZAR KATKILARI

Kurgu: Ö.Ö., Ö.D., M.N., İ.T.Ç., H.E.Y.; Metodoloji: Ö.Ö., Ö.D., M.N., İ.T.Ç., H.E.Y.; Deneyin gerçekleştirilmesi: Ö.Ö., Ö.D., M.N., İ.T.Ç., H.E.Y., Ş.K.; Veri analizi: Ö.Ö., M.N., İ.T.Ç., H.E.Y.; Makale yazımı: Ö.Ö., Ö.D., M.N., İ.T.Ç., H.E.Y.; Denetleme: Ö.Ö., Ö.D., M.N., İ.T.Ç., H.E.Y.; Tüm yazarlar nihai taslağı onaylamıştır.

## ETİK ONAY BEYANI

Araştırmada hastalık belirtisi gösteren yeni ölmüş balıklarda Deney Hayvanı Kullanım Sertifikasına sahip kişilerce incelemelerde bulunulmuştur. Deneysel uygulama yapılmaması nedeniyle etik kurul onay beyanına gerek yoktur.

## VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

Bu çalışmada kullanılan veriler makul talep üzerine ilgili yazardan temin edilebilir.

## KAYNAKLAR

- Akaylı, T., Ürkü, Ç., & Başaran, B. (2011). Kültür balıklarında *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* enfeksiyonu. *Aquatic Sciences and Engineering*, 26(2), 1-12.
- Akaylı, T., Urku, C., & Bozkurt, E. R. (2019). Determination of Co-infection in Diseased Seven khramulya (*Capoeta capoeta*). *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22(6), 965-971. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.544200>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Atanasoff, A., & Urku, C. (2022). Isolation of *Staphylococcus pasteurii* in the cultured Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) in Bulgaria. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 32(4), 961-967. <http://doi.org/10.36899/JAPS.2022.4.0498>
- Bancroft, J. D. & Stevens, A. (1990). *Theory and practice of histopathological techniques (3rd ed.)*. Churchill Livingstone.
- Bergey, D. H., & Holt, J. G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th Edition)*. Williams & Wilkins.
- Codoncode Aligner, CodonCode Corporation. Available from <https://www.codoncode.com/index.htm> (Erişim tarihi: 26.07.2022).
- Çanak, Ö., & Timur, G. (2020). An initial survey on the occurrence of staphylococcal infections in Turkish marine aquaculture (2013–2014). *Journal of Applied Ichthyology*, 36(6), 932-941. <https://doi.org/10.1111/jai.14141>
- Ghebremedhin, B., Layer, F., Konig, W., & Konig, B. (2008). Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 46(3), 1019–1025. <https://doi.org/10.1128/JCM.02058-07>
- Gil, P., Vivas, J., Gallardo, C. S., & Rodriguez, L. A. (2000). First isolation of *Staphylococcus warneri*, from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in northwest Spain. *Journal of Fish Diseases*, 23(4), 295-298. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00244.x>
- Haag, A. F., Fitzgerald, J. R., & Penadés, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus* in Animals. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 7-3. <http://dx.doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019>
- Hoag A. F., Fitzgerald, J. R., & Penades, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus* in Animals. *American Society For Microbiology*. 7(3), 11. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0060-2019>

- Huang, S. L., Chen, W. C., Shei, M. C., Liao, I. C., & Chen, S. N. (1999). Studies on epizootiology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in tilapia (*Oreochromis spp.*) cultured in Taiwan. *Zoological Studies*, 38(2), 178-188.
- Kim, J., Hong, J., Lim, J. A., Heu, S., & Roh, E. (2018). Improved multiplex PCR primers for rapid identification of coagulase-negative staphylococci. *Archives of microbiology*, 200(1), 73-83. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1415-9>
- Korun, J., Yılmaz, M., Gökoğlu, M., & Çelik, Y. (2019). Isolation of *Staphylococcus hominis* from cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in Antalya Bay, Turkey. *Journal of Agricultural Sciences*, 25(1), 123-128. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.539018>
- Kubilay, A., & Ulukoy, G. (2004). First isolation of *Staphylococcus epidermidis* from cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Turkey. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 24(3), 137-143. <https://hdl.handle.net/20.500.12809/5368>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kusuda, R., & Sugiyama, A. (1981). Studies on the Characters of *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Diseased Fishes-I On the Morphological, Biological and Biochemical Properties. *Fish Pathology*, 16(1), 15-24. <https://doi.org/10.3147/jsfp.16.15>
- Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J., & Wade, W. G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 64(2), 795-799. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.795-799.1998>
- Metin, S., Kubilay, A., Onuk, E. E., Didinen, B. I., & Yildirim, P. (2014). First isolation of *Staphylococcus warneri* from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 34(5), 165-174.
- Musharrafieh, R., Tacchi, L., Trujeque, J., LaPatra, S., & Salinas, I. (2014). *Staphylococcus warneri*, a resident skin commensal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with pathobiont characteristics. *Veterinary microbiology*, 169(1-2), 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.012>
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular biology and evolution*. 25. 1253-6. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Rambaut, A. (2014). Figtree v1.4.2. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> (Erişim tarihi: 26.07.2022).
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rusev, V., Rusenova, N., Simeonov, R., & Stratev, D. (2016). *Staphylococcus warneri* and *Shewanella putrefaciens* Co-infection in Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*) and Hybrid Sturgeon (*Huso huso* x *Acipenser baerii*). *Journal of Microbiology & Experimentation*, 3(1), 00078. <http://dx.doi.org/10.15406/jmen.2016.03.00078>
- Shah, K. L., & Tyagi, B. C. (1986). An eye disease in silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*, held in tropical ponds, associated with the bacterium *Staphylococcus aureus*. *Aquaculture*, 55(1), 1-4. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90050-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90050-5)
- Taponen, S., & Pyörälä, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary microbiology*, 134(1-2), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.011>
- Timur, G., & Akayli, T. (2003, 23-26 October). First study of staphylococcosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in Turkey. *International symposium on fisheries & zoology*, Istanbul, Turkey.
- Turgay, E., Karataş Stenium, S., & Candan, A. (2015). Kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* enfeksiyonu. *Aquatic Sciences and Engineering*, 30(1), 11-22. <https://doi.org/10.18864/ijufas.86779>

- Wang, W. S., Chang, Y. C., Shieh, M. T., & Lin, C. C. (1996). *Staphylococcus epidermidis* and cestode infection of cultured grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in Taiwan. *Reports on Fish Disease Research*, 17, 57-63.
- Weinstein, M. P., & Lewis, J. S. (2020). The clinical and laboratory standards institute subcommittee on antimicrobial susceptibility testing: background, organization, functions, and processes. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(3), e01864-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01864-19>
- Wood, C. A. (1992). Significant infection caused by *Staphylococcus warneri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(8), 2216. <https://doi.org/10.1128%2Fjcm.30.8.2216-2217.1992>
- Xiao, Z., Xue, M., Wu, X., Zeng, L., Zhu, Y., Jiang, N., Fan, Y., & Zhou, Y. (2022). Isolation and identification of *Staphylococcus warneri* from diseased *Coreius guichenoti*. *Aquaculture Reports*, 22, 100988. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100988>
-