



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
VPT-DR-2009-0001

***VIBRIO ANGUILLARUM* İLE ENFEKTE EDİLEN
GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA
(*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALBAUM, 1792)
MORFOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL
İNCELEMELER**

Hamdi AVCI

**DANIŞMAN
Prof. Dr. S. Serap BİRİNCİOĞLU**

AYDIN - 2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI
VPT-DR-2009-0001

***VIBRIO ANGUILLARUM* İLE ENFEKTE EDİLEN
GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA
(*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALBAUM, 1792)
MORFOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL
İNCELEMELER**

Araş. Gör. Hamdi AVCI

DANIŞMAN
Prof. Dr. S. Serap BİRİNCİOĞLU

AYDIN – 2009

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

Patoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Hamdi AVCI tarafından hazırlanan “*Vibrio anguillarum* ile enfekte edilen Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972) morfolojik ve immunohistokimyasal incelemeler” başlıklı tez, 24/06/2009 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1. Prof. Dr. Nursal METİN

ADÜ-Veteriner Fakültesi

2. Prof. Dr. Hüdaverdi ERER

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fak.

3. Prof. Dr. Serap BİRİNCİOĞLU

ADÜ-Veteriner Fakültesi

4. Doç. Dr. Nihat TOPLU

ADÜ-Veteriner Fakültesi

5. Doç. Dr. Recai TUNCA

ADÜ-Veteriner Fakültesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıylatarihinde onaylanmıştır.

Doç. Dr. Muharrem BALKAYA
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Son yıllarda Türkiye’de de görülmeye başlayan ve balıkların önemli bakteriyel patojenlerinden biri olan *Vibrio anguillarum*’un sebep olduğu vibriozis, gökkuşığı alabalıklarında hemorajik septisemiler sonucu büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Vibrio anguillarum*’unda özellikle O1 suşu balık türleri içerisinde en fazla izole edilen ve şiddetli patojeniteye sahip suşdur. Vibriozisin, Türkiye’de tuzlu ve tatlı su balıkçılığında önemli bir yere sahip olması ve Ege Bölgesi’nde de görülmesi nedeniyle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada gökkuşığı alabalıklarında oluşturulan deneysel vibriozisde, hastalığın makroskopik ve mikroskopik bulguları kapsamlı olarak değerlendirilmiş, ayrıca immunoperoksidaz yöntemiyle de bakteriyel antijenin doku ve organlardaki dağılımı ayrıntılı olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışma, “*Vibrio anguillarum* ile enfekte edilen gökkuşığı alabalıklarında *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) morfolojik ve immunohistokimyasal incelemeler” isimli ve VTF-07022 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’nin desteği ile gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY.....	I
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	V
ÇİZELGELER.....	VII
ŞEKİLLER.....	VIII
GİRİŞ.....	1
1.1. Tanım.....	2
1.2. Tarihçe.....	2
1.3. Etiyoloji.....	3
1.4. Epizootiyoloji.....	5
1.5. Patogenezis.....	6
1.6. Bulgular.....	7
1.6.1. Klinik Bulgular.....	7
1.6.2. Makroskopik Bulgular.....	8
1.6.3. Mikroskopik Bulgular.....	9
1.6.4. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	10
1.7. Tanı ve Ayırıcı Tanı.....	10
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
2.1. Denemede Kullanılan Balıklar.....	12
2.2. Denemede Kullanılan Havuzlar.....	12
2.3. Denemede Kullanılan Su.....	13
2.4. Deneysel İnokülasyon.....	13
2.5. Patolojik İnceleme.....	13
2.5.1. Makroskopik İnceleme.....	13
2.5.2. Mikroskopik İnceleme.....	14
2.6. İmmunohistokimyasal İnceleme.....	14
2.7. Mikrobiyolojik İnceleme.....	15
3. BULGULAR.....	16
3.1. Deneme İntraperitoneal Grup.....	16
3.1.1. Klinik Bulgular.....	16
3.1.2. Makroskopik Bulgular.....	17
3.1.3. Mikroskopik Bulgular.....	22
3.1.4. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	24
3.2. Deneme İmmersiyon Grup.....	33
3.2.1. Klinik Bulgular.....	33
3.2.2. Makroskopik Bulgular.....	34
3.2.3. Mikroskopik Bulgular.....	37
3.2.4. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	39
3.3. Mikrobiyolojik Bulgular.....	46
4. TARTIŞMA.....	47
5. SONUÇ.....	52

ÖZET.....	53
SUMMARY.....	54
KAYNAKLAR.....	55
TEŞEKKÜR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	65

SİMGELER ve KISALTMALAR

DPT:	Devlet Planlama Teşkilatı
%:	Yüzde
TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu
Ark:	Arkadaşları
Gram (-):	Gram negatif
µm:	mikrometre
NaCl:	Sodyum klorid
TSA:	Tryptone soya agar
BHI:	Beyin-kalp infüzyon agar
TCBS:	Tiyosülfat sitrat safra tuzu sukroz agar
H ₂ S:	Hidrojen sülfür
°C:	Santigrat derece
CuSO ₄ :	Bakır sülfat
Ppm:	Milyonda bir (Parts per million)
Kb:	Kilobase
kDa:	Kilodalton
mm:	milimetre
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
DNA:	Deoksiribonükleik asit
rRNA:	Ribozomal ribonükleik asit
g:	Gram
Cm:	Santimetre
DİP:	Deneme intraperitoneal grup
DİM:	Deneme immersiyon grup
KİP:	Kontrol intraperitoneal grup
KİM:	Kontrol immersiyon grup
A.Ş.:	Anonim Şirketi
l:	Litre
mg:	Miligram
pH:	Asit ve alkalın yoğunluğunun göstergesi

CFU:	Colony Forming Unit
ml:	Mililitre
HE:	Hematoksilen-Eozin
İP:	İmmunoperoksidaz
PBS:	Phosphate buffer saline
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
DAB:	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
EGH:	Eozinofilik granüler hücre (Eosinophilic granular cells)

ÇİZELGELER

Çizelge 1.	Grup I (Deneme İntraperitoneal Grup; DİP)' de ölüm günleri, klinik ve makroskopik bulgular	19
Çizelge 2.	Grup I (Deneme İntraperitoneal Grup; DİP)' de mikroskopik ve immunohistokimyasal bulguların dağılımı	25
Çizelge 3.	Grup II (Deneme İmmersiyon Grup; DİM)' de ölüm günleri, klinik ve makroskopik bulgular	35
Çizelge 4.	Grup II (Deneme İmmersiyon Grup; DİM)' de mikroskopik ve immunohistokimyasal bulguların dağılımı	40

ŞEKİLLER

Sayfa

- Şekil 1. DİP. A. Karın bölgesinde (ok) ve yüzgeçlerde (ok başları) kanama, olgu no; 2. B. Karın bölgesinde (ok) kanama, olgu no; 7. 20
- Şekil 2. DİP. Karaciğerde kanamalar (oklar) ve solungaçta solgunluk, olgu no; 3. 20
- Şekil 3. DİP. Periokuler kanama (ok), solungaç kemeri boyunca peteşiyel kanama (okbaşı), dalakta büyüme (*) ve hava kesesinde matlaşma (ok), olgu no; 4. 21
- Şekil 4. DİP. A. Solungaçta solgunluk ve anüs etrafında hiperemi (ok), olgu no; 8. KİP. B. Normal solungaç, olgu no; 4. 21
- Şekil 5. DİP. İskelet Kası. Erime nekrozları (oklar), nekrotik kas demetlerinde ve damar lümenlerinde bakteri kümeleri (ok başları), A. Olgu no; 7, HE., Bar: 30 µm. B. Olgu no; 10, HE., Bar: 30 µm. 27
- Şekil 6. DİP. Solungaç. A. Sekunder lamellerde ödem (*), olgu no; 2, HE., Bar: 50 µm. B. Primer ve sekonder lamel epitel hücrelerinde nekrozlar (oklar), olgu no; 4, HE., Bar: 30 µm. 27
- Şekil 7. DİP. Solungaç. Primer lamellerde eozinofilik granüler hücrelerde artış (oklar), interlameller hücre hiperplazisi (okbaşıları) ve telangiektazi (*), olgu no; 10, HE., Bar: 50 µm. 28
- Şekil 8. DİP. Kalp Kası. A. Endoteliyal makrofajlarda aktivasyon (oklar), olgu no; 3, HE., Bar: 30 µm. B. Mononükleer hücre infiltrasyonlarının oluşturduğu epikarditis (oklar), olgu no; 13, HE., Bar: 50 µm. 28
- Şekil 9. DİP. Karaciğerde multifokal koagülasyon nekrozları (N: Nekroz), olgu no; 1, HE., Bar: 50 µm. 29
- Şekil 10. Böbrek. A. KİP, normal, olgu no; 4, HE., Bar: 30 µm. B. DİP. Proksimal tubulus epitelinde eozinofilik hiyalin damlaları (oklar), olgu no; 8, HE., Bar: 30 µm. 29
- Şekil 11. DİP. Dalakta fokal nekroz (N: Nekroz), olgu no; 2, HE., Bar: 30 µm. 30
- Şekil 12. DİP. A. İskelet kası damar lümeninde Gram-negatif bakteriler (DL: Damar lümeni, oklar), olgu no; 4, Brown-Brenn, Bar: 10 µm. B. Karaciğerde sinuzoidlerde Gram-negatif bakteriler (oklar), olgu no; 3, Brown-Brenn, Bar: 10 µm. 30
- Şekil 13. A. KİP. İskelet Kası. İmmunoperoksidaz kontrol, olgu no; 2, İP., Bar: 50 µm. B. DİP. İskelet Kası. İntersitisyumda ve nekrotik kas demetlerinde immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 2, İP., Bar: 30 µm. 31
- Şekil 14. DİP. Kalpte ventrikülüs kas demetleri arasında immunopozitif boyanmalar (ok), olgu no; 3, İP., Bar: 30 µm. 31

Şekil 15.	DİP. Karaciğerde vena sentralis etrafında immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 2, İP., Bar: 30 µm.	32
	A. KİP. Dalak. İmmunoperoksidaz kontrol, olgu no; 2, İP., Bar: 50 µm.	
Şekil 16.	B. DİP. Dalak. Nekroz alanında immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 2, Bar: 30 µm.	32
Şekil 17.	DİP. Mide submukozasında immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 6, İP., Bar: 30 µm.	33
Şekil 18.	DİM. Deride kanamalar (oklar), olgu no; 4.	36
Şekil 19.	DİM. Solungaçta peteşiyel kanamalar (ok) ve karaciğerde renk değişikliği, olgu no; 1.	36
Şekil 20.	DİM. Operkulumda, karaciğerde ve yağ dokuda kanama (oklar) ve hava kesesinde matlaşma (*), olgu no; 2.	37
Şekil 21.	DİM. İskelet Kası. A. İntersitisyumda hiperemi ve kanama (oklar), olgu no; 5, HE., Bar: 30 µm. B. Erime nekrozları (okbaşları) ve intersitisyumda kanamalar (oklar), olgu no; 1, HE., Bar: 50 µm.	42
Şekil 22.	DİM. Solungaç. A. Sekunder lamellerde ödem (*) ve tabanında hiperplazi (ok), olgu no; 20, HE., Bar: 50 µm. B. Sekunder lamelde telangiektazi ve tabanında hiperplazi (ok), olgu no; 7, HE., Bar: 50 µm.	42
Şekil 23.	DİM. Karaciğerde kanama, olgu no; 1, HE., Bar: 50 µm.	43
Şekil 24.	DİM. Karaciğerde diffuz yağlanma (oklar), olgu no; 13, A. HE., Bar: 30 µm, B. Modifiye McManus's Sudan Black B, Bar: 30 µm.	43
Şekil 25.	DİM. Böbrekte proksimal tubulus epitellerinde eozinofilik hiyalin damlaları (oklar), olgu no; 13, HE., Bar: 30 µm.	44
Şekil 26.	DİM. Midede submukozada eozinofilik granüler hücrelerde artış (oklar), olgu no; 3, HE., Bar: 30 µm.	44
Şekil 27.	DİM. Solungaç. A. Damar lümeninde immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 2, İP., Bar: 30 µm. B. Sekunder lamel kapillarlarında, immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 5, İP., Bar: 30 µm	45
Şekil 28.	DİP. Kalpte epikartda immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 4, İP., Bar: 30 µm.	45
Şekil 29.	DİM. A. Karaciğerde sinuzoidlerde immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 4, İP., Bar: 30 µm. B. Yağ dokuda perivasküler immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 1, İP., Bar: 30 µm.	46

GİRİŞ

Dünya nüfusundaki hızlı artışla birlikte besin kaynaklarının azalmaya başlaması, balık ve diğer su ürünlerini, insan beslenmesinde önemli bir protein kaynağı haline getirmiştir (Geldiay ve Balık 1999). Balık etinin, esansiyel aminoasitler, doymamış yağ asitleri, vitaminler ve mineraller bakımından zengin olması besin değerini arttırmaktadır. Daha ucuz olması da, insanlar tarafından diğer et türlerine göre daha çok tercih edilmesine neden olmaktadır (İnal 1992, Geldiay ve Balık 1999, Rad 1999).

Balıkçılık kaynaklarının korunarak üretimin devamlılığının sağlanması yanında, yetiştiricilik yoluyla pazar ihtiyaçlarını karşılamaya yönelik çalışmalar, dünyada olduğu gibi Türkiye’de de giderek önem kazanmaktadır (Geldiay ve Balık 1999, Rad 1999). Denizleri, göl, gölet, baraj gölü ve akarsu kaynaklarının fiziki büyüklüğü itibariyle balıkçılık üretimine uygun zengin su kaynaklarına sahip olan Türkiye, 25 milyon hektarlık deniz ve içsu kaynak alanları ile büyük bir su ürünleri potansiyeline sahiptir (DPT 2007). Bölgeler itibarıyla balık yetiştiriciliğinde % 60’lık payla ilk sırada Ege Bölgesi gelmekte olup bunu Karadeniz (% 12), Marmara (% 10), Akdeniz (% 8) ve İç Anadolu (% 7) Bölgeleri izlemektedir. Bu üretimde yetiştiriciliği en çok yapılan türler ise iç sularda alabalık (43.432 ton), denizlerde ise çipura (20.435 ton) ve levrek (26.297) gelmektedir (DPT 2007, TÜİK 2007).

Kültür balıkçılığında, yoğun yetiştiricilik ve kirliliğe ilişkin su kalitesindeki değişiklikler, balık ile yaşadığı çevre arasındaki hassas dengenin bozulmasına, enfeksiyöz hastalıkların ortaya çıkmasına ve yayılmasına ortam hazırlamaktadır (Austin 1999, Roberts 2001). Enfeksiyöz hastalıkların tedavilerinin güç ve pahalı olması, balık yetiştiriciliğinde büyük ekonomik sorunlar yaratmakta ve işletme ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu sebeple balık hastalıklarında koruma ve kontrol metodlarının uygulanması, erken teşhis ve etkin tedavi kültür balığı yetiştiriciliğinde her geçen yıl daha da önem kazanmaktadır (Actis ve ark 1999, Austin 1999, Roberts 2001).

Önemli balık patojenlerinden biri olan *Vibrio anguillarum*’un sebep olduğu vibriosis (Pacha ve Kiehn 1969, Lewis 1985, Kanno ve ark 1989, Jones ve ark 2000), diğer balık türlerinde olduğu gibi gökkuşağı alabalıklarında da hemorajik septisemiler sonucu büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (MaCarthy ve ark 1974, Giorgetti ve Ceschia 1982, Tanrıkul 2007). *Vibrio anguillarum*’un balık türleri içerisinde en fazla izole edilen

ve şiddetli patojenik etkiye sahip suşu O1'dir (Sorensen ve Larsen 1986, Larsen ve ark 1994, Pedersen ve ark 1997). Etkenin neden olduğu vibriozis Türkiye'deki gökkuşığı alabalıklarından izole edilmiş (Timur ve Korun 2004, Tanrıkul 2007), ancak hastalığın makroskopik ve mikroskopik bulgularına yönelik kapsamlı literatür bilgiye ulaşılammıştır.

1.1. Tanım

Balıklarda *Vibrio anguillarum* tarafından oluşturulan vibriozis, dünyanın birçok bölgesindeki tuzlu ve tatlı su balıklarında görülen, yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden, hemorajik septisemiyle karakterize bakteriyel bir hastalıktır (MaCarthy ve ark 1974, Giorgetti ve Ceschia 1982, Chart 1983, Horne ve Baxendale 1983, Ransom ve ark 1984, Egidius 1987, Olsson ve ark 1998).

1.2. Tarihçe

Vibrio anguillarum, *Vibrio* genusu içinde ilk tanımlanan ve vibriozis'li balıklardan en sık izole edilen bakteriyel etkenlerden birisidir (Haastein ve Holt 1972, Kitao ve ark 1983, Egidius 1987). Etkenin ilk olarak 1893 yılında İtalya'nın kuzey doğu sahillerinde yılan balıklarında toplu ölümlere sebep olan bir salgından izole edildiği ve "*Bacillus anguillarum*" olarak adlandırıldığı bildirilmiştir (Actis ve ark 1999, Roberts 2001). Etkenin son bilimsel isimlendirmesi ise 1909 yılında Bergman (1909) tarafından "*Vibrio anguillarum*" şeklinde yapıldığı belirtilmiştir (Hastein ve Smith 1977, Egidius 1987). Ayrıca fenotipik ve genotipik özellikleri dikkate alınarak bakteri; *Listonella* genusu içerisinde sınıflandırılmakta ve *Listonella anguillarum* olarak da kullanılmaktadır (Chabrillon ve ark 2004, Sugita ve ark 2005, Korun 2006).

Balıklarda hastalık oluşturan başlıca vibrio türleri; *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio pelagius* ve *Vibrio splendidus*' dur (Ransom ve ark 1984, Bogwald ve ark 1990, Actis ve ark 1999, Maugeri ve ark 2000). Bu türlerin oluşturdukları hastalıkların terminolojilerinde Kızıl Veba (Red Pest), Kızıl Çıban (Red boil), Kızıl Hastalık (Red Disease) ve Tuzlu Su Furunkülozisi (Salt-water Furunculosis) gibi isimler kullanılmıştır. Günümüzde ise bu türlerin balıklarda meydana getirdikleri

enfeksiyonlar “vibriozis ” olarak kabul edilmektedir (Giorgetti ve Ceshia 1982, Egidius 1987, Larsen ve ark 1994).

Hastalığın ilk kez görüldüğü İtalya’dan sonra hastalık, Norveç (Hastein ve Smith 1977, Myhr ve ark 1991), İngiltere (Hoff 1989), Danimarka (Larsen ve ark 2001) gibi birçok Avrupa ülkesinde, Kanada (Hacking ve Budd 1971), Amerika (Lewis 1985), Japonya (Kitao ve ark 1983, Sugita ve ark 2005), Yeni Zelanda (Pybus ve ark 1994) ve Avustralya’da da (Humphrey ve ark 1987) rapor edilmiştir.

Türkiye’de 1993 yılında çipura (*Sparus aurata*) balıklarından (Candan 1993, Çağırğan 1993) bildirilen hastalık daha sonra levrek (*Dicentrarchus labrax*) (Akan ve ark 1996, Çağırğan 2004, Tanrıkul ve ark 2004, Korun ve Timur 2008), kefal (*Mugil cephalus*) (Demircan ve Candan 2006), mercan (*Pagrus pagrus*) (Korun ve Gökoğlu 2007) ve atlantik salmonu (*Salmo salar* L.) (Candan 2000) gibi deniz balıkları ile gökkuşacağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) (Timur ve Korun 2004, Tanrıkul 2007) rapor edilmiştir.

1.3. Etiyoloji

Proteobacteria filumunun, *Gammaproteobacteria* sınıfının, *Vibrionales* takımının, *Vibrionaceae* ailesinin *Vibrio* genusu içerisinde sınıflandırılan *Vibrio anguillarum*; Gram negatif, fakültatif anaerob, sporsuz, virgül ya da çubuk biçiminde, 0.8–1.0 x 1.2-2.0 µm arasında değişen boyutlarda, halofilik, polar flagellumlu ve hareketli bir bakteridir (Pacha ve Kiehn 1969; Hastein ve Smith 1977, Grisez ve ark 1996, Actis ve ark 1999). Etkenin izolasyonunda tiyosülfat sitrat safra tuzu sukroz agar (TCBS) selektif besi yeri olarak kabul edilmektedir (Larsen ve ark 1988, Sugita ve ark 2005). Ayrıca % 1-2’lik sodyum klorür (NaCl) içeren tryptone soya agar (TSA), beyin-kalp infüzyon agar (BHI) ve kanlı agar gibi selektif olmayan zengin besi yerlerinde de 20-30 °C derecelerde 48 saatlik inkübasyondan sonra kolaylıkla üreme gösterir (Chart 1983, Hoff 1989, Myhr ve ark 1991, Çamlıbel 2002). *Vibrio anguillarum*’un bu besi yerlerinden TCBS’de sarı renkli koloniler, diğer selektif olmayan besi yerlerinde ise beyaz renkli yuvarlak, krem renginde, kabarık parlak şeklinde koloniler oluşturur (Actis ve ark 1999, Timur ve Korun 2004). İnsan ya da tavşan kanı içeren besi yerlerinde ise kolonilerin etrafında dar bir hemoliz alanı meydana getirir (Arda ve ark 2002). Ayrıca *Vibrio anguillarum* ve diğer vibrio türleri vibriostat

O/129 (2,4-diamino 6,7-diisopropyl pteridine phosphate) testine karşı oldukça hassastır (Lewis 1985, Sorensen ve Larsen 1986, Korun 2006).

Oksidaz ve katalaz testlerine pozitif özellik gösteren bakteri, genel olarak glikoz, sorbitol, sukroz, dekstrin, galaktoz, sakkaroz, maltoz, arabinoz ve mannitolu fermente eder (Hastein ve Smith 1977, Çamlıbel 2002, Demircan and Candan 2006) ancak bu şekerlerden bazılarının fermantasyonunda etkenin suşları arasında farklılıklar görülür (Grisez ve ark 1996). Diğer biyokimyasal testlerde; nitrat, voges proskauer pozitif, inositol, melibioz, hidrojen sülfür (H₂S), triptophan deaminaz, üreaz, ornitirin dekarboksilaz, fenilalanin deaminaz, metil red ise negatif özellik gösterir (Pacha ve Kiehn 1969, Lewis 1985, Akan ve ark 1996, Tanrıku ve ark 2004). Yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda *Vibrio anguillarum*'un 5, 25, 30, 37 °C lik sıcaklıklarda ve % 1-5, 7 gibi farklı NaCl içeren besi yerlerinde üreme gösterdiği saptanmıştır (Lewis 1985, Çamlıbel 2002, Korun ve Timur 2008).

İlk serolojik çalışmalarda bakterinin “*typica*” ve “*anguillicida*” olmak üzere iki serotipi olduğu düşünülmüş, zamanla bu iki serotipe olgunlaşmamış *Salmo trutta*'lardan izole edilen tip C serotipi ilave edilmiştir (Smith 1961). Daha sonra etken ısıya dirençli O antijenine göre Kuzeybatı salmonid (Serotipe I), Avrupa (serotip II) ve Pasifik vibriozisi (serotip III) olmak üzere üç serotip şeklinde (Pacha ve Kiehn 1969), 1965–1980 yıllarında Japonya’da yetiştirilen alabalık, ayu ve yılan balıklarında saptanan bakteri suşları ise serotip A, B, C, D, E ve F olmak üzere altı farklı serotip olarak sınıflandırılmıştır (Kitao ve ark 1983).

Son çalışmalar sonucunda *Vibrio anguillarum*'un ısıya dirençli O antijenine göre 10 farklı serotipinin (O1-O10) olduğu kabul edilmiştir (Sorensen ve Larsen 1986, Myhr ve ark 1991, Larsen ve ark 1994, Çağırğan 2004). Bu serotiplerden O1 birçok tatlı ve tuzlu su balık türlerinden en sık izole edilen ve en yüksek virülense sahip suş olup, geniş bir coğrafik dağılıma sahiptir (Kitao ve ark 1983, Myhr ve ark 1991, Boesen ve ark 1999). Bu suş daha önce Tip I, Tip C ve Tip 775 A gibi farklı isimler altında da tanımlanmıştır (Ezura ve ark 1980). Avrupa vibriozisinin etkeni olarak da bilinen O2 serotipi daha çok deniz balıkları ile bazı salmonid grubu balıklarda saptanmış (Chen ve Hanna 1992, Sorensen ve Larsen 1986, Larsen ve ark 1994), Tip A, Tip II, Tip J-O-1 ve Tip 569 olarak tanımlanan serotip O2'nin serotip O1'e göre virülensinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (Ezura ve ark 1980, Kitao ve ark 1983). Serotip O3, O4, O5, O6 hastalıklı balıklardan izole

edilmelerine rağmen O1 ve O2 serotiplerine göre daha düşük bir patojeniteye sahip oldukları ifade edilmiştir (Horne ve Baxendale 1983, Larsen 1983, Santos ve ark 1995). Serotip O7, O8, O9, O10 ise bakterinin serotipleri içinde en düşük patojenik etkiye sahip suşlar olarak kaydedilmiştir (Larsen 1983). Grizes ve Ollevier (1995) yine ısıya dirençli O antijeni temel alınarak yaptıkları serotiplendirmede etkeni 16 serotipe, Pedersen ve ark (1999) ise 23 serotipe ayırmışlardır.

1.4. Epizootiyoloji

İlk olarak yılan balıklarında saptanan vibriosis (Actis ve ark 1999, Roberts 2001), günümüzde hem tuzlu (Sorensen ve Larsen 1986, Miyazaki 1987, Myhr ve ark 1991) hem de tatlı su balıklarında (Hacking ve Budd 1971, McCarthy ve ark 1974, Giorgetti ve Ceschia 1982, Kitao ve ark 1983, Hjeltne ve ark 1987) yaygın olarak görülmektedir.

Su sıcaklığı hastalığın oluşumunda önemli bir faktördür. Özellikle 13-16 °C de akut epizootilerde hastalığın daha şiddetli seyrettiği, 9-10 °C den daha düşük sıcaklıklarda da hastalığın oluştuğu, ancak ölümlerin daha az görüldüğü saptanmıştır (Giorgetti ve Ceschia 1982, Jones ve ark 2000, Korun ve Timur 2008). Deniz ortamında doğal olarak bulunabilen *Vibrio anguillarum* sağlıklı balıkların mukus, solungaç ve bağırsaklarından, su içerisindeki sedimentlerden, bitkisel ve hayvansal planktonlardan da izole edilebilmektedir (West ve ark 1983, Larsen ve ark 1988). Ayrıca bakteri deniz suyunda bir yıldan daha uzun bir süre patojenik etki gösterebilmektedir (Hood ve MacDonell 1987, Hoff 1989, Pedersen ve ark 1999).

Vibriosis, özellikle suların ısındığı, kirlendiği ve oksijenin yetersiz olduğu zamanlarda ortaya çıkmaktadır (Hoff 1989). Suda normal florada bulunan bakteriler bu olumsuz çevre koşulları yanında, beslenme bozuklukları ve parazitler etkenlerin varlığında deri, solungaçlar ve anüs yoluyla vücuda girerek hastalığı oluşturmaktadır (Olsson ve ark 1996, Eguchi ve ark 2000, Larsen ve ark 2001, Sugita ve ark 2005). Enfeksiyon, klinik semptom gösteren ya da latent enfekte balıkların gaitası ya da deri teması yoluyla diğer balıklara bulaşabilmektedir (Kanno ve ark 1989, 1990). Ayrıca etkenlerin, oral yolla direkt olarak ya da enfekte yemlerin alınmasıyla da bulaştığı bildirilmiştir (Giorgetti ve Ceschia 1982).

Sanitasyon çalışmalarında *Vibrio anguillarum* 1:50'lik benzalkonyum klorür konsantrasyonu içerisinde 5 dakika, % 2'lik glutaraldehid ile 1 dakika, % 2'lik formaldehit

konsantrasyonunda 5 dakika ve 10 ppm 'lik iyot içerisinde ise 1 dakika içinde öldüğü saptanmıştır (Onuk ve Diker 2006).

1. 5. Patogenezis

Vibrio anguillarum enfeksiyonunun oluşmasında demir bağlayıcı proteinler (Actis ve ark 1988, Pybus ve ark 1994), ekstraselüler ürünler (toksinler) (Kodama ve ark 1985, Krovacek ve ark 1987), flagellum (Milton ve ark 1996, Chabrillon ve ark 2004) ve hemaglutinik aktivite (Trust ve ark 1981, Toranzo ve ark 1983) başlıca virulens faktörleri olarak tanımlanmıştır.

Demir bağlayıcı sistem, bakterinin en çok çalışılmış virulens faktörlerinden birisi olup, sınırlı miktarda demir bulunan ortamlarda bakterinin canlı kalmasını sağlamaktadır (Crosa ve ark 1980, Pybus ve ark 1994, Pedersen ve ark 1997). Bu sistem, 65-kb pJM1 isimli bir plazmid tarafından kodlanmakta, yapısını anguibaktin olarak adlandırılan demir bağlayıcı bir siderefor ile membran-reseptör kompleksi oluşturmaktadır (Crosa ve ark 1980, Actis ve ark 1988, Pybus ve ark 1994, Pedersen ve ark 1997). Sistemi kodlayan plazmid yapısında herhangi bir hasar ya da mutasyon meydana geldiğinde bakterinin virulensinde azalma şekillendiği bildirilmiştir (Crosa ve ark 1980).

Etkenin salgıladığı ekstraselüler ürünlerin toksik etkilerinin, 44-kDa ve 34-kDa ağırlığındaki proteinler ile ilgili olduğu ifade edilmiştir (Kodama ve ark 1985, Krovacek ve ark 1987, Actis ve ark 1999). Bu proteinlerin alabalıklara intraperitoneal, farelere intravenöz yolla verildiğinde kuvvetli letal etki gösterdiği belirtilmiştir (Krovacek ve ark 1987). Ekstraselüler ürünlerin hemorajik, sitotoksik ve kuvvetli letal etkilerine bağlı olarak enfekte balıklarda şekillenen patolojik bulgularda farklılıklar görüldüğü vurgulanmıştır (Kodama ve ark 1985). Bu ürünlerin toksik etkilerinin sıcaklık ve potasyum iyodüre karşı duyarlı, tripsin ve aseton uygulamalarına karşı ise dirençli oldukları bildirilmiştir (Krovacek ve ark 1987, Actis ve ark 1999). *Vibrio anguillarum* ile enfekte gökkuşağı alabalıklarından elde edilen ekstraselüler ürünler tavşana intradermal yolla verildiğinde, bu ürünlerin uygulandığı bölgede sitotoksik etkiye ilişkin nekrozlar oluştuğu; 80 °C'de 30 dakika ısı işleminden sonra ise ekstraselüler ürünlerin etkilerinin azaldığı belirlenmiştir (Krovacek ve ark 1987). Bazı araştırmacılar tarafından 36 kDa ve 38 kDa ağırlığında

elastolitik etkili metalloproteazın, bakterinin patogenezisinde etkili bir virülens faktörü olarak değerlendirilmiştir (Norqvist ve ark 1990, Farrell ve Crosa 199).

Başlangıçta tek flagellumu bulunduğu bildirilen *Vibrio anguillarum*'un (Hacking ve Budd 1971), ultrastruktural ve moleküler incelemelerde birden fazla flagelluma sahip olduğu saptanmıştır (Milton ve ark 1996, Chabrillon ve ark 2004). Bu flagellumların bakterinin deride tutunmalarını ve aynı bölgede kolonize olmalarını sağladıkları belirtilmiştir (Chart 1983, Milton ve ark 1996, Chabrillon ve ark 2004).

Hemaglutinik aktivite bakterinin diğer virülens faktörlerden birisi olup (Toranzo ve ark 1983), özellikle Amerika'da elde edilen patojenik *Vibrio anguillarum*'un balık eritrositleri için kuvvetli hemaglutinasyon özelliği gösterdiği saptanmıştır. *Vibrio anguillarum* aglutininlerinin ayrıca insan ve kanatlı eritrositlerine karşı hemaglutinasyon etkileri olduğu da bildirilmiştir (Actis ve ark 1999).

1.6. BULGULAR

1.6.1. Klinik Bulgular

Vibriozis, balığın türü, yaş ve büyüklüğüne, etkenin virülensine ve stres faktörlerinin etkisine bağlı olarak perakut formdan kronik forma kadar değişen bir seyir gösterir (McCarthy ve ark 1974, Actis ve ark 1999). Perakut form daha çok yavru balıklarda ve enfeksiyonun şiddetli seyrettiği büyük balıklarda (Roberts 2001), akut ve kronik form ise genellikle genç ve yetişkin balıklarda görülür (McCarthy ve ark 1974, Actis ve ark 1999, Roberts 2001, Arda ve ark 2002).

Doğal vibriozisde mortalitenin % 40-70 arasında olduğu belirtilmiştir (Egidius ve Andersen 1978, Giorgetti ve Ceschia 1982). Çeşitli tuzlu ve tatlı su balık türlerinde deneysel olarak yapılan immersiye ve intraperitoneal uygulamalarda ise mortalitenin % 80-100 arasında olduğu bildirilmiştir (Johnson ve Amend 1983, Ransom ve ark 1984, Kanno ve ark 1989, Spanggaard ve ark 2000, Tanrıku 2007).

Hastalığın karakteristik klinik bulgusu bulunmamaktadır. Hastalıkta yeme karşı isteksizlik ve hareketlerde azalma görülen ilk bulgulardandır (McCarthy ve ark 1974,

Giorgetti ve Ceschia 1982, Korun 2006). İlerleyen olgularda anoreksi, düzensiz yüzme hareketleri, su yüzeyine yakın bulunma, deri renginde koyulaşmalar, tek ya da çift taraflı ekzoftalmus bildirilmiştir (Actis ve ark 1999, Jones ve ark 2000, Timur ve Korun 2004). Uzun süren anoreksilere ilişkin olarak enfekte balıkların daha az gelişim gösterdikleri ifade edilmiştir (Roberts 2001).

1.6.2. Makroskopik Bulgular

Vibriozisde, deri ve kaslarda şekillenen hemorajik-nekrotik değişiklikler ile generalize kanamalar en önemli makroskopik bulgular olarak tanımlanmıştır (McCarthy ve ark 1974, Harbell ve ark 1979, Egidius 1987, Actis ve ark 1999).

Hastalığın perakut formunda genellikle dikkati çeken makroskopik bulgular görülmemekle birlikte (Horne ve ark 1977, Pedersen ve ark 1997), bazı olgularda göz çevresinde, operkulumda, dorsal-ventral yüzgeç tabanlarında ve deride kanamalar şekillenebilmektedir (Actis ve ark 1999).

Akut formda vücudun lateral ve ventral bölgelerinde, operkulum, yüzgeç ve yüzgeç tabanlarında, kaslarda, peteşiyel kanamalar dikkati çeker (Hjeltnes ve ark 1987, Jones ve ark 2000, Lönnström ve ark 2001, Demircan ve Candan 2006). Derideki kanamalar genellikle epidermis ve derin kas katmanlarını içine alan kırmızımtrak renkte derin nekrotik ülserler ile sonuçlanır (Ransom ve ark 1984, Egidius 1987, Pedersen ve ark 1997). Solungaçlar genellikle solgun, bazı olgularda ise kanamalıdır (Hacking ve Bodd 1971, Haastein ve Holt 1972, Korun ve Timur 2008). Karın şişkin ve karın boşluğunda aşırı miktarda renksiz bir sıvı vardır (Haastein ve Holt 1972). İç organlarda ve serozal yüzeylerde hiperemi ve kanamalar yaygındır (Giorgetti ve Ceschia 1982, Ransom ve ark 1984, Egidius 1987). Karaciğerde büyüme, renk değişikliği ve peteşiyel kanamalara oldukça sık rastlanır (Egidius ve Andersen 1978, Korun ve Timur 2008). Dalak büyümüş ve çoğu zaman yumuşak kıvamlıdır (Egidius ve Andersen 1978, Lönnström ve ark 2001). Böbrek kanamalı ve kıvamı yumuşak olabilir (Giorgetti ve Ceschia 1982). Mide ve pilorik kese serozaları hiperemik ya da kanamalı, lümenleri ise renksiz ya da koyu kırmızı renkte bir içerikle doludur (Haastein ve Holt 1972, McCarthy ve ark 1974). Bağırsak lezyonları öncelikle bağırsakların posteriyöründe daha az olarak anteriyöründe hemorajik enteritis şeklinde tanımlanmıştır (Ransom ve ark 1984). Anüste hiperemi (Pedersen ve ark 1997,

Demircan ve Candan 2006) ve prolapsuslar kaydedilmiştir (Giorgetti ve Ceschia 1982, Pedersen ve ark 1997). Yaygın peteşiyel kanamalar; peritonda, hava kesesinde ve karın boşluğu yağ dokusunda da görülebilir. Gözlerde keratomalaziler bildirilmiştir (Haastein ve Holt 1972).

1.6.3. Mikroskopik Bulgular

Hastalıkta en önemli mikroskopik bulgu, deri ve kaslarda tanımlanmıştır (Lewis 1985, Miyazaki 1987, Jones ve ark 2000). Başlangıçta kas lezyonları vasküler değişiklikler şeklinde başlar. Daha sonra bu kas lezyonlarının epidermisten derin kas katmanlarına kadar uzanan nekrozlarla sonuçlandığı bildirilmiştir (Hastein ve Smith 1977, Ransom ve ark 1984).

Karaciğer, dalak ve böbrekte nekrozlar tanımlanmıştır (Hastein ve Smith 1977, Ransom ve ark 1984, Miyazaki 1987, Jones ve ark 2000, Timur ve Korun 2004). Karaciğerde sinuzoidler içerisinde bulunan bakteri kümeleri ve kanamalar tanımlanan diğer mikroskopik bulgulardandır (Giorgetti ve Ceschia 1982, Lewis 1985, Miyazaki 1987). Dalakta gözlenen nekrozların daha çok damarlara yakın olarak şekillendiği bildirilmiştir (Miyazaki 1987). Böbrekte hematopoyetik dokudaki nekrozlar, vasküler değişiklikler ile birlikte tanımlanmıştır (Hastein ve Smith 1977, Giorgetti ve Ceschia 1982, Ransom ve ark 1984, Jones ve ark 2000). Enfeksiyonun şiddetli seyrettiği olgularda nekrozlar hematopoyetik doku ile birlikte nefronlarda görülmektedir (Miyazaki 1987, Timur ve Korun 2004).

Bazı vibriosis olgularında kalpte, epikarditis (Hacking ve Budd 1971), kanama ve bakteri kümeleri (Ransom ve ark 1984, Miyazaki 1987, Jones ve ark 2000), solungaçlarda hiperemi, ödem ve kanama ile damar lümenlerinde bakteri kümelerinin varlığı tanımlanmıştır (Ransom ve ark 1984, Miyazaki 1987).

Mide, pilorik kese ve bağırsaklarda hiperemi, ödem, kanama ve nekrozlar bildirilmiştir (Hastein ve Smith 1977, Ransom ve ark 1984, Demircan ve Candan 2006). Bağırsakların çoğunlukla posteriyöründe daha az olarak da anteriyöründe hemorajik enteritis bulguları tanımlanmıştır (Egidius ve Andersen 1978, Egidius 1987). Kronik

formda dalak ve böbrekte melanomakrofaj merkezlerde yoğun hemosiderin birikimlerinin bulunduğu belirtilmiştir (Roberts 2001).

1.6.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

Vibrio anguillarum'un oluşturduğu vibriosis enfeksiyonlarında immunoperoksidaz tekniğinin kullanımı ile ilgili sınırlı sayıda literatür bilgiye ulaşılabilmektedir (Bergh ve ark 2001, Irie ve ark 2004, Afonso ve ark 2005). Poliklonal *Vibrio anguillarum* O1 serumlarının kullanıldığı bu çalışmalarda bakteriyel antijen, aşılama bölgesinde şekillenen granülom içerisinde (Afonso ve ark 2005) ve bağırsaklarda (Irie ve ark 2004) tespit edilmiştir. Etkenin patogeneziye yönelik olan bu deneysel çalışmalarda immunohistokimyasal metotlardan indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılmıştır. Balık larvalarının beslenmesinde kullanılan *Artemia franciscana*'larda yapılan deneysel çalışmada ise bakteriyel antijen avidin-biotin peroksidaz metodu kullanılarak saptanmıştır (Bergh ve ark 2001). Ancak hastalığın makroskobik ve mikroskobik bulgularının immunohistokimyasal bulguları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

1.7. Tanı ve Ayırıcı Tanı

Doğal vibrio enfeksiyonlarında morbidite ve mortalitenin yüksek oluşu, hastalığın kısa sürede tanısını önemli kılmaktadır (Egidius ve Andersen 1978, Giorgetti ve Ceschia 1982). Hastalığın klinik bulguları spesifik olmayıp, pekçok balık hastalıklarında tanımlanan bulgular ile benzerlik göstermektedir (Actis ve ark 1999, Roberts 2001, Erer 2002, Avcı ve Birincioğlu 2005, Aydoğan 2005).

Hastalığın kesin tanısında, serolojik testler ile birlikte enfekte balıkların doku ve organlarından etken izolasyonu ve identifikasyonun yapılması gerekmektedir (Lewis 1985, Sorensen ve Larsen 1986, Larsen ve ark 1988, Sugita ve ark 2005). Lam aglütinasyon, immunofloresan ve ELISA gibi serolojik yöntemler hastalığın teşhisinde ve etkenin identifikasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Sorensen ve Larsen 1986, Actis ve ark 1999, Akaylı 2001). Moleküler teşhis metotlarından PCR ile bakterinin hemolizin, angE ve rpoN genleri kullanılarak etkenin kesin tanısı yapılmaktadır (Gonzales ve ark 2003,

Demircan ve Candan 2006). Ayrıca bakterinin spesifik 16S rRNA dizileri kullanılarak yapılan DNA melezleme çalışmaları da kesin tanıda yararlanılan diğer metodlardandır (Picado ve ark 1996). Diğer türlerde olduğu gibi immunohistokimyasal metodlar da vibriozisin teşhisinde kullanılan diğer yöntemlerdendir (Berg ve ark 2001, Irie ve ark 2004, Afonso ve ark 2005).

Vibrio enfeksiyonları furunkülozis, yersiniozis, bakteriyel hemorajik sepsisemi, viral hemorajik sepsisemi ve saprolegniazis gibi bazı hastalıklar ile kolaylıkla karışabilmektedir (Roberts 2001, Erer 2002, Avcı ve Birincioğlu 2005, Aydoğan 2005).

Bu çalışmada gökkuşuğu alabalıklarında oluşturulan deneysel *Vibrio anguillarum* enfeksiyonunda, hastalığın makroskobik ve mikroskobik bulgularının kapsamlı olarak değerlendirilmesi, immunoperoksidaz yöntemle bakteriyel antijenin dokulardaki lokalizasyonunun ve bu yöntemin vibriozisin teşhisinde, rutin tanı yöntemleri içerisinde yer alıp almayacağını ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Denemede Kullanılan Balıklar

Bu çalışmada, Çamoğlu Su Ürünleri Limited-1 (Bozdoğan/AYDIN) alabalık işletmesinden temin edilen, 80 ± 10 g ağırlığında ve 10-12 cm büyüklüğündeki gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) kullanıldı. Oksijen takviyeli taşıma tankları ile getirilen balıklar önceden hazırlanmış olan havuzlara alındı. İnokülasyondan önce balıkların ortama adapte olmaları için 21 gün beklendi. Adaptasyondan sonra kalan toplam 56 adet gökkuşığı alabalığı denemede kullanıldı.

İki deneme ve iki kontrol grubu olmak üzere toplam dört grup halinde yürütülen çalışmada, gruplandırma uygulama metodlarına göre, aşağıda belirtildiği şekilde belirlendi.

- Grup I : Deneme İntraperitoneal Grup (DİP), n: 20
- Grup II : Deneme İmmersiyon Grup (DİM), n: 20
- Grup III : Kontrol İntraperitoneal Grup (KİP), n: 8
- Grup IV : Kontrol İmmersiyon Grup (KİM), n: 8

Gruplandırmayı takip eden ilk iki gün ortam değişikliği nedeniyle yemleme yapılmadı. Sonraki günlerde iki numaralı pelet yem (Pınar A.Ş.) ile her gün yemleme yapıldı.

2.2. Denemede Kullanılan Havuzlar

Çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan, 140 x 60 x 40 cm boyutlarında dört adet metal, emaye kaplamalı havuzlar kullanıldı. Balıklar alınmadan önce havuzlar % 5' lik formaldehit solüsyonu ile iki saat süreyle dezenfekte edildi (Erer 2002). Suyun havalandırılması, her bir havuzda saatte 600 l suyu filtre edebilen eksternal akvaryum filtreleri ve hava pompaları ile yapıldı. Deneme süresince havuz sularının % 25'i, günlük olarak, dinlenmiş ve havalandırılmış sularla değiştirildi.

2.3. Denemede Kullanılan Su

Suyun mikrobiyolojik ve kimyasal analizleri Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yapıldı. Sudaki çözülmüş oksijen miktarı Aydın Devlet Su İşleri Bölge Müdürlüğü laboratuvarı tarafından ölçüldü. Bu analizler sonucunda, sudaki çözülmüş oksijen miktarı 10 mg/l, sertlik derecesi 34 fransız sertlik derecesi, pH'ı 7.25 olarak belirlenmiştir. Mikrobiyolojik analizlerde herhangi patojen bir bakteri izole edilmediği bildirilmiştir. Suyun sıcaklığı ise deneme süresince 15 C° olacak şekilde devam ettirilmiştir.

2.4. Deneysel İnokülasyon

Çalışmada Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Hastalıklar Anabilim Dalı'ndan temin edilen *Vibrio anguillarum* O1 (ATTC 43305) suşu kullanıldı.

Intraperitoneal uygulamaya başlamadan önce, balıklar % 0.25'lik fenoksiethanol solüsyonu ile anesteziyeye alındı (Özer ve ark 1995, Avcı ve Birincioglu 2005, Aydoğan 2005). Daha sonra insülin enjektörleri ile $5,5 \times 10^8$ cfu/ml bakteri içeren inokülattan 0,1 ml DİP grubundaki balıklara intraperitoneal olarak verildi. KİP grubu balıklar da aynı anestezik uygulamayı takiben intraperitoneal olarak 0.1 ml serum fizyolojik enjekte edildi.

İmmersiyon uygulamada, 30 l suya $5,5 \times 10^8$ cfu/ml bakteri içeren inokülatdan 50 ml katıldı. DİM grubundaki balıklar bu inokülatlı su içerisinde 30 dakika bekletildikten sonra normal havuza alındı. Eş zamanlı olarak KİM'de 30 l normal su içerisinde bekletilerek kontrol havuzuna alındı.

2.5. Patolojik İnceleme

2.5.1. Makroskobik İnceleme

İnokülasyonun başlangıcından itibaren balıkların hareketleri gün boyu izlenerek kaydedildi. Ölen ya da ötanazi edilen balıkların nekropsileri sırasında gözlenen makroskobik bulgular tanımlanarak dijital fotoğraf makinesi ile fotoğrafları (Olympus

C-5050) çekildi. Nekropsileri takiben alınan örnekler % 10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi.

2.5.2. Mikroskopik İnceleme

Doku örnekleri bilinen yöntemlerle doku takip cihazında (Leica TP1020) takip edildikten sonra parafinde bloklandı. Daha sonra bu bloklardan mikrotomla (Leica RM2135) 5 µm kalınlığında doku kesitleri alındı. Bu kesitlerin tamamı hematoksilin-eozin (HE), gerekli görülenler ise bakteri için Brown-Brenn, yağ için Modifiye McManus's Sudan Black B boyama tekniklerine göre boyanarak (Culling 1985) ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi. Uygun görülen preparatlardan mikroskopik dijital fotoğraflar (Olympus C-5050) çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.6. İmmunohistokimyasal İnceleme

İmmunohistokimyasal incelemeler için indirekt immunoperoksidaz (İP) tekniği kullanıldı. Rutin olarak 5 µm kalınlığında parafin bloklardan hazırlanan kesitler, poli-L-lisinle kaplı lamalar üzerine alındı. Bu kesitler 40 °C'lik etüvde 10 dakika bekletildikten sonra, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek, fosfat tamponlu solüsyonunda (PBS; pH 7.2) 3 x 5 dakika boyunca yıkandı. Dokudaki endojenaz peroksidaz aktivitesini baskılamak için % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) içeren absolut metanolde oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 x 5 dakika yıkandı. Daha sonra doku örnekleri % 0,1 proteaz K solüsyonunda nemli kamerada 37 °C'de 10 dakika bekletildi. Spesifik olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için % 1'lik bovine serum albumininde nemli kamerada 20 dakika tutuldu. PBS ile 3 x 5 dakikalık yıkama işleminden sonra kesitler üzerine, PBS içinde 1/250 oranında sulandırılmış poliklonal tavuk anti-*Vibrio anguillarum* primer antikoruna uygulandı ve kesitler 37 °C' de 60 dakika süreyle beklemeye alındı. Daha sonra PBS ile 3 x 5 dakikalık yıkama işlemi sonunda dokular, 1/1000 oranında PBS ile sulandırılmış, tavşan anti-tavuk peroksidaz konjugatı (Sigma, A 9046) ile nemli kamerada 25 C° de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası dokular PBS içinde 3 x 5 dakika tutulduktan sonra 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ile reaksiyona sokuldu. Harris'in hematoksileni ile karşıt boyama yapıldı. Pozitif ve negatif kontrol preparatları da aynı işlemlerle hazırlandı, ancak negatif kontrol kesitleri üzerine primer antikor yerine normal tavuk serumu damlatıldı. Daha sonra hazırlanan

preparatların tamamı ışık mikroskobunda incelendi. Uygun görülen immunohistokimyasal bulgular ışık mikroskobuna bağılı dijital fotoğraf makinesi ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.7. Mikrobiyolojik İnceleme

DİP (olgu no; 3, 6, 14, 16) ve DİM'de (olgu no; 2, 5, 9, 12) ölen ve ötanazi edilen balıklardan alınan örnekler ile KİP (olgu no; 2, 3, 6, 7) ve KİM'den (olgu no; 2, 3, 5, 6) eş zamanlı olarak alınan örneklerin mikrobiyolojik incelemeleri Adnan Menderes Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3. BULGULAR

DİP'te 35 gün, DİM'de 44 gün boyunca devam eden çalışmada, yapılan mikrobiyolojik incelemeler ile DİP ve DİM grubu balıklarda *Vibrio anguillarum* O1 suşunun reizolasyonu ve identifikasyonu teyit edildi. DİP'te uygulama süresince 11 balık (% 55) öldü, dokuz balık (% 45) ötanazi edildi. DİM'de sekiz balıkta (% 40) ölüm görüldü, 12 balığa (% 60) ise ötanazi uygulandı. Gruplarda ölümlere ilişkin bilgiler ile klinik ve makroskobik bulguların dağılımı Çizelge 1 ve Çizelge 3'de verildi ve bulgular var (+) ya da yok (-) şeklinde değerlendirildi. Her iki gruptaki balıklarda görülen mikroskobik bulgular ise şiddetine göre; yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olmak üzere dört grupta değerlendirildi ve Çizelge 2 ile Çizelge 4'te sunuldu.

İmmunohistokimyasal metodlardan indirekt immunoperoksidaz yöntemin kullanıldığı boyamada, elde edilen sonuçlar, etkenin doku ve organlarda bulunup bulunmamasına göre pozitif (+) ya da negatif (-) olarak değerlendirildi ve Çizelge 2 ile Çizelge 4'te verildi.

Kontrol gruplarında bulunan toplam 16 balık, deneme gruplarındaki balıklarla eş zamanlı olarak ötanazi edildi ve nekropsileri yapılarak karşılaştırmalı olarak incelendi.

3.1. Deneme İntraperitoneal Grup

3.1.1. Klinik Bulgular

DİP'te; ilk ölümler inokülasyonun üçüncü gününde görüldü. İnokülasyonun üçüncü günü bir, beşinci günü dört, altıncı günü iki, sekizinci günü iki, dokuzuncu günü bir ve 20. gününde de bir balık olmak üzere toplam 11 balıkta ölüm görüldü. Enfeksiyonun üçüncü gününde ölen balıkta herhangi bir klinik bulgu gözlenmedi. Beşinci ve dokuzuncu günler arasında ölenlerde, yeme karşı ilgisizlik, hareketlerde azalma, su yüzeyine yakın yüzmeye, sırt üstü ve yan pozisyonda yüzmeler görüldü. İnokülasyonun 15. günü sırt üstü pozisyonda yüzen iki balık ile 20. günde dik yüzmeye hareketi yapan bir balık ötanazi edildi. Yirmibeşinci günden itibaren ötanazi edilen balıkların kontrol grubundaki balıklara göre gelişimlerinin yavaş oldukları görüldü.

KİP'te, beşinci gün iki (olgu no; 1, 2), altıncı gün bir (olgu no; 3), sekizinci gün bir (olgu no; 4), 15. gün bir (olgu no; 5), 20. gün bir (olgu no; 6), 25. gün bir (olgu no; 7) ve 30. gün bir (olgu no; 8) olmak üzere toplam sekiz balığa ötanazi uygulandı. Kontrol grubundaki balıklarda klinik bulguya rastlanmadı.

3.1.2. Makroskobik Bulgular

Makroskobik bulgular balıkların çoğunda en belirgin olarak, deri, kas, karaciğer, dalak ve solungaçlarda, daha az olarak da mide, pilorik kese, bağırsak, karın boşluğu yağ dokusu, hava kesesi ve gözde görüldü.

Yüzme bozukluklarının görüldüğü üç olguda ekzoftalmus, üç olguda da gözde perioküler kanamalara rastlandı. Otuz ve 35. günlerde ötanazi edilen iki olguda sağ gözde iriste opasite gözlemlendi. Deri lezyonları, genellikle vücudun ventralinde 1-3 cm çapında, hiperemi ve kanamalar şeklindeydi (Şekil 1). Uygulamanın üçüncü gününden itibaren görülmeye başlayan bu lezyonlara yapılan kesitlerde karın duvarını oluşturan kasların tamamına yayıldıkları görüldü. Bu alanlarda kaslar şişkin ve koyu kırmızı renkteydiler. İki olguda deride düzensiz dağılımlı peteşiyel kanamalar gözlemlendi. Dorsal, ventral, pektoral ve kaudal yüzgeçler ile anüs etrafı hiperemikti. İnokülasyonun beşinci gününden sonra bazı balıklarda pullarda dökülmeler, 20. gününden itibaren ise deri renginde koyulaşma gözlemlendi. Otuz ve 35. günlerde ötanazi edilen iki olguda deri renginde açılma görüldü.

Karaciğerler şişkin, hardal sarısından açık griye kadar değişen renkteydi. İnokülasyonun üçüncü gününde görülmeye başlayan peteşiyel kanamalar (Şekil 2) çoğunlukla organın pariyetal yüzünde daha az olarak da viseral yüzünde gözlemlendi. Kanamaların ve renk değişikliklerinin görüldüğü olgulardan bazılarında safra keselerinin de dolu oldukları görüldü. Dalaklar büyümüş ve yumuşak kıvamlıydı (Şekil 3). Yirminci günden sonra ölen ya da ötanazi edilen balıklarda dalakların, kontrol grubundaki balıklara göre daha küçük oldukları görüldü.

Solungaçlar genellikle solgun renkteydi (Şekil 2, 4). Bazı olgularda solungaç lamellerinde hiperemi, peteşiyel kanama ve mukus artışı görüldü.

Sindirim sisteminde belirgin bir lezyon dikkati çekmedi. Lümenlerinde limon sarısından pembemsiye kadar değişen renkte içerik gözlemlendi. İki olguda, karın boşluğu yağ

dokusunda peteşiyel kanamalar saptandı.

Hava kesesi mat bir görünüme sahipti (Şekil 3). Üç olguda serozada peteşiyel kanamalar görüldü. KIP'deki sekiz balıkta da makroskobik bir değişiklik görülmedi.

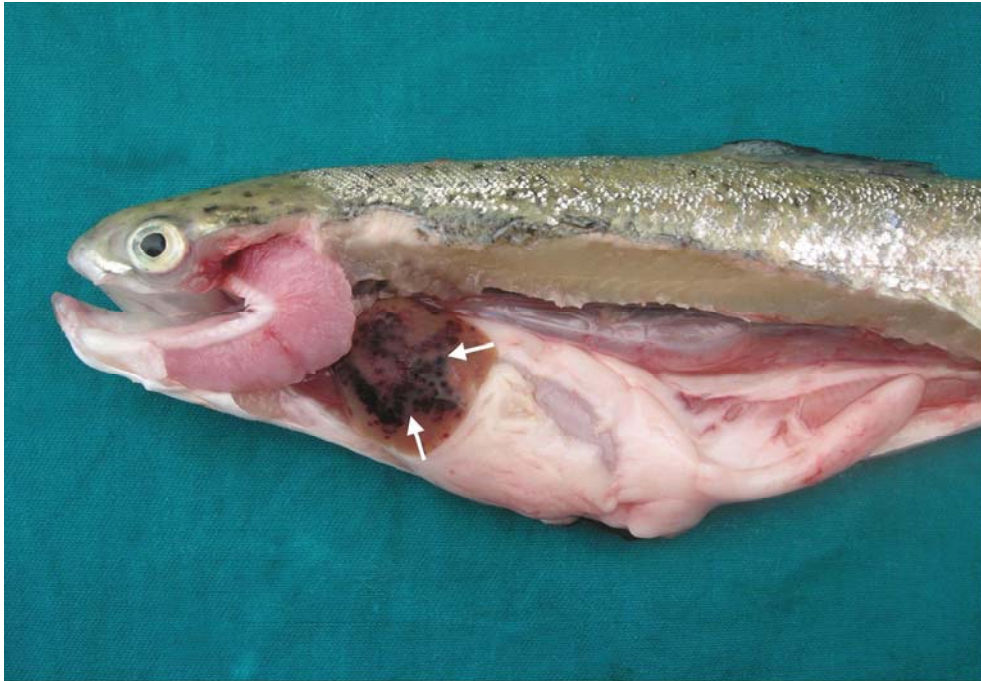
Çizelge 1. Grup I (Deneme İntraperitoneal Grup; DİP)' de ölüm günleri, klinik ve makroskobik bulgular

Olgu No	Ölüm Günleri	Klinik Bulgular			Makroskobik Bulgular																								
					Göz			Deri								İskelet Kası		Karaciğer			Dalak	Solungaç			Yağ Doku	Hava Kesesi			
		Yeme karşı ilgisizlik	Hareketlerde azalma	Düzensiz yüzme	Ekzoftalmus	Perioküler kanama	İriste opasite	Pullarda dökülme	Renkte koyulaşma	Renkte açılma	Hiperemi ve kanama (bir alanda)	Hiperemi ve kanama (iki alanda)	Kanama (peteşiyel)	Kanama (çizgisel)	Yüzgeçlerde hiperemi	Antüs etrafında hiperemi	Hiperemi	Kanama	Pariyetal yüzde kanama	Viseral yüzde kanama	Renk değişikliği	Safra kesesinde dolgunluk	Büyüme	Soluk renklilik	Hiperemi	Kanama	Mukus artışı	Kanama	Matlaşma
1	3. gün ölüm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
2	5. gün "	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
3	5. gün "	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
4	5. gün "	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
5	5. gün "	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6	6. gün "	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
7	6. gün "	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
8	8. gün "	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
9	8. gün "	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10	9. gün "	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	15. gün ötanazi	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
12	15. " "	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
13	20. gün ölüm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	20. gün ötanazi	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	25. " "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
16	25. " "	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
17	30. " "	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
18	30. " "	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
19	35. " "	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
20	35. " "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

(-) Klinik/makroskobik bulgu görülmedi, (+) klinik/makroskobik bulgu görüldü.



Şekil 1. DİP. A. Karın bölgesinde (ok) ve yüzgeçlerde (ok başları) kanama, olgu no; 2.
B. Karın bölgesinde (ok) kanama, olgu no; 7.



Şekil 2. DİP. Karaciğerde kanamalar (oklar) ve solungaçta solgunluk, olgu no; 3.



Şekil 3. DİP. Periküler kanama (ok), solungaç kemeri boyunca peteşiyel kanama (okbaşı), dalakta büyüme (*) ve hava kesesinde matlaşma (ok), olgu no; 4.



Şekil 4. DİP. A. Solungaçta solgunluk ve anüs etrafında hiperemi (ok), olgu no; 8.
KİP. B. Normal solungaç, olgu no; 4.

3.1.3. Mikroskopik Bulgular

Bu grupta en belirgin mikroskopik bulgular iskelet kaslarında görüldü. Bu lezyonlar; hiperemi, ödem, kanama, dejenerasyon ve nekrozlardan oluşmaktaydı. Ödem intersitisyel dokuda yaygın olarak görüldü. Ödeme bağlı kas demetlerini çevreleyen endomizyumlarda belirgin ayrılmalar dikkati çekti. Aynı bölgelerde yaygın hiperemi ve kanamalar saptandı. Beşinci gün ile dokuzuncu gün arasında ölen balıklarda dejenerasyon ve nekrozlar oldukça belirgindi. Dejenerasyonların hafif olduğu olgularda miyofibriller seçilebilmekte iken, şiddetli olgularda koyu pembe, homojen halde görüldüler. Geniş alanlarda gözlenen nekrozlar tüm olgularda erime nekrozları şeklindeydi (Şekil 5a,b). Bu olgularda miyositlerin endomizyumların bozulmaksızın periferden merkeze doğru kısmen ya da tamamen boşaldıkları dikkati çekti. Boşalan bu alanlar eritrositler, daha az olarak da bakteri kümeleri ile doluydu. Benzer bakteri kümeleri hem damar lümenlerinde hem de intersitisyumda yoğun olarak saptandı.

Solungaçlarda ödem, hiperemi ve kanama, epitellerde dökülme, telangiektazi, epitel hücrelerinde nekroz, eozinofilik granüler hücrelerde (EGH) artış ve hiperplazi gözlenen başlıca mikroskopik bulgularıdır. Sekunder lamellerde ödem (Şekil 6a) ve epitellerde ayrılmalar tüm deneme grubu balıklar ile kontrol grubu üç balıkta belirlendi. Bazı olgularda ödem ve epitellerde ayrılmalar oldukça belirgindi. Hiperemi ve kanama, primer ve sekunder lameller yanında, solungaç kemerlerinde de gözlemlendi. Sekunder lamellerde saptanan telangiektazilerin sayısı bir solungaç kesitinde bir ile dört arasında değişiyordu. Epitel hücrelerinde nekroz (Şekil 6b) kanamalar ile birlikte inokülasyonun ilk sekiz gününde ölen balıklarda görüldü. Primer lamellerde EGH artışı dikkati çekti. Çoğunluğu degranüle olmuş EGH artışına ilişkin bazı lamellerde kalınlaşmalar tespit edildi (Şekil 7). İnterlameller hiperplazi hem deneme hem de kontrol grubundaki birçok balıkta görülen diğer bulguydu. Deneme grubu balıklarda hiperplazilerin yaygınlığı ve kalınlığı daha fazlaydı. Orta ve şiddetli olarak değerlendirilen bu olgularda lameller arasında adezyonlar belirgindi.

Kalpte ventrikulusda, endotelial makrofajlarda aktivasyon (Şekil 8a), ödem ve endomizyumlarda ayrılmalar görüldü. Bazı balıklarda az sayıda mononükleer hücrelerden oluşan epikarditis dikkati çekti (Şekil 8b).

Karaciğerde, hiperemi, kanama, dejenerasyon ve nekroz (Şekil 9) gözlenen mikroskopik bulgulardı. Onbeşinci güne kadar ölen ya da ötanazi edilen balıklarda hiperemi ve fokal kanamalar oldukça belirgindi. Bu olgularda sinuzoidler genişlemiş, vena sentralisler hiperemikti. Kanamalar, iki balıkta dejenerasyon, beş olguda dejenerasyon ve multifokal koagülasyon nekrozları ile birlikte saptandı. Üç olguda nekroz alanları bakteri kümeleri ile doluydu. Bazı balıkların hepatositlerinde değişen büyüklüklerde vakuoller görüldü ve bunların Modifiye Sudan Black B boyamada yağ vakuolleri olduğu saptandı. Mononükleer hücre infiltrasyonlarına iki olguda rastlandı.

Böbrekte proksimal tubulus epitellerinde dejenerasyonlar saptandı. Bu hücrelerin sitoplazmaları genellikle granüler görünümde ve değişen büyüklüklerde eozinofilik hiyalin damlacıkları içermekteydi (Şekil 10b). Üç olguda da intersitisyumda kanamalara rastlandı.

Dalakta sinuslar pembe eozinofilik ödem sıvısı ve eritrositler ile doluydu. Enfeksiyonun beşinci gününde ölen üç balıkta multifokal nekrozlar görüldü (Şekil 11). İki olguda nekroz alanları bol miktarda bakteri kümeleri ile doluydu.

Hava kesesinde damarlar hiperemik, seroza ödemliydi. Ödemin görüldüğü bir olguda serozal damarlar bakteri kümeleri ile doluydu. Üç olguda makroskopik olarak da gözlenen kanamalar sadece serozada görüldü. İki olguda serozada mononükleer hücre infiltrasyonları saptandı.

Midede en belirgin mikroskopik bulgu submukozadaki EGH'larda görülen artışlar ve degranülasyonlardı. Bu olgularda EGH'ların hem tunika muskularis hem de lamina propriyaya doğru yerleştiği görüldü. Üç olguda mide bez epitellerinde nekrozlar belirlendi. İnokülasyonun beşinci gününde ölen bir olguda mide submukozasında yoğun bakteri kümeleri dikkati çekti. Pilorik keselerde EGH'larda artış ve degranülasyonlar ile epitellerde nekrotik değişiklikler görüldü. Dört olguda yağ dokuda kanamalar belirlendi. Bağırsakların özellikle pars posteriyöründe villus epitellerinde dejenerasyon, nekroz ve dökülmeler görüldü.

Işık mikroskopik incelemelerde etkenlerin görüldüğü; kas (Şekil 12a), karaciğer (Şekil 12b), dalak, mide ve hava kesesi kesitlerine yapılan Brown-Brenn bakteri boyamalarında, bakteri pozitif sonuçlar elde edildi. DİP'teki balıklarla eş zamanlı olarak nekropsileri yapılan KİP'deki balıklarda herhangi bir mikroskopik bulguya rastlanmadı.

3.1.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

DİP'te bakteriyel antijene inokülasyonun üçüncü gün ile dokuzuncu günler arasında ölen balıklarda görüldü. Pozitif boyanmalar genellikle bakterinin morfolojik şeklini göstermekte ya da bazı alanlarda diffuz boyanmalar şeklindeydi. Onbeşinci günden itibaren ölen ya da ötanazi edilen balıklarda pozitif boyanmalara ilişkin herhangi bir bulguya rastlanmadı. Bu grupta en yoğun pozitif boyanmalar iskelet kaslarında görüldü. Reaksiyonlar damar lümenlerinde, intersitisyumda ve nekrotik miyositlerde oldukça kuvvetliydi (Şekil 13b). Solungaçlarda immunopozitif reaksiyonlar damar lümenleri, telangiektazik ve hiperplazik alanlarda dikkati çekti. Kalpte immunopozitif etkenler sıklıkla epikartda daha az olarak da ventrikulus kas demetleri arasında (Şekil 14) belirlendi. Karaciğerde pozitif reaksiyonlar, vena sentralisler etrafında (Şekil 15) ve sinuzoidlerde görüldü. Bir olguda (olgu no; 9) da sadece serozada pozitif reaksiyonlara rastlandı. Mikroskobik değişikliklerin az görüldüğü böbreklerde pozitif boyanmalar yalnızca kapsulada dikkati çekti. Pozitif reaksiyonlar; dalakta nekroz alanlarında (Şekil 16b) ve sinuslarda, mide submukozasında (Şekil 17), pilorik kese ve bağırsak villuslarında da gözlemlendi. Karın boşluğu yağ dokusunda da pozitif reaksiyonlara damar lümenleri ile bu damarlara yakın alanlarda rastlandı. KİP'teki balıklarda ise pozitif boyanmalar saptanmadı.

Çizelge 2. Grup I' (Deneme İntraperitoneal Grup; DİP) de mikroskobik ve immunohistokimyasal bulguların dağılımı

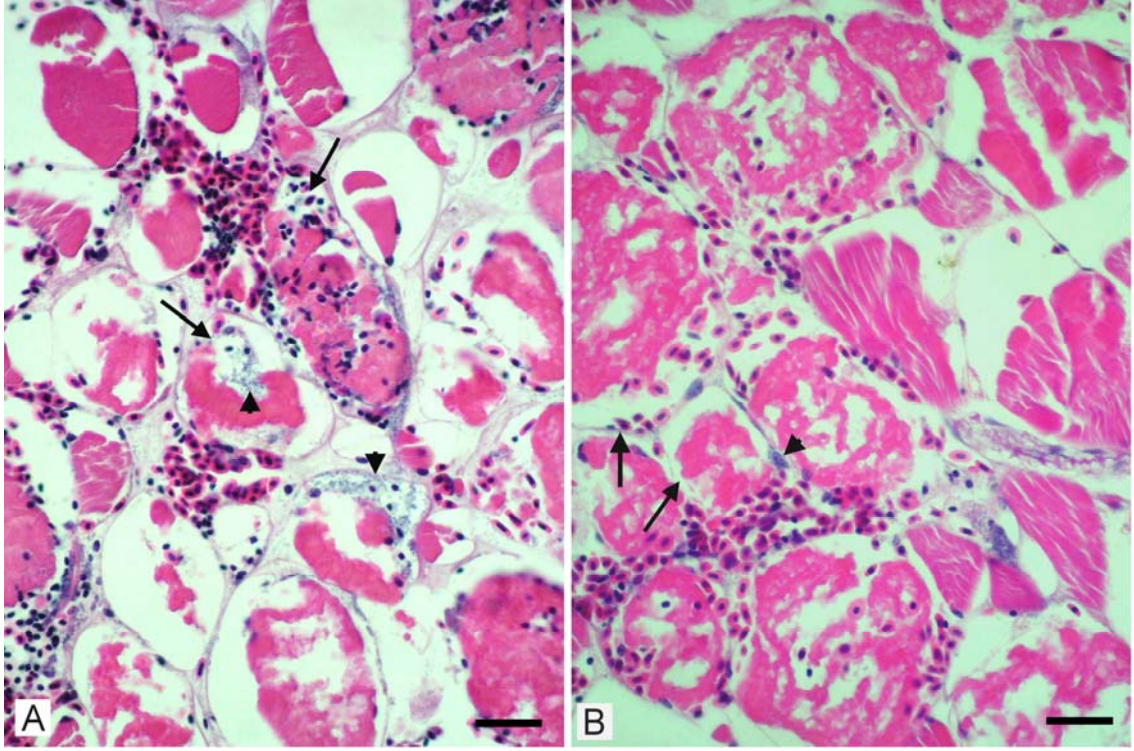
Olgu No	İskelet Kası							Solungaç									Kalp				Karaciğer							Böbrek									
	Hiperemi	Ödem	Kanama	Dejenerasyon	Nekroz	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Ödem	Hiperemi	Kanama	Telangiektazi	Epitellerde ayrılma	Epitel hücrelerinde nekroz	EGH'larda artış ve degranülasyon	Hiperplazi	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Endomizyumda ayrılma	Endotelial makrofaj aktivasyonu	Epikardit	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Hiperemi	Kanama	Yağlanma	Dejenerasyon	Nekroz	Hücre infiltrasyonu	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Ödem	Hiperemi	Kanama	Tubulus dejenerasyonu	Tubuluslarda hiyalin damlları	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular
1	1	1	1	0	0	0	+	3	2	2	0	2	2	0	0	0	+	0	0	0	0	-	1	2	2	3	3	0	0	+	1	2	1	1	2	0	-
2	2	2	3	2	3	3	+	3	1	0	0	3	3	2	0	0	-	0	0	1	0	+	2	2	0	2	2	0	3	+	0	0	0	0	1	0	-
3	3	3	3	3	3	3	+	3	1	1	2	3	3	2	1	0	+	2	2	2	0	+	3	2	0	3	3	0	3	+	0	0	0	1	1	0	-
4	3	3	3	3	3	3	+	1	2	1	1	1	3	1	1	0	+	0	1	2	0	+	2	2	1	2	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+
5	3	3	2	3	3	3	+	1	1	0	1	0	1	0	0	0	+	0	0	1	0	+	1	3	0	1	2	0	2	+	0	0	0	3	3	0	+
6	2	2	2	3	2	2	+	2	3	3	1	1	1	2	3	0	+	0	0	0	0	-	1	2	0	2	2	0	0	-	0	0	0	3	3	0	-
7	2	2	2	3	3	3	+	1	2	1	1	0	0	3	2	0	+	2	2	0	0	+	3	3	0	3	0	0	0	-	1	1	0	1	1	0	-
8	2	2	2	2	1	1	+	0	0	0	1	0	1	3	0	0	-	1	1	0	0	-	1	2	0	0	0	0	+	0	0	0	2	2	0	-	
9	2	2	2	0	0	0	-	3	3	3	0	2	1	1	0	0	-	0	0	0	0	-	3	3	0	0	0	1	0	+	0	0	0	1	1	0	-
10	3	3	3	3	3	3	+	1	2	1	1	0	0	3	3	0	-	0	0	0	0	+	1	1	0	0	0	0	-	0	0	0	3	3	0	-	
11	1	1	1	1	0	0	-	1	1	0	2	0	0	0	2	0	-	0	0	0	0	-	1	2	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	
12	0	0	0	0	0	0	-	2	3	0	0	0	0	0	0	0	-	2	1	0	0	-	1	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	
13	0	0	0	0	0	0	-	2	2	0	2	1	0	0	1	0	-	2	2	2	0	-	0	0	3	0	0	1	0	-	2	1	1	3	3	0	-
14	0	0	0	0	0	0	-	0	2	1	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	1	0	0	1	2	0	-	1	1	2	0	0	0	-	
15	2	1	1	1	0	0	-	0	1	0	0	0	0	3	0	0	-	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	1	1	0	-	
16	0	0	0	0	0	0	-	2	0	0	0	1	0	3	2	0	-	0	0	0	0	-	0	0	3	0	0	0	-	0	0	0	3	3	0	-	
17	0	0	0	0	0	0	-	2	1	0	2	1	0	2	0	0	-	0	0	0	0	-	0	0	3	2	0	0	-	1	1	0	2	3	0	-	
18	0	0	0	0	0	0	-	3	1	1	0	2	0	0	1	0	-	0	0	0	0	-	0	0	3	2	0	0	-	1	1	0	1	1	0	-	
19	0	0	0	0	0	0	-	3	1	0	1	2	0	0	0	0	-	2	2	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	1	1	0	2	3	0	-	
20	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	2	1	0	-	0	0	0	0	-	0	0	3	2	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	

(0) Bulgu yok, (1) hafif, (2) orta, (3) şiddetli, (-) negatif, (+) pozitif

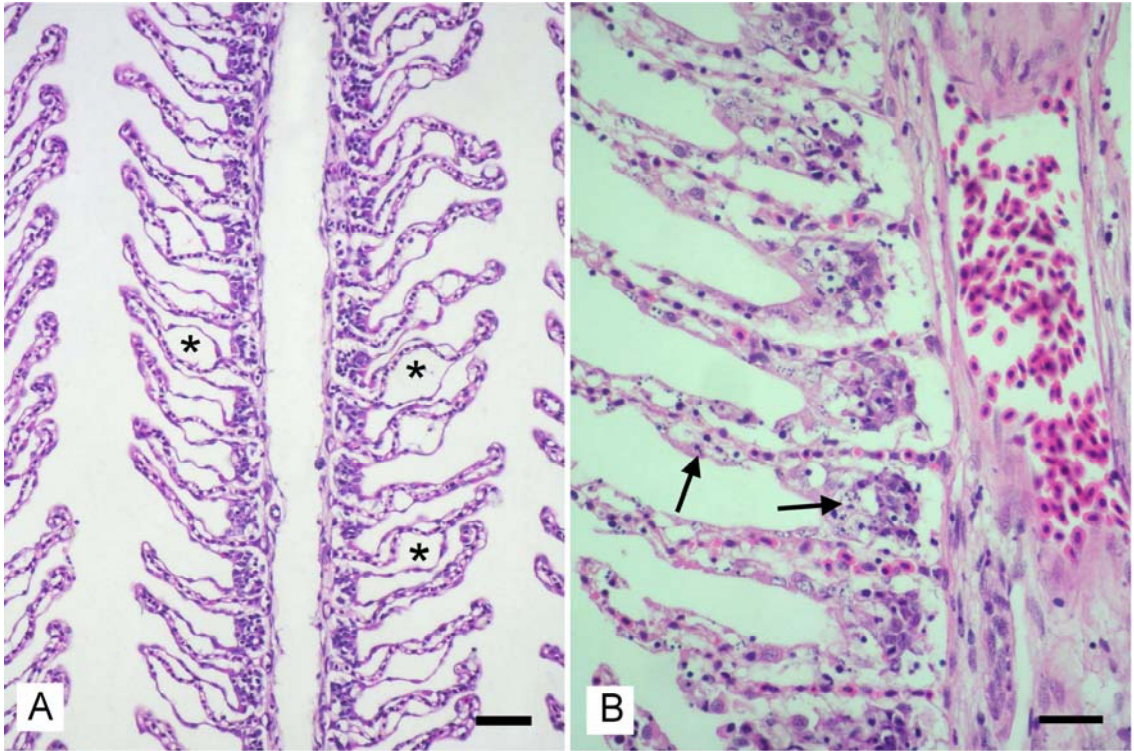
Çizelge 2. Devam. Grup I' (Deneme İntraperitoneal Grup; DİP) de mikroskopik ve immunohistokimyasal bulguların dağılımı

Olgu No	Dalak				Hava kesesi						Mide						Pilorik kese				Yağ Doku				Bağırsak						
	Ödem	Nekroz	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Ödem	Hiperemi	Kanama	Hücre infiltrasyonu	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Epitellerde dökülme	Epitellerde nekroz	Bezlerde nekroz	EGH'larda artış ve degranülasyon	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Kanama	Epitellerde dökülme	Epitellerde nekroz	EGH'larda artış ve degranülasyon	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Hiperemi	Kanama	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Kanama	Epitellerde dökülme	Epitellerde nekroz	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular
1	1	0	0	-	3	0	0	0	0	-	0	0	3	1	0	-	0	0	1	3	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-
2	3	3	3	+	2	0	0	0	2	+	0	0	0	0	0	+	0	0	1	0	0	-	1	1	0	+	0	0	0	0	+
3	2	1	0	-	1	2	3	0	0	-	0	0	0	3	0	+	0	0	1	1	0	+	0	0	0	+	0	1	2	0	+
4	3	3	3	+	3	1	0	0	0	-	0	0	0	2	0	-	3	0	0	0	0	-	1	1	0	+	0	0	0	0	+
5	0	0	0	-	2	0	0	0	0	-	0	0	0	2	3	-	0	2	2	2	0	-	0	0	0	+	0	1	0	0	+
6	1	0	0	+	3	1	0	0	0	+	0	1	2	0	0	+	3	2	3	3	0	-	0	0	3	+	0	0	0	0	-
7	2	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	1	2	0	+	0	1	1	0	-
8	1	0	0	-	0	0	0	2	0	+	0	0	2	1	0	+	0	1	0	0	0	+	0	0	0	+	0	1	2	0	+
9	2	0	0	-	1	2	3	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	1	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-
10	2	0	0	-	0	0	0	0	0	-	1	1	0	3	0	+	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	2	0	-
11	0	0	0	-	1	1	1	0	0	-	0	0	0	3	0	-	0	0	0	0	0	-	1	2	0	-	0	0	0	0	-
12	0	0	0	-	3	1	0	0	0	-	0	0	0	2	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-
13	0	0	0	-	1	1	1	1	0	-	0	1	0	3	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-
14	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-
15	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	1	0	0	3	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-
16	0	0	0	-	1	2	3	0	0	-	0	0	0	2	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-
17	1	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-
18	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-
19	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-
20	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	-

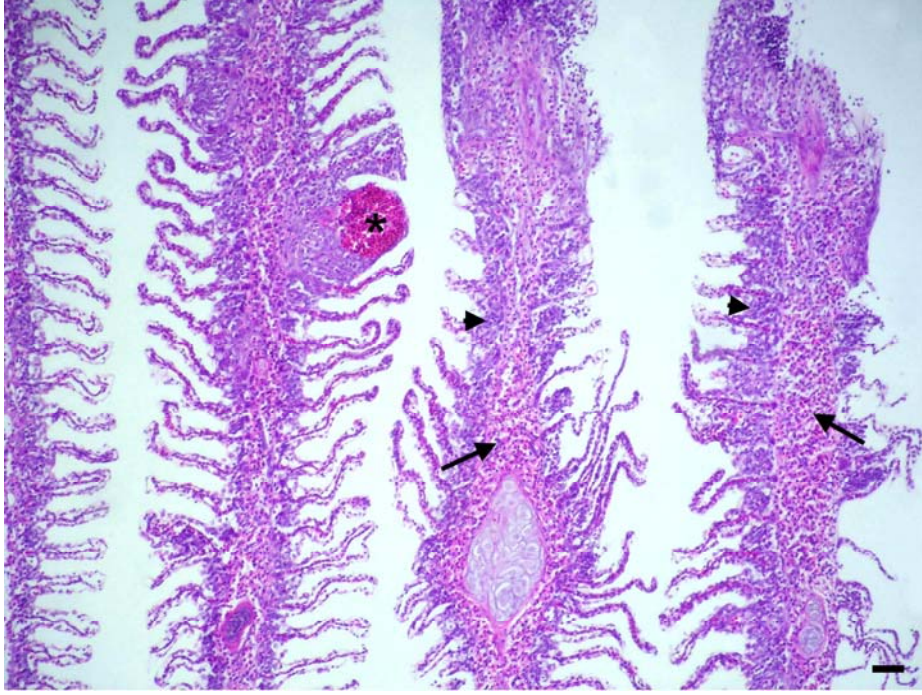
(0) Bulgu yok, (1) hafif, (2) orta, (3) şiddetli, (-) negatif, (+) pozitif



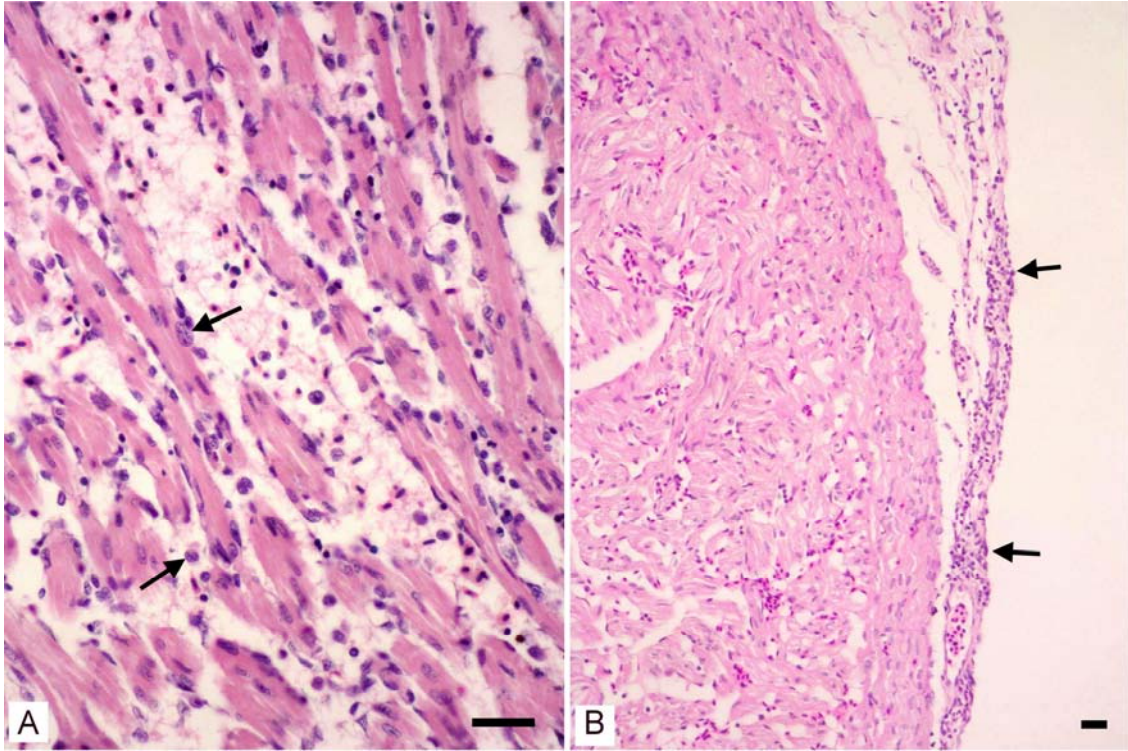
Şekil 5. DİP. İskelet Kası. Erime nekrozları (oklar), nekrotik kas demetlerinde ve damar lümenlerinde bakteri kümeleri (ok başları), A. Olgu no; 7, HE., Bar: 30 µm.
B. Olgu no; 10, HE., Bar: 30 µm.



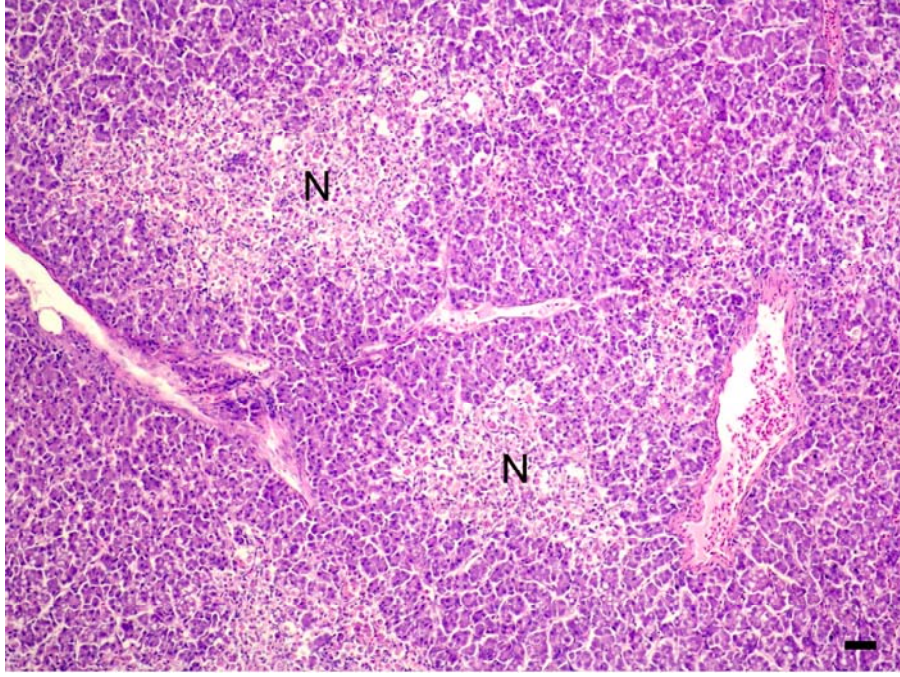
Şekil 6. DİP. Solungaç. A. Sekunder lamellerde ödem (*), olgu no; 2, HE., Bar: 50 µm.
B. Primer ve sekonder lamel epitel hücrelerinde nekrozlar (oklar), olgu no; 4, HE., Bar: 30 µm.



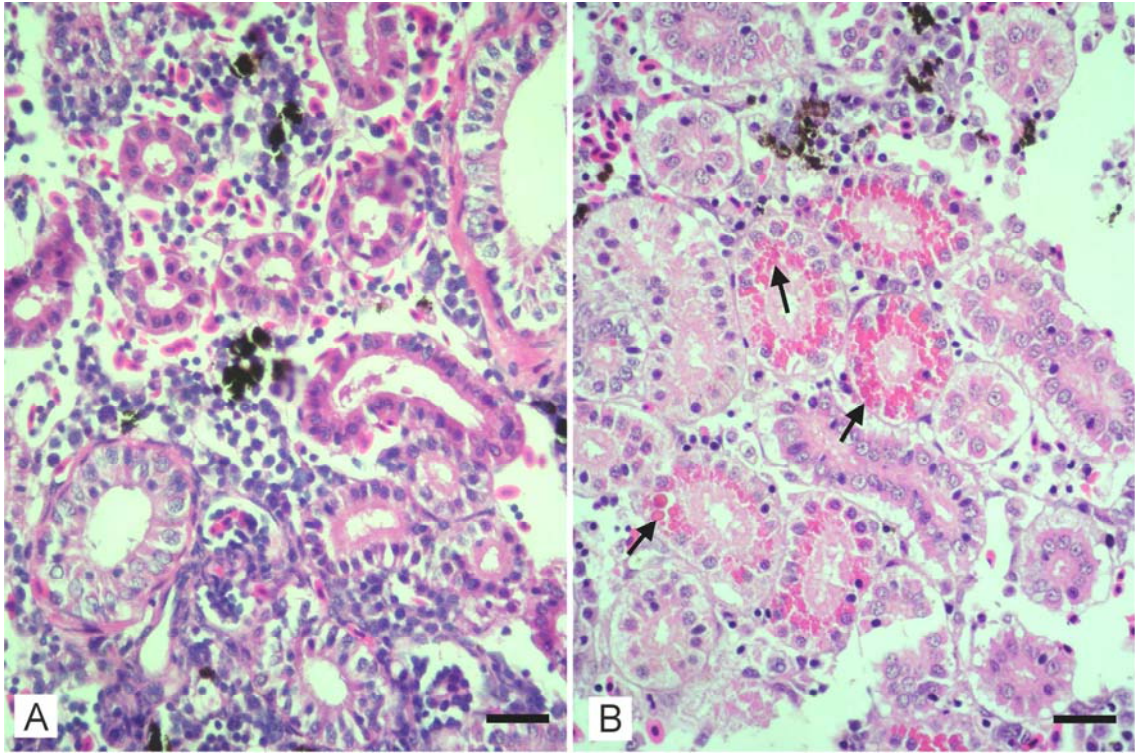
Şekil 7. DİP. Solungaç. Primer lamellerde eozinofilik granüler hücrelerde artış (oklar), interlameller hücre hiperplazisi (okbaşları) ve telangiektazi (*), olgu no; 10, HE., Bar: 50 µm.



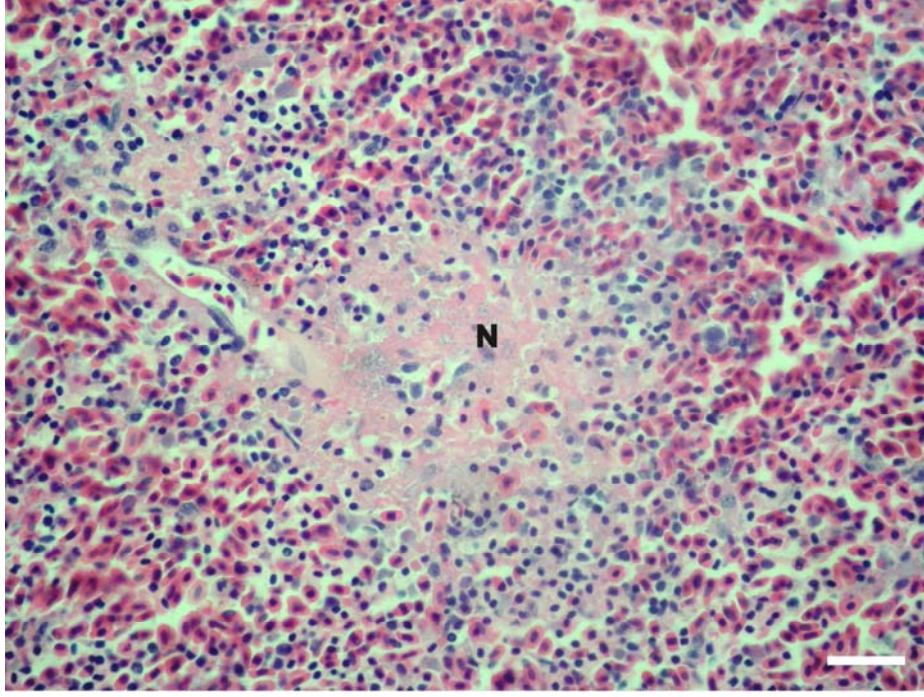
Şekil 8. DİP. Kalp Kası. A. Endotelial makrofajlarda aktivasyon (oklar), olgu no; 3, HE., Bar: 30 µm. B. Mononükleer hücre infiltrasyonlarının oluşturduğu epikarditis (oklar), olgu no; 13, HE., Bar:50 µm.



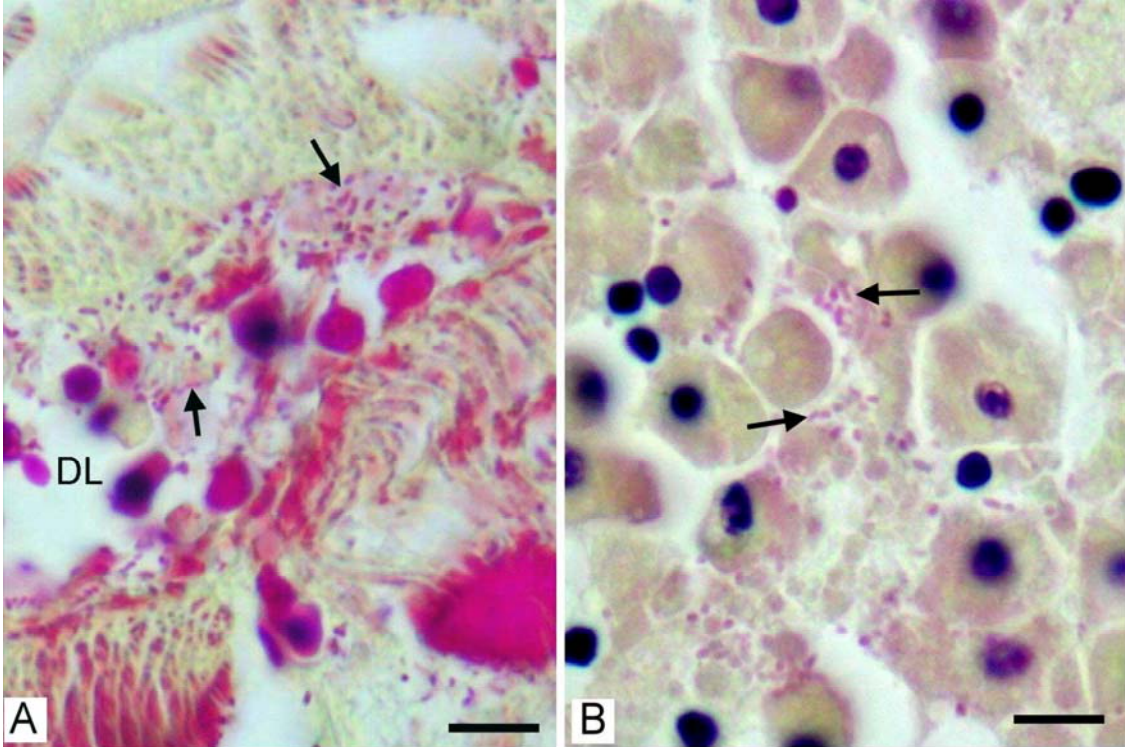
Şekil 9. DİP. Karaciğerde multifokal koagülasyon nekrozları (N: Nekroz), olgu no; 1, HE., Bar: 50 µm.



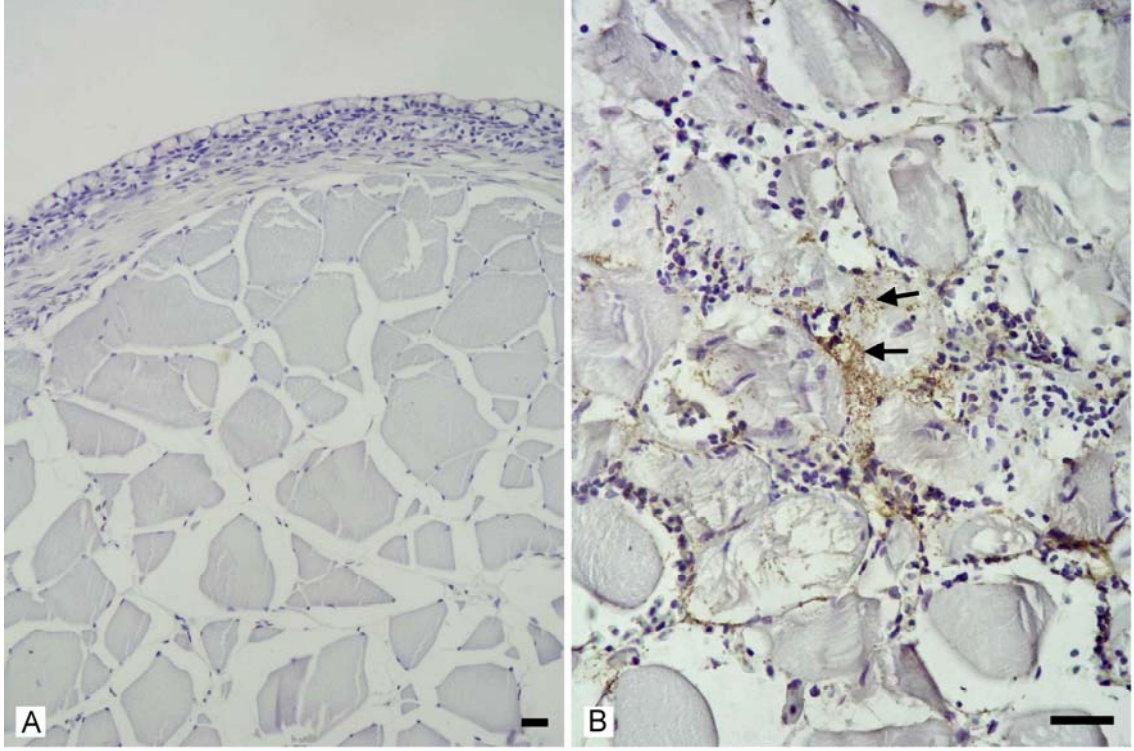
Şekil 10. Böbrek. A. KİP, normal, olgu no; 4, HE., Bar: 30 µm. B. DİP. Proksimal tubulus epitellerinde eozinofilik hiyalin damlaları (oklar), olgu no; 8, HE., Bar: 30 µm.



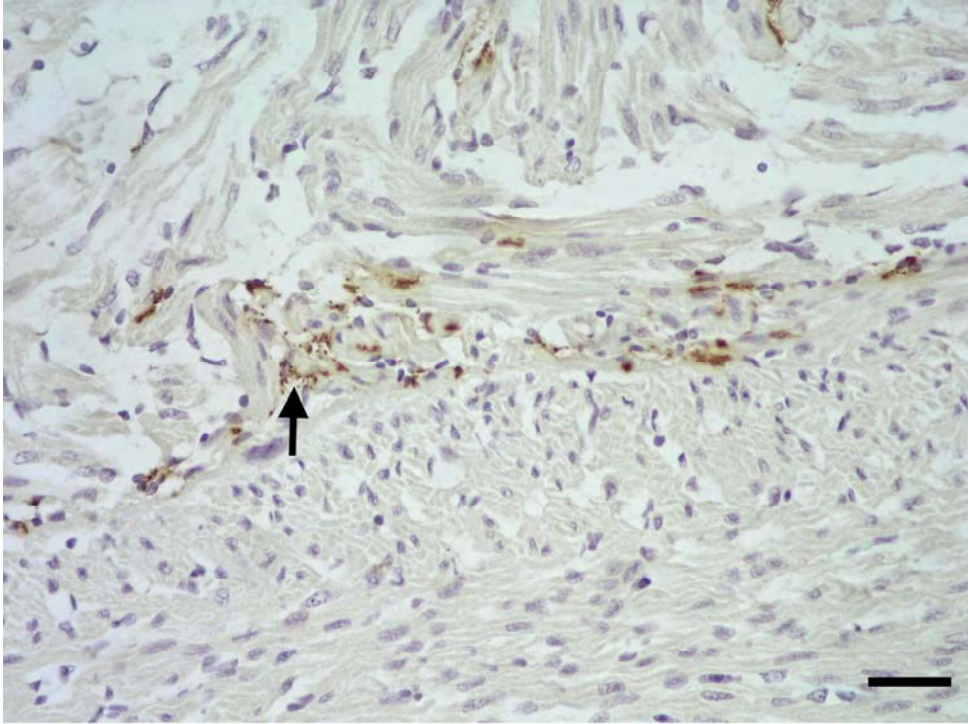
Şekil 11. DİP. Dalakta fokal nekroz (N: Nekroz), olgu no; 2, HE., Bar: 30 µm.



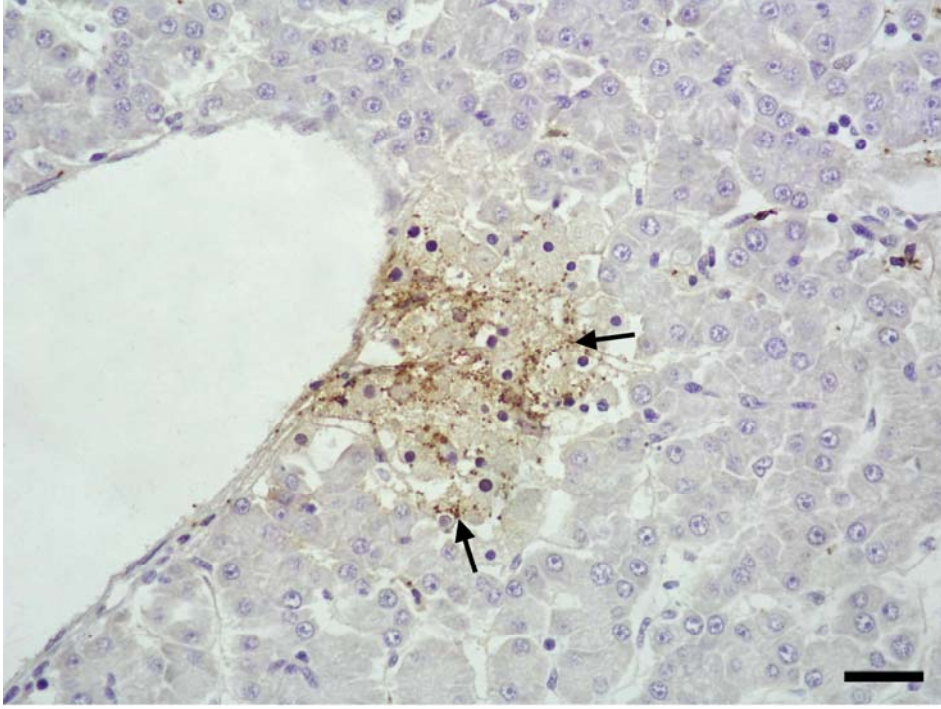
Şekil 12. DİP. A. İskelet kası damar lümeninde Gram-negatif bakteriler (DL: Damar lümeni, oklar), olgu no; 4, Brown-Brenn, Bar: 10 µm. B. Karaciğerde sinuzoidlerde Gram-negatif bakteriler (oklar), olgu no; 3, Brown-Brenn, Bar: 10 µm.



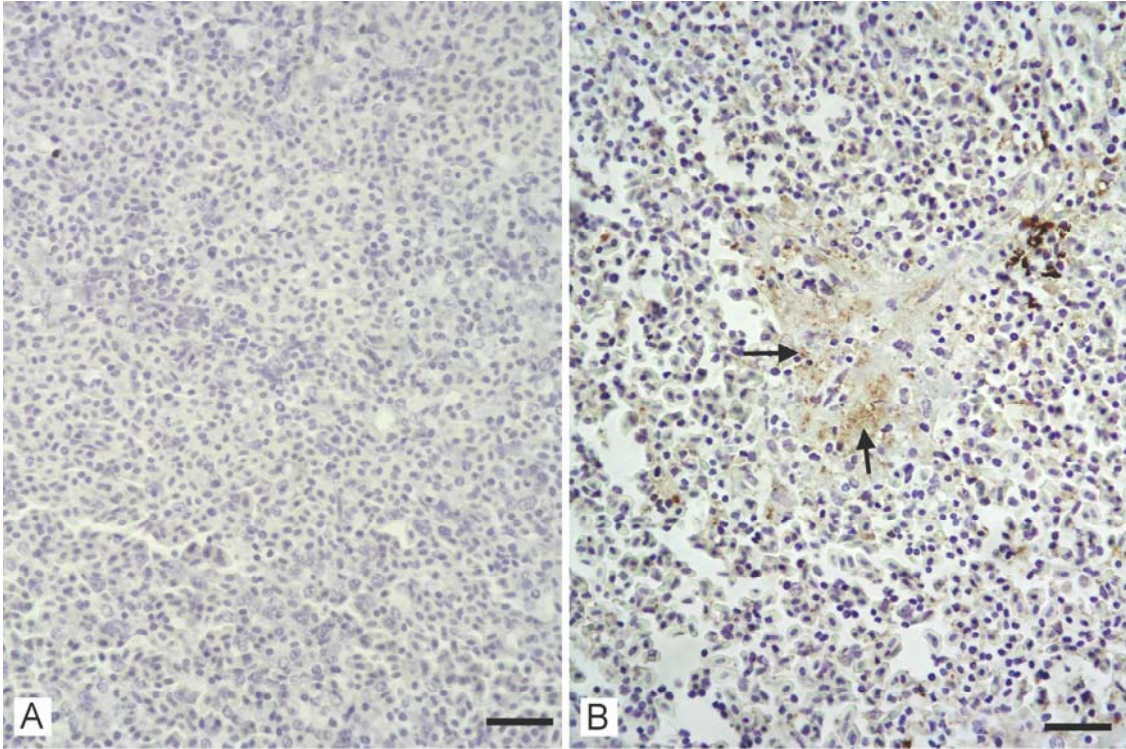
Şekil 13. A. KİP. İskelet Kası. İmmunoperoksidaz kontrol, olgu no; 2, İP., Bar: 50 µm.
B. DİP. İskelet Kası. İntersitisyumda ve nekrotik kas demetlerinde immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 2, İP., Bar: 30 µm.



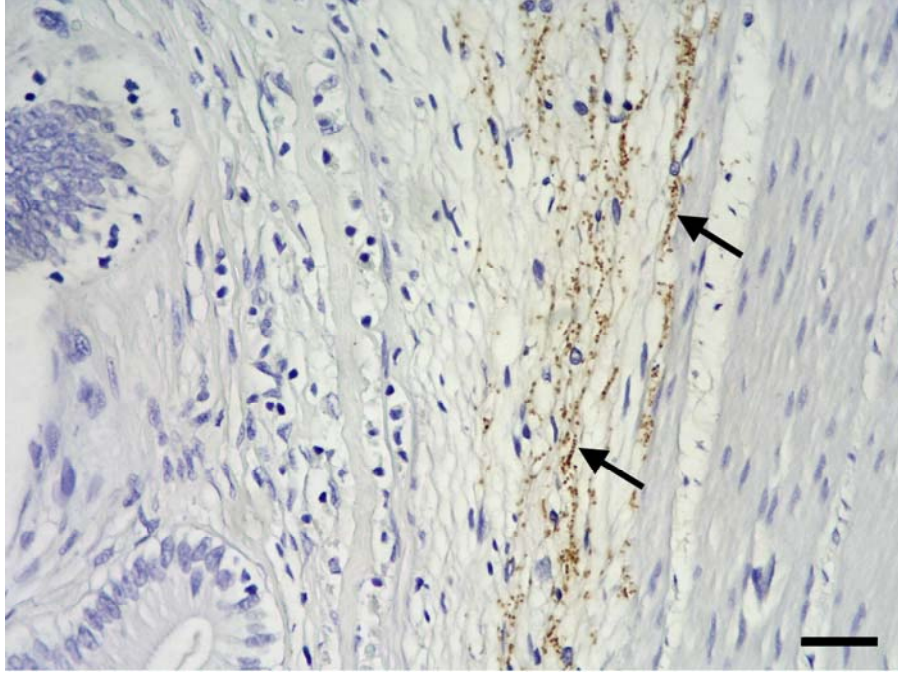
Şekil 14. DİP. Kalpte ventrikülüs kas demetleri arasında immunopozitif boyanmalar (ok), olgu no; 3, İP., Bar: 30 µm.



Şekil 15. DİP. Karaciğerde vena sentralis etrafında immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 2, İP., Bar: 30 µm.



Şekil 16. A. KİP. Dalak. İmmunoperoksidaz kontrol, olgu no; 2, İP., Bar: 50 µm.
B. DİP. Dalak. Nekroz alanında immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 2, Bar: 30 µm.



Şekil 17. DİM. Mide submukozasında immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 6, İP., Bar: 30 µm.

3.2. Deneme İmmersiyon Grup

3.2.1. Klinik Bulgular

DİM’de ilk ölümler inokülasyonun beşinci gününde başladı. İnokülasyonun beşinci günü üç, altıncı günü iki, 11. günü iki ve 22. günü bir balık olmak üzere toplam sekiz balıkta ölüm şekillendi. İnokülasyonun beşinci gününde ölen balıkların durgun ve genellikle havuzun kenarında ve yüzeye yakın yüzdükleri görüldü. Altıncı ve 11. günlerde ölen balıklarda düzensiz yüzme hareketleri gözlemlendi. Onbirinci günden sonra ölen ya da ötanazi edilen balıklarda klinik bulgu belirlenemedi.

KİM’de, beşinci gün iki (olgu no; 1, 2), altıncı gün bir (olgu no; 3), 11. gün bir (olgu no; 4), 20. gün bir (olgu no; 5), 24. gün bir (olgu no; 6), 29. gün bir (olgu no; 7) ve 34. gün bir (olgu no; 8) olmak üzere toplam sekiz balık ötanazi edildi. Bu gruptaki balıklarda klinik bulguya rastlanmadı.

3.2.2. Makroskobik Bulgular

Bu grupta gözlenen makroskobik bulgular, DİP’teki balıklara göre daha hafif seyirliydi ve daha az sayıda balıkta görüldü. Lezyonlar sıklıkla solungaçlarda, daha az olarak da deri, kas, hava kesesi, dalak ve karaciğerde belirlendi.

Deride, pullarda dökülme, kanama ve yüzgeçlerde hiperemi gözlenen başlıca makroskobik bulgulardı. Beşinci ve altıncı günde ölen balıklarda şekillenen bu kanamalar çizgisel yapıda, genellikle kaudal ve/veya lateral yerleşimliydi (Şekil 18). Bir olguda çizgisel kanama ile birlikte operkulumun iç ve dış yüzünde kanamalar dikkati çekti (olgu no; 2). Altıncı gün ile 20. gün arasında ölen ya da ötanazi edilen balıklarda pullarda dökülmeler görüldü. Dört olguda da anüs etrafı hiperemikti.

Karaciğer hardal sarısı renginden açık griye kadar değişen renk değişiklikleri görüldü (Şekil 19). İnokülasyonun beşinci gününde ölen bir olguda karaciğerin pariyetal yüzünde kanama saptandı. Dalak altıncı günde ölen bir balıkta şişkin ve yumuşak kıvamlıydı. Yirmiikinci günden itibaren ölen ya da ötanazi edilen balıklarda dalakların, kontrol grubu balıklarına göre daha küçük oldukları gözlemlendi.

Solungaçlarda soluk renklilik ve mukus artışı ile birlikte lamellerin şişkinliği dikkati çekti. Ayrıca üç olguda hiperemi ve dört olguda peteşiyel kanamalar (Şekil 19) gözlemlendi. Hava kesesi kalınlaşmış ve mat görünümündü (Şekil 20). İnokülasyonun beşinci ve altıncı günlerinde ölen balıklarda serozada peteşiyel kanamalara rastlandı. Mide, pilorik kese ve bağırsaklarda genellikle limon sarısı renginde bir içerik gözlemlendi. Bazı olgularda bu içerik açık kırmızı renkteydi. Karın boşluğu yağ dokusunda gözlenen tek makroskobik bulgu peteşiyel kanamalar idi. KİM’deki balıklarda ise makroskobik bir bulgu belirlenemedi.

Çizelge 3. Grup II (Deneme İmmersiyon Grup; DİM)' de ölüm günleri, klinik ve makroskopik bulgular

Olgu No	Ölüm Günleri	Klinik Bulgular			Makroskopik Bulgular																								
					Göz			Deri										İskelet Kası		Karaciğer			Dalak	Solungaç			Yağ doku	Hava Kesesi	
		Yeme karşı ilgisizlik	Hareketlerde azalma	Düzensiz yüzme	Eksoftalmus	Perioküler kanama	İriste opasite	Pullarda dökülme	Renkte koyulaşma	Renkte açılma	Hiperemi ve kanama (bir alanda)	Hiperemi ve kanama (iki alanda)	Kanama (peteşiyele)	Kanama (çizgisel)	Yüzgeçlerde hiperemi	Anüs etrafında hiperemi	Hiperemi	Kanama	Pariyetal yüzde kanama	Viseral yüzde kanama	Renk değişikliği	Safra kesesinde dolgunluk	Büyüme	Soluk renklilik	Hiperemi	Kanama	Mukus atrışı	Kanama	Matlaşma
1	5. gün ölüm	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	
2	5. gün "	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
3	5. gün "	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
4	6. gün "	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
5	6. gün "	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
6	11. gün "	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
7	11. gün "	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
8	20. gün ötanazi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	20. gün "	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
10	22. gün ölüm	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
11	24. gün ötanazi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
12	24. gün "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
13	29. gün "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
14	29. gün "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	34. gün "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
16	34. gün "	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	39. gün "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
18	39. gün "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	44. gün "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	44. gün "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

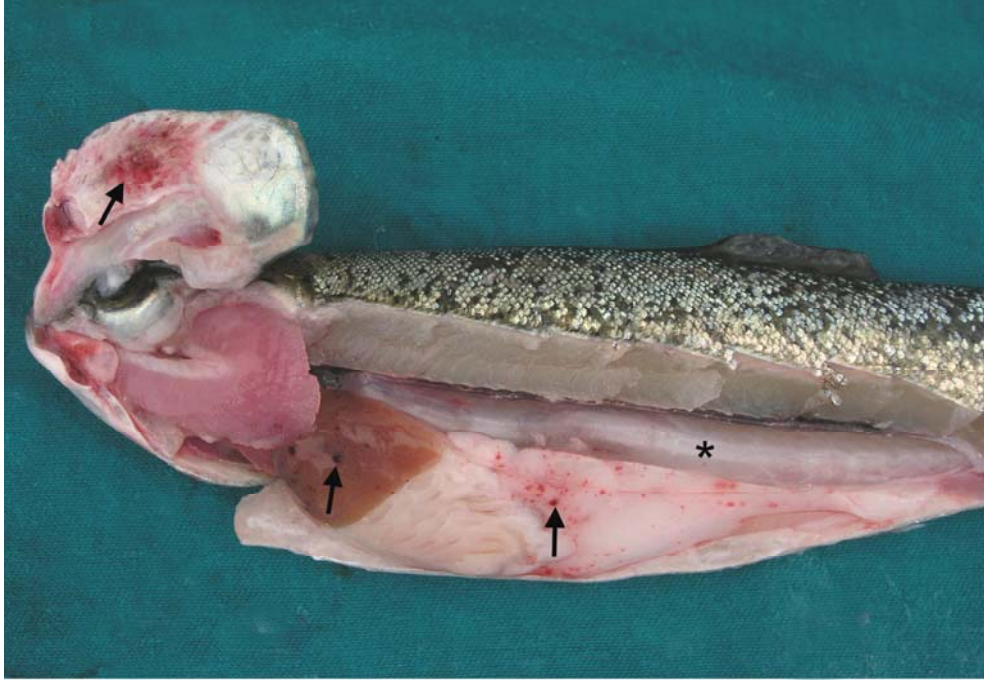
(-) Klinik/makroskopik bulgu görülmedi, (+) klinik/makroskopik bulgu görüldü.



Şekil 18. DİM. Deride kanamalar (oklar), olgu no; 4.



Şekil 19. DİM. Solungaçta peteşiyel kanamalar (ok) ve karaciğerde renk değişikliği, olgu no; 1.



Şekil 20. DİM. Operkulumda, karaciğerde ve yağ dokuda kanama (oklar) ve hava kesesinde matlaşma (*), olgu no; 2.

3.2.3. Mikroskopik Bulgular

İskelet kası lezyonları hiperemi, ödem ve kanamalardan oluşan vasküler değişiklikler ile dejenerasyon ve nekrozlar şeklindeydi. Kas demetlerini çevreleyen endomizyumlarında ayrılmalar belirgindi. Lezyonlu alanlar hiperemik ve kanamalıydı (Şekil 21a). Dejeneratif ve nekrotik değişiklikler inokülasyonun beşinci günü ile 11. günü ölen balıklarda gözlemlendi (Şekil 21b). Bu alanlarda miyositlerin genellikle koyu pembe homojen yapıda oldukları, bazı miyositlerin ise sınırlarının belirli kalarak periferden merkeze doğru boşaldıkları saptandı. Nekrotik değişikliklerin görüldüğü bir olguda damar lümenlerinde bol miktarda bakteri kümeleri bulunmaktaydı. Bu alanlardan Brown-Brenn boyama tekniğine göre yapılan boyamalarda pozitif sonuçlar elde edildi.

Ödem, solungaçlarda en yaygın görülen bulgulardandı (Şekil 22a). Şiddetli olgularda sekonder lamellerin epitellerinde ayrılmalar, ilerlemiş olgularda dökülmeler şeklinde görüldü. Sekonder lamel epitellerinde nekroza uğrayan hücrelerin sitoplazmaları koyu eozinofilik, çekirdekleri piknotik ya da karyorektikti. Solungaç kemeri damarlarında hiperemi, primer ve sekonder lamellerde kanamalar rastlandı. Uygulamanın beşinci gün ile 34. gün arasında ölen ya da ötanazi edilen balıklarda (bir olgu dışında) bir solungaç kesitinde sayısı bir ile dört arası değişen telangiektaziler görüldü (Şekil 22b). Bu olgulardan bazılarında (olgu no; 4, 5, 9) telangiektaziler içerisinde mikrotrombüsler dikkati çekti. Primer lameller boyunca EGH'lerde artış, degranülasyonlar ve buna ilgili primer lamellerde genişlemeler görüldü. Sekunder ve primer lamellerde interlamellar hücre hiperplazilerine bağlı kalınlaşmalar genellikle EGH artışları ile birlikte belirlendi (Şekil 22b).

Kalpte endomizyumlarda ayrılmalar, endoteliyal makrofajlarda aktivasyon ile birlikte az sayıda mononükleer hücre infiltrasyonlarından oluşan epikarditis görüldü.

Karaciğerde saptanan hiperemi ve kanamalar, beşinci gün ile 11. günler arasında ölen balıklarda oldukça belirgindi. Kanamalar genellikle düzensiz dağılımlı fokal alanlar şeklindeydi (Şekil 23). Bazı olgularda bol miktarda bakterinin de bulunduğu multifokal koagülasyon nekrozları saptandı. Brown-Brenn boyama tekniğine göre yapılan boyamada bu bakterilerin Gram-negatif bakteriler olduğu tespit edildi. Hepatositlerde değişen büyüklüklerde intrasitoplazmik keskin kenarlı vakuoller belirlendi (Şekil 24a). Modifiye Sudan Black B boyama tekniğine göre bunların yağ vakuelleri olduğu teyit edildi (Şekil 24b). İki olguda perivasküler, iki olguda (olgu no; 11, 18) da perikanaliküler mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü.

Böbrekte, proksimal tubulus epitellerinde eozinofilik hiyalin damlacıkları görüldü. (Şekil 25). Dalak lezyonları ödem, hiperemi ve nekrozlar şeklindeydi. Üç olguda sinuslar pembe eozinofilik ödem sıvısı ile doluydu. Enfeksiyonun beşinci ve altıncı gününde ölen balıklarda bakteri kümelerinin de bulunduğu nekrotik alanlar saptandı. Bu alanlarda Brown-Brenn boyama tekniğine göre yapılan boyamada pozitif sonuçlar elde edildi. Hava kesesinde serozal damarlar hiperemikti. Seroza ödemliydi. Beşinci ve altıncı günlerde ölen balıklarda serozada kanamalar saptandı.

EGH'larda artış ve degranülasyonlar mide (Şekil 26) ve daha az olarak da pilorik keselerde görüldü. Birer olguda mide, pilorik kese ve bağırsak epitellerinde nekrozlara rastlandı. KİM' deki balıklarda mikroskopik bulguya rastlanmadı.

3.2.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

DİM'de bakteriyel antijene inokülasyonun beşinci ve altıncı gününde ölen balıklarda görüldü. İskelet kaslarında, immunopozitif reaksiyonlara inokülasyonun beşinci gününde ölen bir olguda rastlandı. Solungaçlarda beş olguda immunopozitif reaksiyonlar saptandı (Şekil 27a,b). Kalp (Şekil 28), karaciğer (Şekil 29a) ve yağ dokuda (Şekil 29b) pozitif reaksiyonlar inokülasyonun beşinci ve altıncı günlerinde ölen üçer olguda belirlendi. Diğer organ ve dokulardan, dalakta iki olguda, pilorik kese ve bağırsaklarda ise birer olguda pozitif reaksiyonlara rastlandı. Onbirinci günden sonra ölen ya da ötanazi edilen balıklarda pozitif boyanmalara ilişkin herhangi bir immunohistokimyasal bulguya rastlanmadı. KİM'deki balıklarda ise immunopozitif boyanmalar görülmedi.

Çizelge 4. Grup II (Deneme İmmersiyon Grup; DİM)'de mikroskopik ve immunohistokimyasal bulguların dağılımı

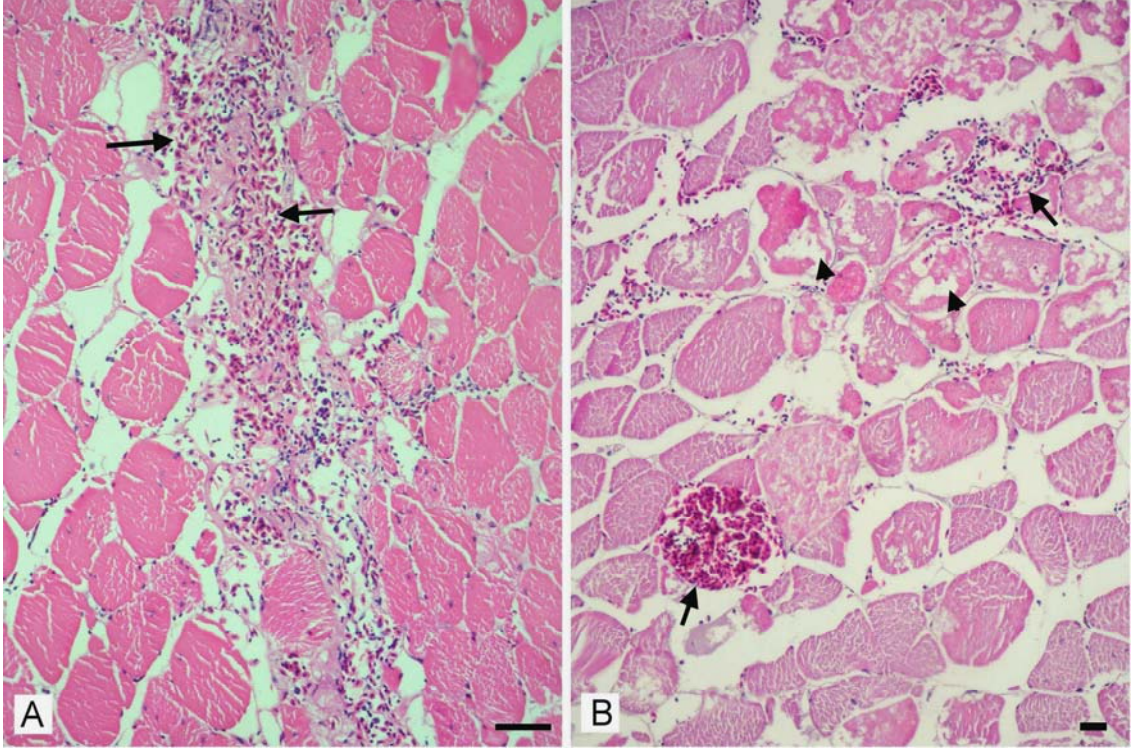
Olgu No	İskelet Kası							Solungaç								Kalp				Karaciğer							Böbrek										
	Hiperemi	Ödem	Kanama	Dejenerasyon	Nekroz	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Ödem	Hiperemi	Kanama	Telangiektazi	Epitellerde ayrılma	Epitel hücrelerinde nekroz	EGH'larda artış ve	Hiperplazi	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Endomizyumda ayrılma	Endotelial makrofaj aktivasyonu	Epikardit	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Hiperemi	Kanama	Yağlanma	Dejenerasyon	Nekroz	Hücre infiltrasyonu	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Ödem	Hiperemi	Kanama	Tubulus dejenerasyonu	Tubuluslarda hiyalin damlaları	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular
1	2	2	2	3	3	2	+	1	3	2	3	2	1	3	2	0	+	0	0	0	0	+	2	3	2	2	3	0	3	+	0	0	0	2	3	0	-
2	0	0	0	0	0	0	-	3	0	0	2	3	2	1	0	0	+	2	2	1	0	+	2	3	0	2	3	0	3	+	0	1	2	0	0	0	-
3	0	0	0	0	0	0	-	2	3	1	0	3	2	1	2	0	+	0	0	0	0	-	1	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	2	2	0	-
4	2	2	3	2	2	0	-	3	3	1	2	3	2	2	2	0	+	1	1	2	0	+	1	2	0	2	2	0	2	+	0	0	0	2	2	0	-
5	2	2	2	2	2	0	-	2	2	3	2	3	2	2	2	0	+	1	1	1	0	-	1	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	2	2	0	-
6	1	1	2	2	0	0	-	1	2	3	2	1	0	2	1	0	-	0	2	0	0	-	2	3	3	2	0	1	0	-	0	0	0	2	3	0	-
7	0	0	0	0	0	0	-	3	0	0	2	2	0	3	2	0	-	0	0	0	0	-	1	0	3	2	0	0	0	-	0	0	0	1	1	0	-
8	0	0	0	0	0	0	-	1	0	0	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	0	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-
9	0	0	0	0	0	0	-	2	0	0	3	1	0	2	3	0	-	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	1	1	0	-	
10	0	0	0	0	0	0	-	2	0	0	1	2	1	1	1	0	-	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	1	0	-	0	0	1	0	0	0	-
11	1	1	1	0	0	0	-	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	1	0	0	0	2	1	0	-	0	1	2	1	1	0	-
12	0	0	0	0	0	0	-	2	1	0	1	1	2	0	1	0	-	0	0	0	0	-	0	0	2	0	0	0	-	0	0	0	2	2	0	-	
13	0	0	0	0	0	0	-	2	0	0	1	2	0	1	0	0	-	0	0	0	0	-	0	0	3	0	0	0	-	0	0	0	2	3	0	-	
14	0	0	0	0	0	0	-	1	0	0	2	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-	0	0	2	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-
15	0	0	0	0	0	0	-	3	0	0	0	2	0	2	1	0	-	0	0	0	0	-	0	0	3	0	0	0	-	0	0	0	2	2	0	-	
16	0	0	0	0	0	0	-	1	0	0	0	1	0	0	1	0	-	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	1	1	0	-	
17	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	-	0	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	
18	0	0	0	0	0	0	-	2	0	0	0	1	0	0	0	-	-	0	0	0	0	-	0	0	1	0	0	1	0	-	0	0	0	0	0	0	-
19	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	-	0	0	3	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-
20	0	0	0	0	0	0	-	3	0	0	0	1	0	0	0	-	-	0	0	0	0	-	0	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-

(0) Bulgu yok, (1) hafif, (2) orta, (3) şiddetli, (-) negatif, (+) pozitif

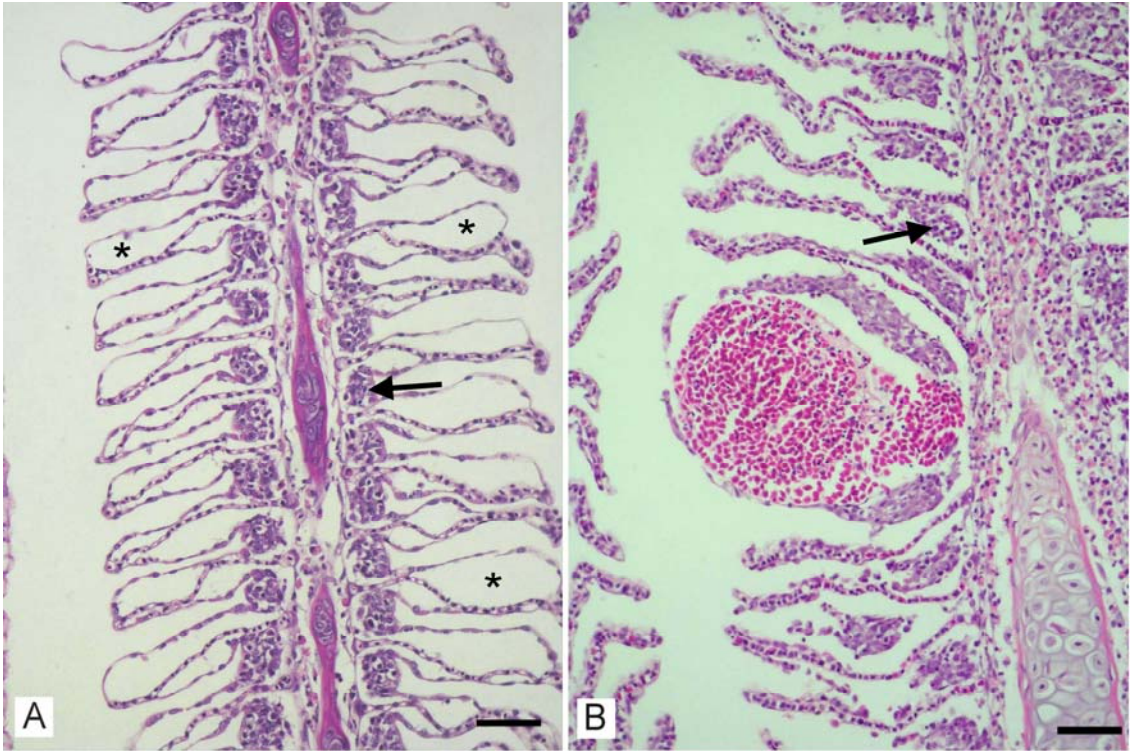
Çizelge 4. Devam. Grup II (Deneme İmmersiyon Grup; DİM)' de mikroskopik ve immunohistokimyasal bulguların dağılımı

Olgu No	Dalak				Hava kesesi					Mide					Pilorik kese					Yağ doku				Bağırsak							
	Ödem	Nekroz	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Ödem	Hiperemi	Kanama	Hücre infiltrasyonu	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Epitellerde dökülme	Epitellerde nekroz	Bezlerde nekroz	EGH'larda artış ve degranülasyon	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Kanama	Epitellerde dökülme	Epitellerde nekroz	EGH'larda artış ve degranülasyon	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Hiperemi	Kanama	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular	Kanama	Epitellerde dökülme	Epitel nekrozu	Bakteri	İmmunohistokimyasal bulgular
1	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	3	0	-	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	-	2	2	0	+
2	2	2	2	+	3	0	0	0	0	-	0	0	0	2	0	-	0	0	0	0	0	-	1	2	0	-	-	0	0	0	-
3	2	0	0	-	2	3	3	0	0	-	0	0	0	3	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	+	-	0	0	0	-
4	2	2	2	+	2	3	3	2	0	+	0	0	0	0	0	-	0	0	0	2	0	-	0	0	0	+	-	2	0	0	-
5	0	0	0	-	2	3	3	2	0	-	1	2	0	2	0	-	0	1	2	2	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
6	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	2	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
7	0	0	0	-	3	3	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
8	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	2	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
9	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	2	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
10	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
11	0	0	0	-	3	0	0	0	0	-	0	0	0	1	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
12	0	0	0	-	3	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
13	0	0	0	-	3	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
14	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
15	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	2	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
16	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	2	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
17	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
18	0	0	0	-	0	0	2	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	2	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
19	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-
20	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	-	0	0	0	-

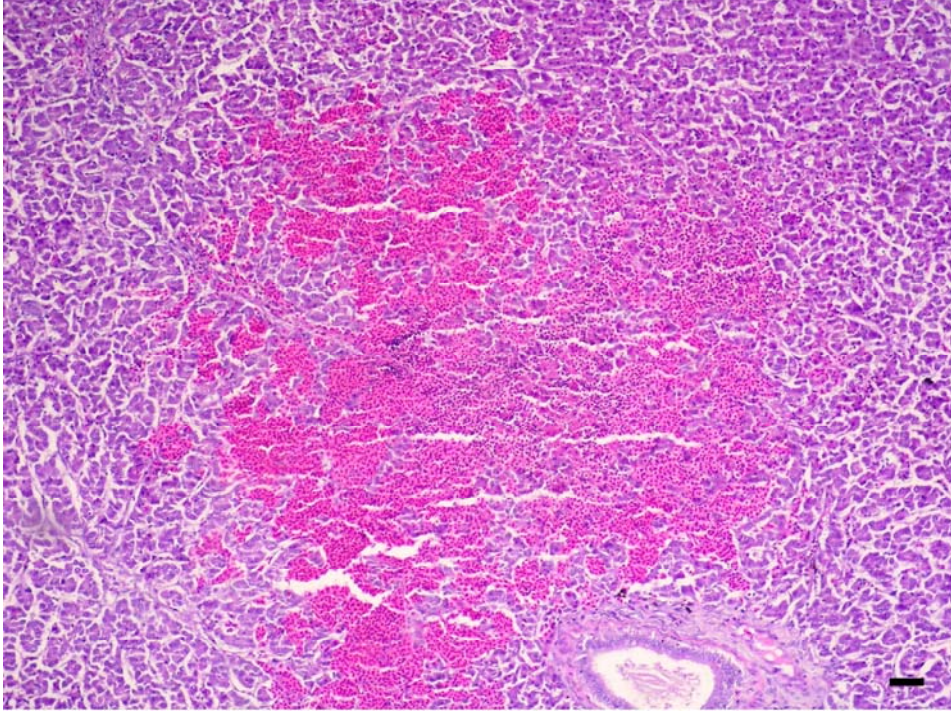
(0) Bulgu yok, (1) hafif, (2) orta, (3) şiddetli, (-) negatif, (+) pozitif



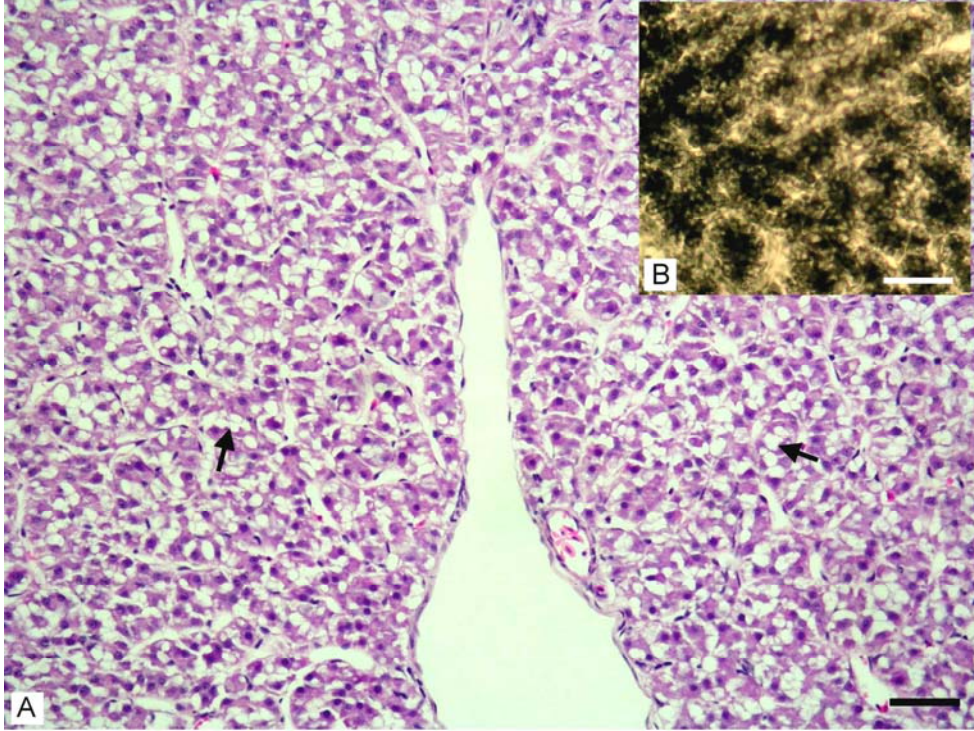
Şekil 21. DİM. İskelet Kası. A. İntersitisyumda hiperemi ve kanama (oklar), olgu no; 5, HE., Bar: 30 µm.
B. Erime nekrozları (okbaşları) ve intersitisyumda kanamalar (oklar), olgu no; 1, HE., Bar: 50 µm.



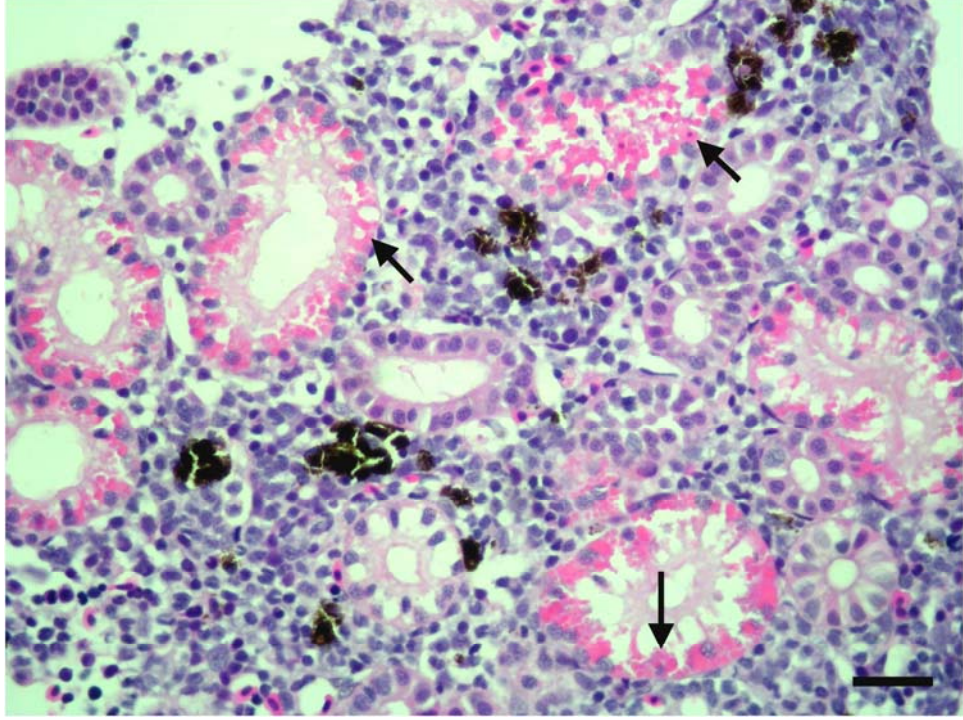
Şekil 22. DİM. Solungaç. A. Sekunder lamellerde ödem (*) ve tabanında hiperplazi (ok), olgu no; 20, HE., Bar: 50 µm.
B. Sekunder lamelde telangiektazi ve tabanında hiperplazi (ok), olgu no; 7, HE., Bar: 50 µm.



Şekil 23. DİM. Karaciğerde kanama, olgu no; 1, HE., Bar: 50 µm.

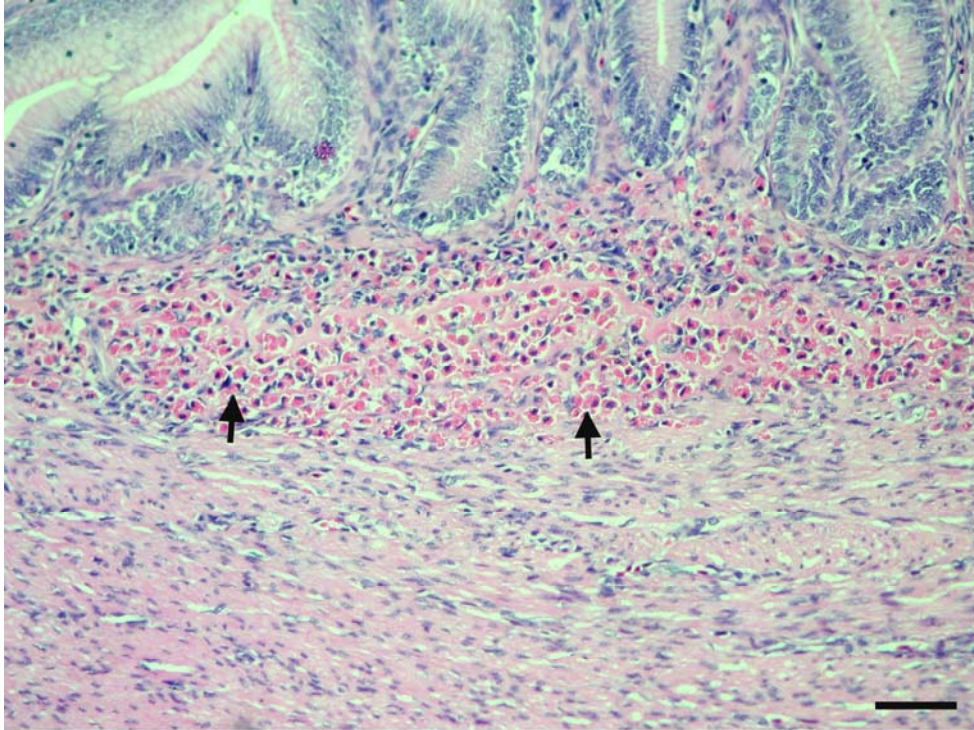


Şekil 24. DİM. Karaciğerde diffuz yağlanma (oklar), olgu no; 13, A. HE., Bar: 30 µm, B. Modifiye McManus's Sudan Black B, Bar: 30 µm.

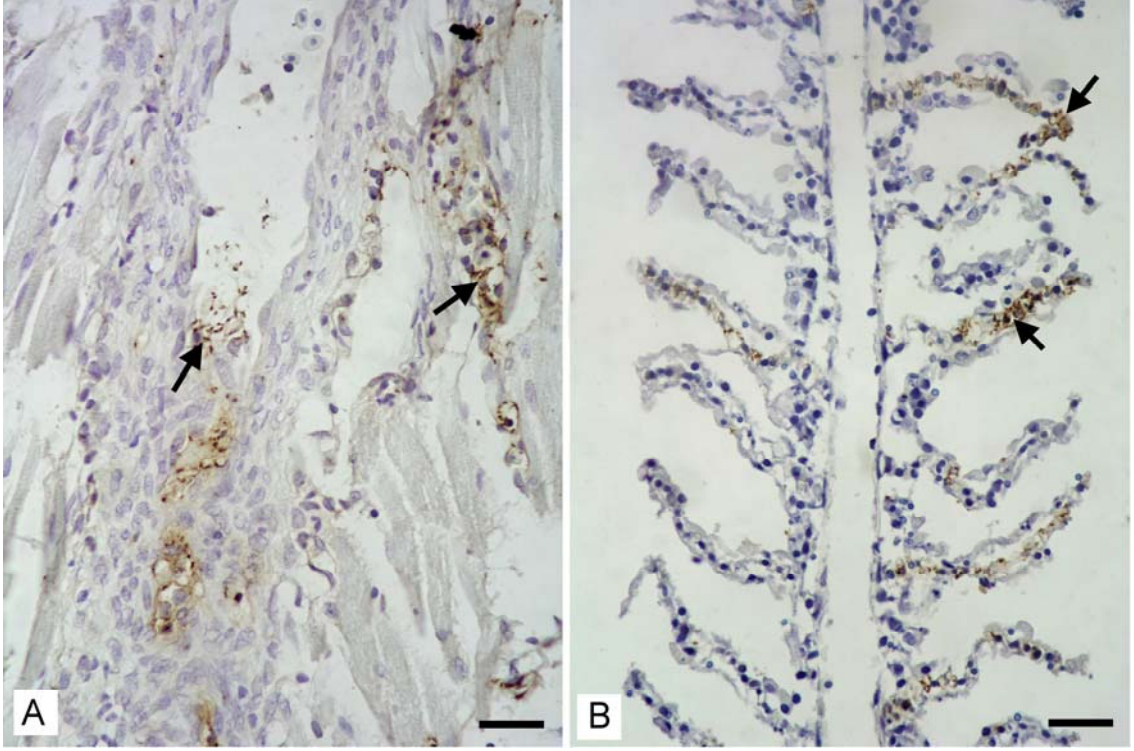


Şekil 25.

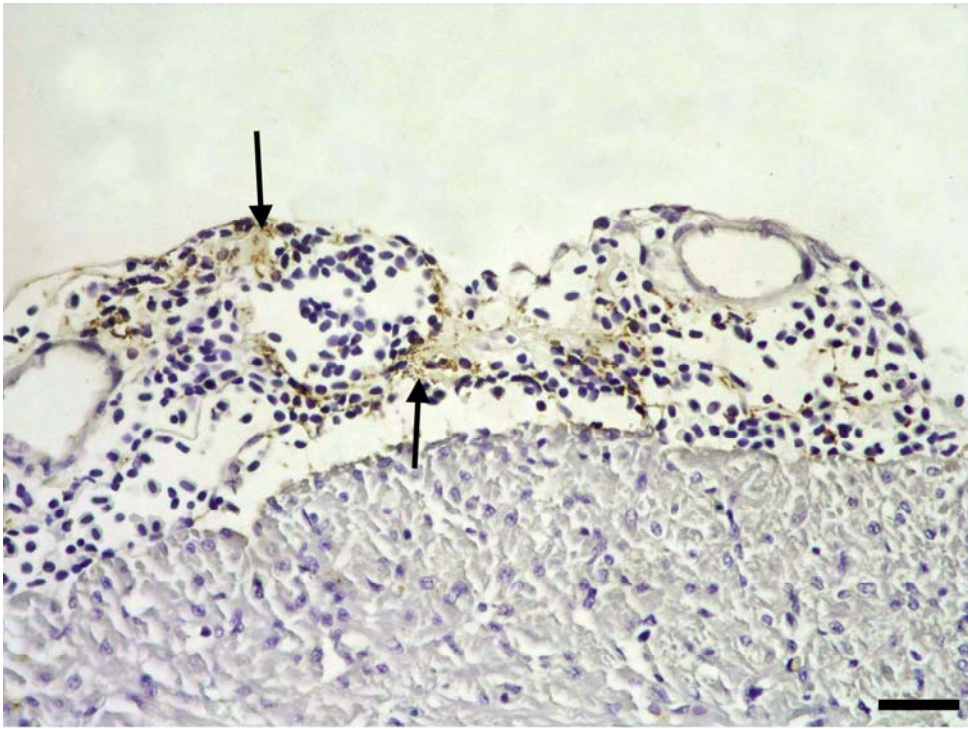
DİM. Böbrekte proksimal tubulus epitellerinde eozinofilik hiyalin damlaları (oklar), olgu no; 13, HE., Bar: 30 μ m.



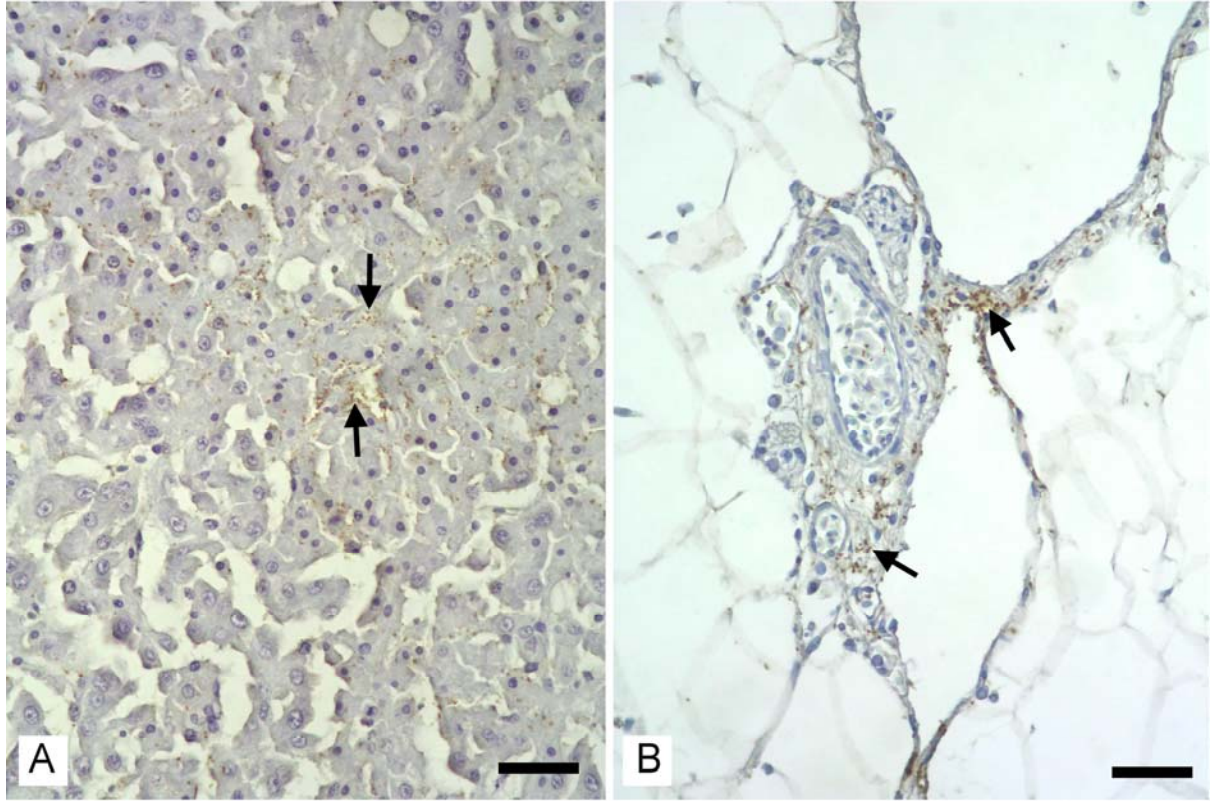
Şekil 26. DİM. Midede submukozada eozinofilik granüler hücrelerde artış (oklar), olgu no; 3, HE., Bar: 30 μ m.



Şekil 27. DİM. Solungaç. A. Damar lümeninde immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 2, İP., Bar: 30 µm.
B. Sekunder lamel kapıllarında, immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 5, İP., Bar: 30 µm.



Şekil 28. DİP. Kalpte epikartda immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 4, İP., Bar: 30 µm.



Şekil 29. DİM. A. Karaciğerde sinuzoidlerde immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 4, İP., Bar: 30 µm.
B. Yağ dokuda perivasküler immunopozitif boyanmalar (oklar), olgu no; 1, İP., Bar: 30 µm.

3.3. Mikrobiyolojik Bulgular

Mikrobiyoloji Anabilim Dalına gönderilen ölen DİP ve DİM balık örneklerinden *Vibrio anguillarum* O1 suşunun reizolasyunu ve identifikasyonu teyit edildi. Ötanazi edilen DİP ve DİM balık örneklerinden ise izolasyon yapılamadı.

KİP ve KİM balık örneklerinde yapılan mikrobiyolojik incelemelerde de herhangi bir patojen bakteriye rastlanmadı.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, tuzlu ve tatlı su balıklarının en önemli vibriosis etkenlerinden biri olan *Vibrio anguillarum* O1 suşunun, gökkuşağı alabalıklarına intraperitoneal ve immersiyon inokülasyonları ile hastalığın makroskobik ve mikroskobik bulguları karşılaştırmalı olarak incelenerek, immunohistokimyasal yöntemle de etkenin doku ve organlardaki dağılımı değerlendirildi. Hastalık, Türkiye’de hem tuzlu su balıklarında (Çağırğan 1993, Akan ve ark 1996, Akaylı 2001, Tanrıkul ve ark 2004, Demircan ve Candan 2006, Korun ve Timur 2008) hem de gökkuşağı alabalıklarında (Timur ve Korun 2004, Tanrıkul 2007) tanımlanmıştır. Ege Bölgesi’nde de alabalık yetiştiriciliğinin yaygın olması nedeniyle çalışmada gökkuşağı alabalığının kullanılması tercih edildi.

Tuzlu ve tatlı su balıklarında *Vibrio anguillarum* tarafından oluşturulan doğal vibriosis olgularında ölüm oranları genellikle % 40-70 arasında tanımlanmıştır (Egidius ve Andersen 1978, Giorgetti ve Ceschia 1982, Kanno ve ark 1989, Tanrıkul 2007). Deneysel çalışmalarda ise bu oranın % 100’lere kadar ulaştığı bildirilmiş (Johnson ve Amend 1983, Ransom ve ark 1984, Kanno ve ark 1990, Spanggaard ve ark 2000, Roed ve ark 2002), çalışmamızda ise DİP’te % 55, DİM’de ise % 40 olarak gerçekleşmiştir. Bu ölüm oranları doğal olgulardaki oranlara benzerlik göstermesine karşın, deneysel çalışmalardaki ölüm oranlarına göre daha düşük olduğu görülmüştür. Deneysel çalışmalarda ölümlerin birinci ve 15. günler arasında görüldüğü bildirilmiş (Lönström ve ark 2001, Çağırğan 2004, Tanrıkul 2007), çalışmada ise ölümler DİP’te üçüncü ve dokuzuncu günler arasında, DİM’de ise beşinci ve yedinci günler arasında görülmüştür. Bu çalışmadaki ölüm oranları ve zamanları bildirilen diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında, ölüm oranları ve zamanları arasında kesin bir sınır belirlemenin zor olduğunu göstermektedir. Çalışmalar arasında görülen bu farklılıkların, konakçının türü ve direnci, stres faktörleri, etkenin virülensi ve dozu ile birlikte bakterinin veriliş yolu ile ilgili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmada her iki grubun balıklarında; durgunluk, iştahsızlık, düzensiz yüzmeye hareketleri, pullarda dökülmeler diğer araştırmacıların klinik bulguları ile benzerlik göstermiş (McCarthy ve ark 1974, Giorgetti ve Ceschia 1982, Actis ve ark 1999, Timur ve Korun 2004, Korun ve Timur 2008), ancak asites (Hacking ve Budd 1971, Haastein ve Holt 1972, Horne ve ark 1977, Lewis 1985), anüs prolapsusu (Giorgetti ve Ceschia 1982,

Pedersen ve ark 1997), karın boşluğunda adhezyonlar (Roberts 2001) bu çalışmada görülmemiştir. Makroskobik bulguların dağılımı ve görüldüğü balık sayıları açısından deneme grupları arasında önemli farklılıklar saptandı. DİM'e göre DİP'te daha fazla balıkta ve daha çok dokuda makroskobik bulgu belirlendi. DİP'te gözde ekzoftalmus ve perioküler kanama görülmesine karşın, DİM'de sadece iriste opasite görüldü. DİP'te deride beş balıkta görülen renk değişikliği DİM'de hiç rastlanmadı. DİP'te karaciğerde 10 olguda görülen kanamalara DİM'de sadece bir olguda rastlandı.

Kimi araştırmacılar (Lewis 1985, Olsson ve ark 1996) hastalığın oluşumunda anüsün primer giriş yolu olduğunu bildirmelerine karşın, kimileri ise deri (Kanno ve ark 1989, Spanggaard ve ark 2000), anüs (Kanno ve ark 1989, 1990) ve solungaçların (Laurencin ve Germon 1987) önemli olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada etkenin immersiyo n yolla verildiği DİM'de lezyonlar en yaygın olarak solungaçlarda gözlenmiştir. İmmunoperoksidaz boyamada da pozitif reaksiyonların daha çok solungaçlarda görülmesi, etkenlerin doğal enfeksiyonlarda Laurencin ve Germon (1987) ile uyumlu olarak solungaçların primer giriş yolu olabileceğini düşündürmüştür.

Deneysel ve doğal vibriozis çalışmalarında kaslarda şekillenen vasküler ve nekrotik lezyonlar hastalığın en önemli bulguları olarak tanımlanmış (McCarthy ve ark 1974, Hastein ve Smith 1977, Lewis 1985, Egidius 1987, Miyazaki 1987, Kanno ve ark 1989, Pedersen ve ark 1997) ve oluşumundan, etkenin ekstraselüler toksinleri sorumlu tutulmuştur (Kodama ve ark 1985, Krovacek ve ark 1987, Actis ve ark 1999). Çalışmada iskelet kası lezyonları, DİP'te 11 balıkta, DİM'de ise üç balıkta belirlenmiş, şekillenen kas lezyonlarının tanımlanan bulgular ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Deneme gruplarında karaciğerlerde belirlenen lezyonlar, literatürlerle uyumlu olarak, (Egidius ve Andersen 1978, Giorgetti ve Ceschia 1982, Ransom ve ark 1984, Lewis 1985) yangısal reaksiyonların görülmediği kanama ve nekrozlar şeklindeydi. Ayrıca karaciğer lezyonları DİP'te DİM'e göre daha çok sayıda balıkta görüldü. Karaciğerde olduğu gibi dalak lezyonları da DİP grubunda daha fazla balıkta saptandı. Literatürlerde (McCarthy ve ark 1974, Lewis 1985, Timur ve Korun 2004) tanımlanan bu bulgular, çalışmada vasküler ve nekrotik değişiklikler şeklinde görüldü. İlk altı gün içerisinde ölen balıkların dalaklarında gözlenen şiddetli nekrozlar akut septisemiye ilişkin ölüm nedenlerinden birisi olarak değerlendirildi. İntraperitoneal uygulama grubunda karaciğer ve dalak lezyonlarının daha

çok balıkta şekillenmesi; bakteri patojenitesinin immersiyon uygulamaya göre yüksek olduğunu düşündürmüştür.

Vibriozis olgularında böbrekte kanama ve nekrotik değişimler birçok araştırmacı tarafından bildirilmesine karşın (Giorgetti ve Ceschia 1982, Ransom ve ark 1984, Korun 2004), bu çalışmada böbreğin hem intersitisyumunda hem de parankim dokusunda nekrotik değişimlere rastlanmadı. Özellikle proksimal tubuluslarda saptanan dejenerasyon ve hiyalin damlacıkları Miyazaki (1987) 'nin bildirdiği bulgular ile uyumluydu.

Deneme gruplarında balık sayısı açısından en çok etkilenen organlardan birisi solungaçlardı. Lezyonlarla bakteriler arasında ilişki bazı olgularda bakteriyel antijenin varlığı ile desteklendi. Sekunder lamellerde ödem, epitellerde dökülme literatürlerde (Ransom ve ark 1984, Miyazaki 1987, Timur ve Korun 2004) tanımlanan mikroskobik bulgular ile paralellik göstermiştir. Ancak birçok olguda saptanılan telangiektazilere ilişkin bir kayda rastlanamamıştır. Özellikle immersiyon grubunda 13 balıkta tespit edilen telangiektazilerde, bakteriyel antijenin varlığı, etken ile bu lezyon arasında bir ilişki olabileceğini desteklemektedir. Çalışmada sekunder lamel epitel hücrelerinde görülen nekrozlar ve bu nekrozların oluşumu ile ilgili açıklayıcı bir literatür bilgiye ulaşılamamıştır. Ancak gözlenen bu değişikliğe *Vibrio anguillarum*' un sahip olduğu bildirilen (Kodama ve ark 1985, Krovacek ve ark 1987, Actis ve ark 1999) ekstraselüler ürünlerin sorumlu olabileceğine yorumlandı.

Deneme gruplarında toplam sekiz olguda belirlenen epikarditis, endotelial makrofajlarda aktivasyon ve/veya endomizyumda ödemle birlikte ayrılma denemenin ilk altı günlük akut döneminde saptandı. Bu lezyonlar ile bakteri kümeleri arasındaki ilişki immunperoksidaz boyama ile teyit edildi. *Vibrio anguillarum*' un epikarditis oluşturduğu ise sadece Hacking ve Budd (1971) tarafından bildirilmiştir.

Sunulan çalışmada, bağırsaklarda ve daha az olarak da pilorik keselerde saptanan mikroskobik bulgular literatürlerde bildirilen (Egidius ve Andersen 1978, Egidius 1987, Olsson ve ark 1996, Ransom ve ark 1984, Spanggaard ve ark 2000), bulgular ile benzerlik göstermesine karşın, bu lezyonların az sayıda balıkta şekillendiği ve hafif seyirli olduğu görülmüştür. Çalışmalar arasında görülen bu farklılıkların ise, konakçının türü ve direnci ile birlikte etkenin virülensi ile ilgili olabileceği şeklinde yorumlandı.

Balıklarda memelilerdeki mast hücrelerine benzer özellikte oldukları bildirilen EGH'lar ile yapılan çalışmalarda (Powell ve ark 1993, Ellis 1985, Sveinbjornsson ve ark 1996; Flano ve ark 1997, Tomomasa ve Iida 1999, Aydogan 2005); bazı balık patojenlerinin veya patojen ekstraktlarının verilmesinden sonra ya da çeşitli paraziter enfeksiyonlarda bu hücrelerde artışlar ve degranülasyonlar bildirilmiştir. Çalışmada her iki deneme grubunda solungaç, mide ve daha az olarak da pilorik keselerde EGH'larda belirgin artışlar ve degranülasyonlar saptanmıştır. Ayrıca çalışmada herhangi bir paraziter etkene rastlanılmamış olması da EGH'larda görülen bu değişikliklerin hastalıkla ilgili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Yapılan çalışmada gerek Brown-Brenn tekniğine göre yapılan bakteri boyamalarında gerekse immunoperoksidaz incelemelerde etkenin genellikle damar lümenlerinde ya da damarlar etrafında yerleşim gösterdiği görüldü. Her iki deneme grubunda da etkenin benzer yerleşim göstermesi, hastalığın yayılmasında hematojen yolun etkili olabileceğini düşündürmüştür.

İmmunohistokimyasal yöntemler, birçok hayvan türünde olduğu gibi balık hastalıklarında da kesin tanıyı olanak sağlamaları nedeniyle enfeksiyonların tanısında önemli bir yere sahiptir (Janson ve ark 1991, Evensen ve Olesen 1997, Ekman ve Norrgren 2003, Foyle ve ark 2003, Kueh ve ark 2004). *Vibrio anguillarum* tarafından oluşturulan vibriozisde ise immunoperoksidaz tekniğinin kullanılması ile ilgili az sayıda literatür bilgiye ulaşılabilmıştır (Berg ve ark 2001, Irie ve ark 2004, Afonso ve ark 2005). Poliklonal *Vibrio anguillarum* O1 primer serumlarının kullanıldığı bu deneysel çalışmalarda bakteriyel antijen, indirekt immunoperoksidaz yöntemi ile aşılama sonrası şekillenen granulom içerisinde, bağırsaklarda ve avidin-biotin peroksidaz yöntemi ile balık larvalarının beslenmesinde kullanılan *Artemia franciscana*'larda saptanmıştır (Berg ve ark 2001, Irie ve ark 2004, Afonso ve ark 2005). Sunulan çalışmada bakteriyel antijen DİP'te dokuz olguda (% 45), en yoğun olarak iskelet kaslarında daha az oranda karaciğer ve dalakta saptandı. DİM'de beş olguda (% 25) saptanan pozitif reaksiyonlar en yoğun olarak solungaçlarda görüldü. Çalışmada DİP'te immunopozitifliğin DİM'e göre daha çok balıkta saptanması intraperitoneal yolun deneysel çalışmalarda daha etkili olabileceğini düşündürdü.

Çalışmada, immunoperoksidaz yöntemle, bakteriyel antijenler her iki deneme grubundaki enfekte hayvanların formalinde tespit edilmiş ve parafinde bloklanmış kesitlerinde başarıyla ortaya koymuştur. Ancak, bazı olgularda hastalıkla ilişkili olduğu düşünülen mikroskobik lezyonlarda negatif reaksiyonlar da dikkati çekmiştir. Böyle negatif sonuçların alınması, bakteriyel antijenin parçalanması ya da organizma tarafından salgılanan antikorların antijenik determinantlara bağlanması ile ilişkili olabileceğine yorumlanmıştır. Bakteriyel antijenin saptanamadığı bu olgular, vibriozisin tanısında diğer immun-enzim tekniklerinin yanı sıra monoklonal antikorlarla yeni denemelere ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Ayrıca, formalin tespitli dokularda formalin-antijen bağlarından ileri gelen dezavantajlar da göz önünde bulundurulmuş ve bunu gidermek amacıyla da uygulanacak immunohistokimyasal yöntemlerde farklı antijen retrieval solüsyonlarının kullanılmasının uygun olacağı kanısına varılmıştır. Alternatif olarak dondurma mikrotomu ve parafin kesitlerde immun-enzim yöntemlerinin karşılaştırmalı olarak da incelenebileceği sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ

Sunulan çalışmada, deneysel olarak *Vibrio anguillarum* O1 (ATTC 43305) suşu gökkuşuğu alabalıklarında intraperitoneal yol ve immerisyon yöntemleri ile oluşturulan vibriozisin makroskobik ve mikroskobik bulguları karşılaştırmalı olarak incelenmiş, immunohistokimyasal yöntemle de bakteriyel antijenin doku ve organlardaki dağılımı değerlendirilmiştir. Çalışmada intarperitoneal uygulama sonrası sistemik bir enfeksiyon tablosu oluşurken, immersiyon uygulama sonrası lezyonların az sayıda balıkta şekillendiği ve daha hafif seyirli olduğu görülmüştür. İntraperitoneal uygulamada, lezyonlar çoğunlukla iskelet kası, karaciğer dalak ve hava kesesinde, immersiyon uygulamada ise yoğun olarak solungaçlarda gözlenmiştir. İmmunohistokimyasal yöntemlerden indirekt immunoperoksidaz metodunun uygulandığı çalışmada, her iki deneme grubunda pozitif reaksiyonlar saptanmıştır. Böylece immunoperoksidaz yönteminin *Vibrio anguillarum* tarafından oluşturulan vibriozisin tanısında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

***Vibrio anguillarum* ile Enfekte Edilen Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Morfolojik ve İmmunohistokimyasal incelemeler**

Bu çalışmada, *Vibrio anguillarum* O1 (ATTC 43305) suşu ile gökkuşığı alabalıklarında deneysel vibriosis oluşturuldu. Bu amaçla, 56 adet gökkuşığı alabalığı (80 ± 10 g ağırlığında ve 10-12 cm büyüklüğünde) iki deneme grubu (Deneme İntraperitoneal Grup (DİP), n; 20 – Deneme İmmersiyon Grup (DİM), n: 20) ve iki kontrol grubu (İntraperitoneal Kontrol (KİP), n; 8 - İmmersiyon Kontrol (KİM), n; 8) olmak üzere dört gruba ayrıldı. DİP'e intraperitoneal olarak 5,5 x 10⁸cfu/ml bakteri olacak şekilde 0,1 ml bakteri inokülatı verildi. İmmersiyon uygulamada, 30 litre suya 5,5 x 10⁸cfu/ml bakteri içeren inokülatı 50 ml katılarak hazırlanan solüsyonda balıklar 30 dakika bekletildi.

İlk ölümler DİP'te inokülasyonun üçüncü gününde, DİM'de ise beşinci gününde başladı. Ölen ya da ötanazi edilen balıkların nekropsilerini takiben, tüm organlar % 10'luk tamponlu formalinde tespit edildi. Elde edilen parafin kesitlerinin tamamı hematoksil-eozin ve indirekt immunoperoksidaz tekniği ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Lezyonların dağılımında gruplar arasında farklılıklar görüldü. DİP'te düzensiz yüzmeler, yüzgeçlerde ve anüs etrafında hiperemi, kas, karaciğer ve solungaçta kanama ile dalakta büyüme görüldü. Mikroskopik incelemede, iskelet kası, karaciğer ve dalakta yangısal reaksiyonların görülmediği kanama ve nekrozlar, solungaçlarda, ödem, telangiektazi, epitel hücrelerinde nekroz ve eozinofilik granüler hücrelerde (EGH) artışlar, kalpte endotelial makrofajlarda aktivasyon ve epikarditis, böbrekte tubulus epitellerinde eozinofilik hiyalin damlaları ve midede EGH'larda artış gözlemlendi. İmmunohistokimyasal incelemede bakteriyel antijen, kas, karaciğer, dalak, solungaç, hava kesesi ve dalakta saptandı. DİM'de makroskopik olarak, solungaçlarda solgunluk ve kanama, karaciğerde renk değişikliği ve hava kesesinde matlaşma belirlendi. Mikroskopik incelemede, solungaçlarda, ödem, epitellerde dökülme, telangiektazi ve EGH'larda artış, karaciğerde kanama, yağlanma ve nekroz, hava kesesi serozasında ödem ve kanamalar gözlemlendi. İmmunohistokimyasal incelemede, bakteriyel antijen yoğun olarak solungaçlarda görüldü. Kalp, karaciğer, dalak, pilorik kese ve bağırsaklarda ise az sayıda balıkta pozitif reaksiyonlar saptandı.

Sonuç olarak, deneysel vibriosis'de görülen patolojik bulgular karşılaştırmalı olarak incelendi ve immunohistokimyasal yöntemle de etkenin doku ve organlardaki dağılımı değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşığı alabalığı, immunohistokimya, patolojik bulgular
Vibrio anguillarum

SUMMARY

Morphologic and Immunohistochemical Investigations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) experimentally Infected with *Vibrio anguillarum*

In this study, experimental vibriosis caused by *Vibrio anguillarum* O1 (ATTC 43305) was constituted in rainbow trout using intraperitoneal route and immersion method. For this purpose, 56 rainbow trout (weight 80 ± 10 g and 10-12 cm in size) were divided into four groups [two experimental (Intraperitoneal Group (IP), n: 20 – Immersiyon Group (IM), n: 20) and two control (Intraperitoneal control (CIP), n: 8 - Immersiyon control (CIM), n: 8)]. *Vibrio anguillarum* at a concentration of 5.5×10^8 cfu/ml (0,1 ml per fish) was injected intraperitoneally to the IP Group. The IM group were immersed into 30 l water inoculated with 50 ml of bacterial inoculum (5.5×10^5 cfu/ml) for thirty minutes.

The first death was observed on the 3th day of application in the IP, and on the 5th day of the IM group. Dead or killed fish were necropsied, tissue samples collected, fixed in 10 % neutral-buffer formalin solution, embedded in paraffin wax, sectioned at 5 μ m and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and immunoperoxidase technique.

The lesions were different in location depending on the inoculation routes. Irregular swimming, hyperemia in the fins and around the anus, hemorrhage in the muscle, liver and gill and enlargement in the spleen were observed macroscopically in the IP group. In microscopic examination, the muscle, liver and spleen showed hemorrhage and necrosis with no inflammatory response. In the gills, there were odema, telangiectasi, necrosis of epithelium and an increas in the number of eosinophilic granuler cells (EGC). Activation of the ventricular endothelial macrophages and epicarditis in the heart, eosinophilic hyalin droplets in the tubular epihelium of the kidney and an increas in the number of EGC in the stomach were determined. With immunoperoxidase staining, bacterial antigen was seen in the muscle, liver, spleen, gills and swim bladder. In the IM group, macroscopically, paleness and haemorrhages in the gills and discoloration in the liver were determined. The swim bladder were also opaque. At the microscopic examination, there were odema, desquamation of the epithelial cells, telangioectasie and an increas in the number of the EGC. In the liver, hemorrhage, fatty changes and necrosis were observed. Odema and hemarrhages were generally found in serosa of the swim bladder. Immunohistochemically, positive reactions were particularly observed in the gills and to a lesser extent in the heart, liver, spleen, pyloric seceae and intestines.

In conclusion, pathological findings seen in the experimental vibriosis were comparatively examined and distrubution of the bacterium in tissues were evaluated immunohistochemically.

Key Words: Immunohistochemistry, *Vibrio anguillarum*, pathological findings, rainbow trout

KAYNAKLAR

1. **Actis LA, Tolmasky ME, Farrell DH, Crosa JH** (1988) *Genetic and molecular characteristics of essential components of the Vibrio anguillarum plasmid-mediated iron-transport system*, Journal of Biological Chemistry, 263: 2853-2860.
2. **Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH** (1999) *Vibriosis*, Whoo PTK, Bruno DW (eds), *Fish Diseases and Disorders*, CABI Publishing, pp: 523-558, London.
3. **Afonso A, Gomes S, Silva JD, Marques F, Henrique M** (2005) *Side effects in sea bass (Dicentrarchus labrax L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis*, Fish & Shellfish Immunology, 19: 1-16.
4. **Akan M, Yıldız H, İzgür M, Atay D** (1996) *Levreklerde Vibrio anguillarum'a bağlı vibriosis olgusu*, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2: 40-43.
5. **Akaylı T** (2001) *Kültür çipura balıklarında (Sparus aurata, L. 1758) vibriozisin ELISA ve bakteriyel yöntemlerle teşhisi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
6. **Arda M, Seçer S, Sarıeyyüboğlu M** (2002) *Balık Hastalıkları*, Medisan Yayın Serisi, Ankara.
7. **Attridge SR, Rowley D** (1983) *The role of the flagellum in the adherence of Vibrio cholera*, The Journal of infectious Diseases, 147: 864-872.
8. **Austin B** (1999). *The effect of pollution on fish health*, Journal Applied Microbiology, 85: 234-242.
9. **Avcı H, Birincioğlu SS** (2005) *Pathological findings in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) experimentally infected with Yersinia ruckeri*, Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences, 29: 1321-1328.
10. **Aydoğan A** (2005) *Aeromonas salmonicida ile enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) patolojik bulguların incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
11. **Bergh O, Vikanes L, Makridis P, Skjermo J, Knappskog D, Rodseth OM** (2001) *Uptake and processing of a Vibrio anguillarum bacterin in Artemia franciscana measured by ELISA and immunohistochemistry*, Fish & Shellfish Immunology, 11: 15-22.

12. **Boesen HT, Pedersen K, Larsen JL, Koch C, Ellis AE** (1999) *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: Role of O- antigen structure of lipopolysaccharide, *Infection and Immunity*, 67: 294-301.
13. **Bogwald J, Stensvag K, Hoffman J, Espelid S, Holm KO, Jorgensen T** (1990) *Electrophoretic and immunochemical analysis of surface antigens of the fish pathogens Vibrio salmonicida and Vibrio anguillarum*, *Journal of Fish Diseases*, 13: 293-301.
14. **Candan A** (1993) *Vibrio anguillarum* infection in *Sparus aurata* L. 1758, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 23: 25-27.
15. **Candan A** (2000) *Türkiye’de üretilen Atlantik Salmonu (Salmo salar L.)’nda tespit edilen ilk vibriozis olgusu*, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30: 107-108.
16. **Chabrillon MC, Bordas MA, Morinigo MA, Balebona MC** (2004) *Kinetics of adhesion of Listonella anguillarum to the mucus of gilt-head seabream, and the implication of surface components*, *Aquaculture Research*, 35: 403-409.
17. **Chart H** (1983) *Multiflagellate variants of Vibrio anguillarum*, *Journal of General Microbiology*, 129: 2193-2197.
18. **Chen D, Hanna JP** (1992) *Attachment of Vibrio pathogens to cells of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*, *Journal of Fish Diseases*, 15: 331-337.
19. **Crosa JH, Hodges LL, Schiewe MH** (1980) *Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen Vibrio anguillarum*, *Infection and Immunity*, 27: 897-902.
20. **Culling, AF, Allison TR, Barr TW** (1985) *Cellulary Patholog Technique*, 4.rt Ed., Mid-County Pres, London.
21. **Çağırğan H** (1993) *Kültürü yapılan çipura (Sparus aurata) ve levrek (Dicentrarchus labrax) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhisi üzerine bir araştırma*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
22. **Çağırğan H** (2004) *Levrek yavrularında (Dicentrarchus labrax L., 1758) vibriozise karşı aşı geliştirilmesi*, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21: 271-274.
23. **Çamlıbel UR** (2002) *Levrek balıklarında (Dicentrarchus labrax L.) Vibrio anguillarum Bakterinine karşı oluşan Antikor reaksiyonun aglutinasyon testleri ile ortaya çıkarılması üzerinde bir çalışma*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

24. **Demircan D, Candan A** (2006) *Identification of Vibrio anguillarum by PCR (rpoN Gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey*, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 30: 305-310.
25. **DPT, Türkiye Cumhuriyeti Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı** (2007) *Dokuzuncu Kalkınma Planı (2007-2013)*, Balıkçılık Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Ankara.
26. **Egidius EC, Andersen K** (1978) *Host-specific pathogenicity of strains of Vibrio anguillarum isolated from rainbow trout Salmo gairdneri Richardson and saithe Pollachius virens (L.)*, Journal of Fish Diseases, 1: 45-50.
27. **Egidius M** (1987) *Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review*, Aquaculture, 67: 15-28.
28. **Eguchi M, Fujiwara E, Miyamoto N** (2000) *Survival of Vibrio anguillarum in freshwater environments adaption or debilitation*, Journal of Infection of Chemotherapy, 6: 126-129.
29. **Ekman E, Norrgren L** (2003) *Pathology and immunohistochemistry in three species of salmonids after experimental infection with Flavobacterium psychrophilum*, Journal of Fish Diseases, 26: 529-538.
30. **Ellis AE** (1985) *Eosinophilic granular cells (EGC) and histamine responses to Aeromonas salmonicida toxins in rainbow trout*, Developmental and Comparative Immunology, 9: 251-260.
31. **Erer H** (2002) *Balık Hastalıkları*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya.
32. **Evensen O, Olesen NJ** (1997) *Immunohistochemical detection of VHS virus in paraffin-embedded specimens of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): The influence of primary antibody, fixative, and antigen unmasking on method sensitivity*, Veterinary Pathology, 34: 253-261.
33. **Ezura Y, Tajima K, Yoshimuzi M, Kimura T** (1980) *Studies on the taxonomy and serology of causative organisms of fish vibriosis*, Fish Pathology, 14: 167-179.
34. **Farrell DH, JH Crosa** (1991) *Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium Vibrio anguillarum*, Biochemistry 30: 3432-3436.
35. **Flano E, Lopez-Fierro P, Razquin E, Villena A** (1997) *In vitro proliferation of eosinophilic granular cells in gill cultures from rainbow trout*, Fish & Shellfish Immunology, 7: 519-521.

36. **Foyle L, Turnbull T, Ellis A, Barnes A, Adams A, Ferguson HW** (2003) *Pasteurellosis in Atlantic salmon, Salmo salar L.: immunohistochemistry of the naturally-occurring disease*, Journal of Fish Disease, 26: 373-376.
37. **Geldiay R, Balık S** (1999) *Türkiye’de Tatlı Su Balıkları*, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, İzmir.
38. **Giorgetti G, Ceschia G** (1982) *Vibriosis in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, in fresh water in North-eastern Italy*, Journal of Fish Diseases, 5: 125-130.
39. **Gonzalez SF, Osorio CR, Santos Y** (2003) *Development of a PCR based method for the detection of Listonella anguillarum in fish tissues and blood samples*, Disease of Aquatic Organisms, 55: 109-115.
40. **Grisez L, Ollevier F** (1995) *Comparative serology of the marine fish pathogen Vibrio anguillarum*, Applied and Environmental Microbiology, 61: 4367-4373
41. **Grisez L, Chair M, Sorgeloos P, Ollevier F** (1996) *Mode of infection and spread of Vibrio anguillarum in turbot Scophthalmus maximus larvae after oral challenge through live feed*, Disease of Aquatic Organisms, 26: 181-187.
42. **Haastein T, Holt G** (1972) *Occurrence of vibrio disease in wild Norwegian fish*, Journal of Fish Biology, 4: 33-37.
43. **Hacking MA, Budd J** (1971) *Vibrio infection in tropical fish in a freshwater aquarium*, Journal of Wildlife Diseases, 7: 273-280.
44. **Harbell SC, Hodgins HO, Schiewe MH** (1979) *Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon Oncorhynchus kisutch (Walbaum)*, Journal of Fish Diseases, 2: 391-394.
45. **Hastein T, Smith JE** (1977) *A study of Vibrio anguillarum from farmed and wild fish using principal components analysis*, Journal of Fish Biology, 11: 69-75.
46. **Hjeltnes B, Andersen K, Ellingsen HM, Egidius E** (1987) *Experimental studies on the pathogenicity of a Vibrio sp. isolated from Atlantic salmon, Salmo salar L., suffering from hitra disease*, Journal of Fish Diseases, 10: 21-27.
47. **Hoff KA** (1989) *Survival of Vibrio anguillarum and Vibrio salmonicida at different salinities*, Applied and Environmental Microbiology, 55: 1775-1786.
48. **Hood MA, MacDonell MT** (1987) *Distribution of ultramicrobacteria in a Gulf coast estuary and induction of ultramicrobacteria*, Microbiology Ecology, 14: 113-127.

49. **Horne MT, Richards RH, Roberts RJ, Smith PC** (1977) Peracute vibriosis in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*, Journal of Fish Biology, 11: 355-361.
50. **Horne MT, Baxendale A** (1983) The *adhesion of Vibrio anguillarum to host tissues and its role in pathogenesis*, Journal of Fish Diseases, 6: 461-471.
51. **Humphrey JD, Lancaster CE, Gudkovs N, Cofland JW** (1987) *The disease status of Australian salmonids bacteria and bacterial diseases*, Journal of Fish Diseases, 10: 403-410.
52. **İnal T** (1992) *Hayvansal Gıdaların Sağlık Kontrolü*, Final Ofset, İstanbul.
53. **Irie T, Watarai S, Iwasaki T, Kodama H** (2004) *Binding of Vibrio anguillarum to neutral glycosphingolipids from intestinal mucosa of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, Journal of Veterinary Medical Science, 66: 205-208.
54. **Johnson KA, Amend DF** (1983) *Efficacy of Vibrio anguillarum and Yersinia ruckeri bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids*, Journal of Fish Diseases, 6: 473-476.
55. **Jansson E, Hongslo T, Linderberg R, Ljungberg O, Svensson MB** (1991) *Detection of Renibacterium salmoninarum and Yersinia ruckeri by the peroxidase-antiperoxidase immunohistochemical technique in melanin-containing cells of fish tissues*, Journal of Fish Diseases, 14: 689-692.
56. **Jones M, Cockerill DJ, Birkbeck TH, Cox DI** (2000) *Clinical infection of cod (Gadus morhua L.) in Scotland by Vibrio anguillarum-a case*, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 20: 125-128.
57. **Kanno T, Nakai T, Muroga K** (1989) *Mode of transmission of Vibriosis among Ayu Plecoglossus altivelis*, Journal of Aquatic Animal Health, 1: 2-6.
58. **Kanno T, Nakai T, Muroga K** (1990) *Scanning electron microscopy on the skin surface of ayu Plecoglossus altivelis infected with Vibrio anguillarum*, Diseases Aquatic Organisms, 8: 73-75.
59. **Kitao T, Aoki T, Fukudome M, Kawano K, Wada Y** (1983) *Serotyping of Vibrio anguillarum isolated from diseased freshwater fish in Japan*, Journal of Fish Diseases, 6: 175-181.
60. **Kodama H, Moustafa, M, Mikami T, Izawua H** (1985) *Characterization of extracellular substances of Vibrio anguillarum toxic for rainbow trout and mice*, Microbiology and Immunology, 29: 909-920.
61. **Korun J** (2006) *Kültürü yapılan Çipuralarda (Sparus aurata L.) görülen Listonella anguillarum enfeksiyonu üzerine bir çalışma*, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 23: 259-263.

62. **Korun J, Gökoğlu M** (2007) *Listonella anguillarum* isolated from Hatchery-cultured red porg *Pagrus pagrus* in Turkey, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6: 823-827.
63. **Korun J, Timur G** (2008) *Marine vibrios associated with diseased sea bass (Dicentrarchus Labrax) in Turkey*, *Journal of Fisheries Sciences. com*, 2: 66-76.
64. **Krovacek K, Faris A, Mansson I** (1987) *Cytotoxic and skin permeability factors produced by Vibrio anguillarum*, *Aquaculture*, 67: 87-91.
65. **Kueh SG, Crumlish M, Ferguson HW** (2004) *A novel 'skinny pot-belly' disease in Asian seabass fry, Lates calcarrifer (Bloch)*, *Journal of Fish Diseases*, 27: 731-735.
66. **Larsen JL** (1983) *Vibrio anguillarum: comparative study of fish pathogenic, environmental, and reference strains*, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 24:519-530.
67. **Larsen JL, Rasmussen HB, Dalsgaard I** (1988) *Study of Vibrio anguillarum strains from different sources with emphasis on ecological and pathological properties*, *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2264-2267.
68. **Larsen JL, Pedersen K, Dalsgaard I** (1994) *Vibrio anguillarum serovars associated with vibriosis in fish*, *Journal of Fish Diseases*, 17: 259-267.
69. **Larsen MH, Larsen JL, Olsen JO** (2001) *Chemotaxis of Vibrio anguillarum to fish mucus: role of the origin of the fish mucus, the fish species and the serogroup of the pathogen*, *FEMS Microbiology Ecology*, 38: 77-80.
70. **Laurencin FB, Germon E** (1987) *Experimental infection of rainbow trout, Salmo gairdneri R., by dipping in suspension of Vibrio anguillarum: ways of bacterial penetration; influence of temperature and salinity*, *Aquaculture*, 67: 203-272.
71. **Lewis DH** (1985) *Vibriosis in channel catfish, Ictalurus punctatus (Rafinesque)*, *Journal of Fish Diseases*, 8: 539-545.
72. **Lönström LG, Rahkonen R, Lunden T, Pasternack M, Koskela J, Gröndahl A** (2001) *Protection, immune response and side-effects in European whitefish (Coregonus lavaretus L.) vaccinated against vibriosis and furunculosis*, *Aquaculture*, 200: 271-284.
73. **Maniatis K, Morris DJ, Adams A, Pearson M** (2000) *Detection of Photobacterium damsela subspecies piscicida in fixed tissue sections using immunohistochemistry and antigen retrieval immunohistochemistry*, *Journal of Fish Diseases*, 23: 343-347.
74. **Maugeri TL, Caccamo D, Gugliandolo CJ** (2000) *Potentially pathogenic vibrios*

- in brackish waters and mussels*, Journal of Applied Microbiology, 89: 261-266.
75. **McCarthy DH, Stevenson JP, Roberts MS** (1974) *Vibriosis in rainbow trout* Journal of Wildlife Diseases, 10: 2-7.
 76. **Milton DL, Toole RO, Horstedt P, Wolf-Watz H** (1996) *Flagellin A is essential for the virulence of Vibrio anguillarum*, Journal of Bacteriology, 178: 1310-1319.
 77. **Miyazaki T** (1987) *A histological study of the response to challenge with vibriosis in ayu, Plecoglossus altivelis Temminck and Schlegel, vaccinated by immersion and injection with Vibrio anguillarum bacterin*, Journal of Fish Diseases, 10: 445-452.
 78. **Myhr E, Larsen JL, Lillehaug A, Gudding R, Heum M, Hastein T** (1991) *Characterization of Vibrio anguillarum and closely related species isolated from farmed fish in Norway*, Applied Environmental Microbiology, 57: 2750-2757.
 79. **Norqvist A, Norrman B, Wolf WH** (1990) *Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen Vibrio anguillarum*, Infection and Immunity, 58: 3731-3736.
 80. **Olsson JC, Joborn A, Westerdahl A, Blomberg L, Kjelleberg S, Conway PL** (1996) *Is the turbot, Scophthalmus maximus (L), intestines a portal of entry for the fish pathogen Vibrio anguillarum?*, Journal of Fish Diseases, 19: 225-234.
 81. **Olsson JC, Joborn A, Westerdahl A, Blomberg L, Kjelleberg S, Conway PL** (1998) *Survival, persistence and proliferation of Vibrio anguillarum in juvenile turbot, Scophthalmus maximus (L.), intestine and faeces*, Journal of Fish Diseases, 21: 1-10.
 82. **Onuk EE, Diker KS** (2006) *Dezenfektanların balık kökenli bakteriyel patojenler üzerine etkilerinin incelenmesi*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 53: 185-189.
 83. **Özer H, Beytut E, Erbuca S, Ekingen G** (1995) *Pathology in the viscera of scaly carp induced by some anaesthetics (Benzocaine, Chlorobutanol, Phenoxyethanol)*, Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 19: 97-100.
 84. **Pacha RE, Kiehn ED** (1969) *Characterization and relatedness of marine vibrios pathogenic to fish: Physiology, serology, and epidemiology*, Journal Bacteriology, 100: 1242-1247.
 85. **Pedersen K, Gram L, Austin DA, Austin B** (1997) *Pathogenicity of Vibrio anguillarum compared to plasmids, outer membrane protein profiles and siderophore production*, Journal Applied Microbiology, 82: 365-371.
 86. **Pedersen K, Grisez L, Houdt VR, Tiainen T, Ollevier F, Larsen JL** (1999) *Extended serotyping schema for Vibrio anguillarum with the defination and*

characterization of seven provisional O-Serogroups, Current Microbiology, 38: 183-189.

87. **Picado JM, Anicet RB, Jofre J** (1996) *Species-specific detection of Vibrio anguillarum in marine aquaculture environments by selective culture and DNA hybridization*, Applied and Environmental Microbiology, 62: 443-449.
88. **Powell MD, Braind HA, Wright GM, Burka JF** (1993) *Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum) intestinal eosinophilic granule cell (EGC) response to Aeromonas salmonicida and Vibrio anguillarum extracellular products*, Fish & Shellfish Pathology, 3; 279-289.
89. **Pybus V, Loutit MW, Tagg JR** (1994) *Siderophore production by New Zealand strains of Vibrio anguillarum*, New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 28: 309-315.
90. **Rad F** (1999) *Türkiye’de gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss) işletmelerinin teknik ve ekonomik analizi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
91. **Ransom DP, Lannan, CN, Rohovec JS, Fryer JL** (1984) *Comparison of histopathology caused by Vibrio anguillarum and Vibrio ordalii in three species of Pacific salmon*, Journal of Fish Diseases, 7: 107-115.
92. **Roberts RJ** (2001) *Fish Pathology*, 3rd Ed., W.B. Saunders, Toronto.
93. **Roed KH, Fevolden SE, Fjalestad KT** (2002) *Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) selected for lysozyme activity*, Aquaculture, 209: 91-101.
94. **Santos Y, Pazos F, Bandin I, AE, Toranzo AE** (1995) *Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of Vibrio anguillarum serotypes O1, O2 and O3*, Applied and Environmental Microbiology, 61: 2493-2498.
95. **Smith IW** (1961) *A disease of finnock due to Vibrio anguillarum*, Journal of General Microbiology, 24: 247-252.
96. **Sorensen UB, Larsen JL** (1986) *Serotyping of Vibrio anguillarum*, Applied Environmental Microbiology, 51: 593-597.
97. **Spanggaard B, Huber I, Nielsen T, Gram L** (2000) *Proliferation and location of Vibrio anguillarum during infection of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum)*, Journal of Fish Diseases, 23: 423-427.

98. **Sugita H, Yamamoto S, Asakura C, Morita T** (2005) *Occurrence of Listonella anguillarum in seed production environments of Japanese flounder Paralichthys olivaceus (Temminck et Schlegel)*, Aquaculture Research, 36: 920-926.
99. **Sveinbjornsson B, Olsen R, Paulsen S** (1996) *Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, Salmo salar L.*, Journal of Fish Diseases, 19: 349-355.
100. **Tanrıkul TT, Çağırğan H, Tokşen E** (2004) *Levrek' lerden (Dicentrarchus labrax., 1758) izole edilen vibrio türlerinin API 20E yöntemiyle identifikasyonu*, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 21: 243-247.
101. **Tanrıkul TT** (2007) *Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in Turkey*, Pakistan Journal of Biological Sciences, 10: 1733-1737.
102. **TÜİK, Türkiye Cumhuriyeti Başbakanlık İstatistik Kurumu** (2007) *Haber Bülteni*, Su Ürünleri, Ankara.
103. **Timur G, Korun J** (2004) *First Outbreak of Vibriosis in farmed rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) in Turkey*, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 18: 1-9.
104. **Tomomasa M, Iida T** (1999) *Degranulation of eosinophilic granule cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia*, Developmental and Comparative Immunology, 23: 451-457.
105. **Toranzo AE, Barja JL, Colwell RR, Hetrick FM, Crosa JH** (1983). *Haemagglutinating, haemolytic and cytotoxic activities of Vibrio anguillarum and related vibrios isolated from striped bass on the atlantic coast*, FEMS Microbiology letters, 172: 389-396.
106. **Trust TJ, Courtice ID, Khouri AG, Crosa JH, Schiewe MH** (1981) *Serum resistance and hemagglutination ability of marine vibrios pathogenic for fish*, Infection and Immunity, 34: 702-707.
107. **West PA, Lee JV, Bryant TN** (1983) *A numerical taxonomic study of species of Vibrio isolated from the aquatic environment and birds in Kent, England*, Journal of Applied Bacteriology, 55: 263-282.

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin oluŐturulmasında ve tezimin her aŐamasında değerli gürüŐlerini ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. S. Serap BİRİNCİOĞLU'na, laboratuvarımızdaki imkanları kullanmama olanak sağlayan Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof. Dr. Nursal METİN'e, bakteri ve bakteri antiserumunu temin ettiğimiz Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. HaŐmet ÇAĐIRGAN'a, çalıŐmalarım süresince bilgi ve tecrübelerini paylaŐan Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Doç. Dr. Nihat TOPLU ve Doç. Dr. Recai TUNCA'ya, yardım ve desteklerinden dolayı Araş. Gör. Ahmet AYDOĞAN ve Araş. Gör. E. Tuđrul EPIKMEN'e, mikrobiyolojik incelemelerdeki destek ve yardımlarından dolayı Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanlarına, tezimin yürütülmesi için gerekli mali desteği sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri BaŐkanlıđı'na, balıkların teminini sağlayan Çamoğlu Su Ürünleri Limited-1 ve Bağcı Balık Gıda ve Enerji Üretimi San Tic. A.Ő. yetkililerine, çalıŐmam sırasında büyük desteğini gördüğüm sevgili eŐim Nuray AVCI'ya içtenlikle teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Muğla/Yatağan'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi 1994 yılında Yatağan'da tamamladım. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesin'den 1999 yılında mezun oldum. Askerlik görevimi 2000-2001 tarihleri arasında yedek subay olarak yaptım. 2001 yılında ADÜ. Sağlık Bilimleri Enstitüsü kadrosunda Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2004 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladım ve aynı Anabilim Dalında Araş. Gör. kadrosuna atanarak, doktora eğitim programına başladım. Yabancı dilim İngilizce olup, evli ve iki erkek çocuk babasıyım.