



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA
(*Oncorhynchus mykiss*, W.) DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN LACTOCOCCOSİS' İN
BAKTERİYOLOJİK VE SEROLOJİK METOTLARLA
TEŞHİSİ**

**Su Ürünleri Mühendisi Çiğdem ÜRKÜ
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı
Hastalıklar Programı**

**Danışman
Prof. Dr. Gülşen TİMUR**

TEMMUZ, 2011

İSTANBUL

Bu çalışma 01. 07. 2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yetiştiricilik Anabilim Dalı Hastalıklar programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Gülşen TİMUR (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Ahmet AKMİRZA
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Soner ALTUN
Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi



Doç. Dr. Tülay AKAYLI
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 4925 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisan ve yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her konuda yardım ve hoşgörüsü ile destek olan, eğitimimde büyük katkısı bulunan sayın danışman hocam Prof. Dr. Gülşen TİMUR' a; her konuda yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım Doç. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM' a ve Doç. Dr. Tülay AKAYLI' ya, çalışmamda kullandığım bakteri suşlarını gönderen Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY' a, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Araştırma ve Uygulama Biriminden deneme balıklarının temini sırasında desteklerini esirgemeyen Sapanca İç su Ürünleri Araştırma ve Uygulama Birimi Müdürü Yrd. Doç. Dr. Erdoğan GÜVEN ve Dr. Hakan Erk' e, tavşan immunizasyon çalışması boyunca İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünde yardımlarını esirgemeyen uzman veteriner hekim Fatma TEKELİ' ye laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan Araş. Gör. Remziye Eda YARDIMCI' ya; Yetiştiricilik Anabilim Dalındaki tüm hocalarına ve çalışma arkadaşlarıma; çalışmalarım sırasındaki dostluk ve yardımlarına minnettar olduğum arkadaşlarıma, eğitimim ve tezimin gerçekleşmesinde her daim yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli aileme teşekkürü bir borç biliyorum.

Temmuz, 2011

Çiğdem ÜRKÜ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	ix
SEMBOL LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (<i>Oncorhynchus mykiss</i> , W.) VE MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ	5
2.2. GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL HASTALIKLAR.....	6
2.3. LACTOCOCCOSİS.....	8
2.3.1. Hastalığın Tarihçesi	8
2.3.2. Hastalığın Konakçıları.....	9
2.3.3. Etiyolojisi	9
2.3.3.1. Taksonomi.....	10
2.3.3.2. Morfolojik Özellikleri ve Hareket	12
2.3.3.3. Koloni Morfolojisi	12
2.3.3.4. Biyokimyasal Karakteri	12
2.3.3.5. Üreme İhtiyacı	13

2.3.4. Hastalığın Çıkışı ve Yayılışı	14
2.3.5. Hastalığın Klinik ve Otopsi Bulguları.....	15
2.3.6. Histopatolojik Bulgular	16
2.3.7. Hastalığın Teşhisinde Kullanılan Yöntemler	17
2.3.7.1. Serolojik Teknikler	17
2.3.7.2. Moleküler Teknikler	18
2.3.7.3. Hızlı Tanı Kitlerinin Kullanımı	19
2.3.8. Hastalığın Kontrolü	20
2.3.9. <i>Lactococcus garvieae</i> ' nin Diğer Patojen Kok Bakterilerden Ayırt Edici Özellikleri.....	24
2.4. BALIKLARDA İMMÜNİTE	26
2.6.1. Doğal İmmünite (Spesifik Olmayan Bağışıklık).....	27
2.6.2. Kazanılan İmmünite (Spesifik Bağışıklık)	30
2.6.2.1. Humoral İmmünite	30
2.6.2.2. Selüler İmmünite (Cell-Mediated İmmünite: CMI)	32
2.5.BAKTERİYEL BALIK HASTALIKLARINDA KULLANILAN SEROLOJİK TEKNİKLER	33
2.5.1. Lam Aglütinasyon Testi	34
2.5.2. FAT (Floresan Antikor Testi)	35
2.5.3. ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay)	37
3.MATERYAL VE YÖNTEM	38
3.1. MATERYAL	38
3.1.1. Denemede Kullanılan Balık Materyali	38
3.1.2. Tavşan Materyali	38
3.1.3. Deneysel Enfeksiyon ve İmmünizasyon Çalışmalarının Yapıldığı Yer	38
3.1.4. Serolojik Testlerin Yapıldığı Yer.....	39
3.1.5. Uygulama Tankları ve Uygulamada Kullanılan Su.....	39
3.1.6. Yem.....	39
3.1.7. Denemede Kullanılan <i>Lactococcus garvieae</i> Suşları	39
3.1.8. Bakteri Kültüründe Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler	40
3.1.9. Tavşan İmmünizasyon Çalışmasında Kullanılan Adjuvant	41

3.1.10. IFAT ve ELISA Testlerinde Kullanılan Antiserum	41
3.1.11. IFAT ve ELISA Testlerinde Kullanılan Konjugatlar	41
3.1.12. Serolojik Testlerde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar	42
3.1.12.1. IFAT Testinde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar.....	41
3.1.12.2. ELISA Testinde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar	41
3.1.13. ELISA Okuyucusu	42
3.1.14. Floresan Mikroskobu.....	42
3.2.YÖNTEM	43
3.2.1. Denemede Kullanılan Alabalıkların Adaptasyonu ve Sağlık Kontrolü	43
3.2.2. Denemede Kullanılan Balık Grupları	43
3.2.3. <i>Lactococcus garvieae</i> İnokulatlarının Hazırlanması ve Deneysel Olarak Enfeksiyon Oluşturma	44
3.2.4. Enfekte Balıklardan Bakterinin Re-İzolasyonu, Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Tespiti	44
3.2.4.1. Konvansiyonel Yöntem ile <i>L. garvieae</i> Suşlarının İdentifikasyonu	44
3.2.4.2. Hızlı Tanı Kitleri ile <i>L. garvieae</i> Suşlarının İdentifikasyonu.....	46
3.2.5. Enfekte Balıkların Klinik, Otopsi ve Histopatolojik Muayenesi	47
3.2.6. Enfekte Balıklardan Serum ve Doku Örneklerinin Elde Edilmesi	47
3.2.7. <i>L. garvieae</i> Suşlarının Antibiyogram Testi	48
3.2.8. Tavşan İmmünizasyonu için Bakterin Hazırlanması ve Antiserum Elde Edilmesi	48
3.2.9. Deneysel Olarak Enfekte Edilen Alabalık Serumlarındaki Spesifik Antikorların ve Doku Örneklerindeki Patojenin Varlığını Göstermek İçin Kullanılan Serolojik Testler	50
3.2.9.1. Lam Aglütinasyon Testi.....	50
3.2.9.2. Indirekt Floresan Antikor Tekniği (IFAT).....	50
3.2.9.3. Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	53
4. BULGULAR	55
4.1. DENEMEDE KULLANILAN ALABALIKLARIN ADAPTASYONU VE SAĞLIK KONTROLÜ BULGULARI	55
4.2. ENFEKTE EDİLEN BALIKLARDA <i>L. garvieae</i>' NİN	

İNKÜBASYON SÜRESİ VE MORTALİTESİ İLE İLGİLİ BULGULAR	55
4.3. ENFEKTE BALIKLARIN KLİNİK, OTOPSİ VE HİSTOPATOLOJİ BULGULARI.....	56
4.4. DENEYSEL OLARAK ENFEKTE EDİLEN ALABALIKLARDAN RE-İZOLE EDİLEN <i>Lactococcus garvieae</i> SUŞLARININ MORFOLOJİK, FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNE AİT BULGULAR	64
4.4.1. Konvansiyonel Bakteriyolojik Yöntem Bulguları.....	64
4.4.2. Hızlı Tanı Kitlerine Ait Bulgular	69
4.4.2.1. API 20 STREP Kiti ile Re-izolatların İdentifikasyonuna Ait Bulgular	69
4.4.2.2. API ZYM Kiti ile Re-izolatların İdentifikasyonuna Ait Bulgular.....	70
4.5. ANTİBİYOGRAF DUYARLILIK TESTİNE AİT BULGULAR	72
4.6. LAM AGLÜTİNASYON TESTİNE AİT BULGULAR	73
4.7. IFAT' ne AİT BULGULAR	74
4.7.1. Enfekte Edilen Alabalık Dokularındaki Antijen Varlığına Ait Bulgular	74
4.7.2. Enfekte Edilen Alabalık Serumundaki Spesifik Antikorların Varlığına Ait Bulgular	76
4.8. ELISA TESTİNE AİT BULGULAR.....	77
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	80
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	109

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3. 1	:Denemede kullanılan gökkuşağı alabalıkları	38
Şekil 3. 2	:Denemede kullanılan fiberglas tanklar.....	40
Şekil 3. 3	:Çalışmada kullanılan ELISA okuyucusu	42
Şekil 3. 4	:Çalışmada kullanılan fotoğraf makinesi ataçmanlı fluoresan mikroskop	43
Şekil 3. 5	:Denemede kullanılan alabalıklara 2-phenoxiethanol ile anestezi uygulanması	45
Şekil 3. 6	:Denemede kullanılan gökkuşağı alabalıklarına intraperitoneal enjeksiyonun uygulanması.....	45
Şekil 3. 7	:Enfekte balıklarda kaudal venadan kan alma Yöntemi ile kan alınması.....	48
Şekil 3. 8	:Çalışmada kullanılan tavşana intravenöz enjeksiyonun uygulanması.....	49
Şekil 3. 9	:Çalışmada kullanılan tavşanın kulak venasından kan alımı.....	49
Şekil 4. 1	:Yerli ve ATCC- 43921 referans nolu <i>L. garvieae</i> suşları ile enfekte alabalıkların deneysel enfeksiyon sonuçları	56
Şekil 4. 2	:Yerli suş ile enfekte edilen alabalıkta gözlerde bilateral ekzoftalmus ve göz çevresinde hemoraji, ağız bölgesinde, anüste anal ve pelvik yüzgeçlerde hemoraji (10 gün sonra)	57
Şekil 4. 3	:Referans suş ile enfekte alabalığın sırt bölgesinde deride renkte koyulaşma ve bilateral ekzoftalmus (9 gün sonra).....	57
Şekil 4. 4	:Yerli suş ile enfekte edilen alabalıkta dalakta büyüme,pilorik seka, hava kesesi ve yağ dokuda yaygın hemoraji ve hiperemi (17 gün sonra).....	58
Şekil 4. 5	:Referans suş ile enfekte edilen alabalıkta karaciğerde hiperemi ve peteşiyal hemoraji, hava kesesinde hemorajiler, hemorajik ve hiperemik bağırsak (15 gün sonra)	58
Şekil 4. 6	:Yerli suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının böbrek tübül epitellerinde dejenerasyon, periglomerular ödem (okla gösterilmiş), haemopoietik dokuda boşalma, belirgin melanomakrofaj odakları HE x 200 (13 gün sonra).....	59
Şekil 4. 7	:Referans suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının renal dokusunda liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiş), periglomerular ödem, böbrek tübül epitellerinde dejenerasyon HE X 100 (17 gün sonra)	60
Şekil 4. 8	:Yerli suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığında solungaç filamentlerinde hemorajik odaklar, talengectiaisis (okla gösterilmiş) ve solungaç epitelyum hücrelerinde hiperplazi HE x100(15 gün sonra))	60
Şekil 4. 9	:Referans suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığında	

	solungaç filamentlerindeki epitel hücrelerde hiperplazi, talengectiaisis ve goblet hücre sayısında HE X100 (14 gün sonra)	61
Şekil 4. 10	:Yerli suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının dalağında multifokal liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiş) ve geri kalan haemopoietik dokuda boşalma HE X200 (10 gün sonra).....	61
Şekil 4. 11	:Referans suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının dalağında liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiş) ve geri kalan haemopoietik dokuda boşalma HE X200 (11 gün sonra).....	62
Şekil 4. 12	:Yerli suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının hepatosit hücrelerinde yaygın dejenerasyon ve kan damarlarının içinde trombosit yığınakları (okla gösterilmiş) HE X400 (18 gün sonra).....	62
Şekil 4. 13	:Referans suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının karaciğerinde liquefactive nekroz (okla göstrelmiş) ve ödem HE X 100 (15 gün sonra).....	63
Şekil 4. 14	:Yerli suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının bağırsak kesitinde lamina propria içinde mor renge boyanmış ovoid hücre morfolojisine sahip Gram pozitif bakteri kümeleri (okla göstrelmiş) Doku Gramı x 1000 (12 gün sonra)	63
Şekil 4. 15	:Referans suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının gözünde sub-retinal hemoraji HE X 100 (13 gün sonra)	64
Şekil 4. 16	:Gram (+) boyanma özelliği gösteren kısa zincirler oluşturan ovoid hücre morfolojisine sahip bakteri hücreleri x400 (A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş.....	65
Şekil 4. 17	:Re- izole edilen bakterilerin siyah zemin üzerinde boşluklar şeklinde görülen kapsül varlığı x 400 (A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş.....	65
Şekil 4. 18	:Re- izole edilen bakterilerin %5 koyun kanı içeren agarda alfa hemolitik zon oluşumu (A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş	66
Şekil 4. 19	:Re- izole edilen patojen bakterilerde siyah renkli eskulin hidrolizi (A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş.....	66
Şekil 4. 20	:Re- izole edilen patojen bakterilerin TH- CR agar besiyerinde oluşturduğu beyaz koloniler (A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş.....	67
Şekil 4. 21	:Deneysel olarak enfekte edilen alabalıklardan re- izole edilen bakterilere ait API 20 STREP profili (4 saatlik inkübasyon) (A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş.....	70
Şekil 4. 22	:Deneysel olarak enfekte edilen alabalıklardan re- izole edilen bakterilere ait API 20 STREP profili (24 saatlik inkübasyon) (A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş.....	70
Şekil 4. 23	:Yerli ve referans <i>L. garvieae</i> suşlarına ait re- izolatların API ZYM profili (A): Yerli suş (B): Referans suş.....	72
Şekil 4. 24	:Flumequine (UB 30 µg), Streptomycin (S 10 µg), Sulphamethoxazole (SXT 25 µg), Clindamycine (CLD2 µg), Enrofloxacin'e (ENR 5 µg) ait antibiyogram duyarlılık testinin sonuçları (A): Yerli suş (B): Referans suş.....	72
Şekil 4. 25	:Enfekte balık serumunda antikorlarla <i>L. garvieae</i> antijeninin birleşerek oluşturduğu beyaz çökelekler (pozitif reaksiyon) (Çıplak gözle) (A): Yerli suş (B): Referans suş	74

Şekil 4. 26	: Lam aglütinasyon testinde antijen-antikor komplekslerinin oluşturduğu kümelerin ışık mikroskobunda görünümü x400 (A): Yerli suş (B): Referans suş	74
Şekil 4. 27	:Yerel suş ile enfekte edilen alabalığın karaciğer dokusunda ovoid yeşil floresan görünüme sahip kok bakterilerin varlığının floresan mikroskopta görünümü x 400.....	75
Şekil 4. 28	:Referans suş ile enfekte edilen alabalığın göz dokusunda yeşil floresan şekle sahip kok bakterilerin varlığının floresan mikroskopta görünümü x 200.....	75
Şekil 4. 29	:Yerli suş ile enfekte edilen alabalığın serumundaki spesifik antikorların <i>L.garvieae</i> antijeni ile oluşturduğu yeşil floresan görünüme sahip antijen- antikor kompleksleri x400	77
Şekil 4. 30	:Referans suş ile enfekte edilen alabalığın serumundaki spesifik antikorların <i>L. garvieae</i> antijeni ile oluşturduğu yeşil floresan görünüme sahip antijen- antikor komplekslerinin floresans mikroskoptaki görünümü x400	77
Şekil 4. 31	:ELISA testinin uygulandığı plaktaki renk değişimi (koyu sarı pozitif reaksiyon).....	78

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1	:Balık patojeni olan bazı Gram pozitif kok bakteri genuslarının hücre düzeni, sitokrom oksidaz ve katalaz testleri	11
Tablo 2. 2	: <i>Streptococcaceae</i> familyasına ait genuslarının ayırımında kullanılan testler	11
Tablo 2. 3	: <i>Lactococcus garvieae</i> ' nin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri	13
Tablo 2. 4	:Bazı <i>Lactococcus</i> türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler	25
Tablo 4. 1	:Enfekte alabalıklardan re-izole edilen bakteri suşlarına ait fiziksel ve biyokimyasal testlerin sonuçları	68
Tablo 4.2	:Deneysel olarak enfekte edilen alabalıklardan re- izole edilen bakterilere ait API 20 STREP profilinin sonuçları (24 saatlik inkübasyon).....	69
Tablo 4. 3	:Yerli ve referans <i>L. garvieae</i> suşlarına ait re- izolatların API ZYM profilinin sonuçları	71
Tablo 4. 4	:Yerli ve referans <i>L. garvieae</i> suşlarının antibiyogram test sonuçları.....	73
Tablo 4. 5	: ELISA testinde kullanılan dilüsyon oranları.....	79

SEMBOL LİSTESİ

FAT	: Floresan Antikor Tekniği
IFAT	: İndirek Floresan Antikor Tekniği
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Ig	: Immunoglobulin
FITC	: Fluorescein Isothiocyanate
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
PFGE	: Pulsedfield Gel Electrophoresis
BHIA	: Brain Heart Infusion Agar
BEA	: Safra Eskulin Azid
TSA	: Tryptic Soy Agar
BA	: Kanlı Agar
TH-CR	: Todd Hewitt- Congo Red
CA	: Congo Red Agar

ÖZET

GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*, W.) DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN LACTOCOCCOSİS' İN BAKTERİYOLOJİK VE SEROLOJİK METOTLARLA TEŞHİSİ

Bu çalışma, yerli ve referans *Lactococcus garvieae* suşları ile deneysel olarak enfekte edilen genç gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, W.) oluşturulan lactococcosis' in bakteriyolojik ve serolojik tekniklerle teşhisini ve histopatolojik konfirmasyonunu yapmak için yürütülmüştür. Bu amaçla konvensiyonel bakteriyolojik teşhis metodları ile hızlı tanı kitleri; lam aglütinasyon, İndirekt Floresan Antikor Tekniği (IFAT) ve Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibi serolojik testler ve histopatolojik yöntemler kullanılmıştır.

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi, Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edilen 65 ± 5 gr ağırlığındaki 100 adet gökkuşağı alabalığı Fakültemizin Yetiştiricilik Anabilim Dalı Hastalıklar Programına ait adaptasyon tanklarına yerleştirilmiş ve 7 gün boyunca adaptasyona tabi tutulmuştur. Adaptasyon tankından rastgele seçilen 6 adet balığın otopsileri yapıldıktan sonra bakteriyolojik kontrol amacıyla böbrek, dalak ve karaciğer gibi bakteriyolojik inokülasyonlardan TSA besiyerine ekim yapılmıştır. Sağlıklı 75 adet balık 3 gruba ayrılmış, 25' şer adet alabalık denemede kullanılan 1 m çapında 70 cm derinliğindeki üç adet sirküler fiberglas tanka yerleştirilmiştir. Birinci deneme grubundaki balıklara 10^7 hücre/ml yerli *L. garvieae* suşu, ikinci deneme grubundaki balıklara 10^7 hücre/ml referans *L. garvieae* suşu üçüncü kontrol grubundaki 20 adet balığa 0.1 ml steril PBS intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Deneme boyunca tanklardaki suyun sıcaklığı 17 ± 1 °C olarak ayarlanmıştır.

Enjeksiyonun 5. gününde deneysel olarak enfekte edilen her iki gruptaki balıklarda letarji ve iştahta azalma gözlenmiştir. 5. günden sonra eksternal olarak gözlerde bilateral ekzoftalmus, hemoraji ve korneal opaklaşma, derinin renginde koyulaşma, yüzgeç diplerinde hemorajiler, internal olarak hava kesesi, sindirim kanalı ve visceral yağ dokuda yaygın hemoraji, karaciğerde renkte solgunluk ve hemoraji, dalakta büyüme gözlenmiştir.

Histopatolojik olarak, her iki deneme grubunda karaciğer, böbrek ve dalakta multifokal liquefactive nekroz odakları ve haemopoietik dokuda boşalma; solungaç filamentlerinde hemoraji, talengectiaaisis, solungaç filament epitel hücrelerinde hiperplazi ve gözlerde retina altında hemorajik odaklar görülmüştür. Doku Gramı ile boyanan bağırsak preparatlarında lamina propria da Gram pozitif bakteriler tespit edilmiştir.

Enfekte kan serumunda *L. garvieae*' nin her iki suşuna karşı antikor oluşumu lam aglütinasyon, IFAT ve ELISA testleri ile tespit edilmiştir. Kuvvetli aglütinasyon lam aglütinasyon testiyle enjeksiyonun 4. haftasında elde edilen kan serumunda tespit edilirken patojen bakteri enjeksiyonun 5. gününde enfekte balıkların karaciğer, böbrek, göz ve dalaklarında tespit edilmiştir. Kan serumundaki spesifik antikorların varlığı enfeksiyonun 4. haftasında lam aglütinasyon, IFAT ve ELISA testleri ile kanıtlanmıştır.

Sonuç olarak, lactococosis lam aglütinasyon, IFAT, ELISA tesleri kullanılarak teşhis edilmiştir. Bu serolojik teknikler konvensiyonel bakteriyolojik metotlarla karşılaştırıldığında daha kısa sürdüğü tespit edilmiştir.

SUMMARY

A DIAGNOSTIC STUDY OF EXPERIMENTALLY INDUCED LACTOCOCCOSIS IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*, W.) BY BACTERIOLOGICAL AND SEROLOGICAL TECHNIQUES

This study was carried out in young rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*, W.) experimentally infected with local and reference *Lactococcus garvieae* strains to diagnose lactococcosis by bacteriological and serological techniques and to confirm by histopathology. For this purpose, conventional bacteriological diagnostic methods and rapid diagnostic kits, slide agglutination, Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tests and histological methods were used.

In this study, young 100 rainbow trouts weighing 65 ± 5 gr obtained from Istanbul University Sapanca Freshwater Fish Production Research and Applied Unit were replaced into adaptation tanks belonging Diseases Section of Aquaculture Department and were adapted for a period of 7 days. Six randomly selected fish from adaption tanks was autopsied then bacteriological inoculation from liver, kidney and spleen were streaked onto TSA medium for bacteriological control. 75 healthy fish were divided into 3 groups and each 25 rainbow trouts were placed into 3 circular fiberglass tanks, 1 m in diameter and 70 cm depth. The first experimental group fish were injected with 10^7 cells/ml of local *L. garvieae* strain, second experimental group fish were injected with 10^7 cells/ml of reference *L. garvieae* strain also third control group including 20 fish were injected with 0.1 ml sterile PBS. The temperature of water in the tanks was adjusted at 17 ± 1 °C during the experiment period.

On the fifth day of injection, both groups of experimentally infected rainbow trout showed lethargy and loss of appetite. After the fifth day, externally bilateral exophthalmia with haemorrhage and corneal opacification, darkening of the skin and haemorrhages at the base of fins and internally extensive haemorrhages in the gut wall, swim bladder and visceral adipose tissue, pale liver with petechial haemorrhage and enlarged spleen were observed.

Histopathologically, in the experimental groups liquefactive necrosis and reduced of interrenal haemopoietic tissue in the spleen and kidney; liquefactive necrosis in the liver; in the gill filaments hemorrhage, telangiectasis and hyperplasia of the gill filament; sub-retinal haemorrhage in the eyes were observed. Gram positive bacteria were present in the lamina propria of intestine stained with Tissue Gram.

The antibody formation against two strains of *L. garvieae* has been demonstrated in the infected blood serum by the slide agglutination, IFAT and ELISA tests. While strong agglutination were observed in the blood serum obtained on the fourth week of

injection by slide agglutination test, the pathogen bacteria were demonstrated in the eye, spleen, kidney and liver of the moribund fish by IFAT from after fifth day of injection. The presence of spesific antibody in the blood serum were demonstrated by slide agglutination, IFAT and ELISA test from moribund fish four week after injection.

As a result, lactococcosis was diagnosed using by namely as slide agglutination, IFAT and ELISA. This serological techniques have been performed in a short time when compared with conventional bacteriologic metods.

1. GİRİŞ

Türkiye’de 1970’ li yıllarda kamu ve özel girişimciler tarafından başlatılmış olan gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği gerek dünyada gerekse ülkemizde üstün yetiştirme avantajları nedeniyle büyük aşamalar katetmiştir. Ülkemizde önceleri küçük işletmeler tarafından gerçekleştirilen gökkuşağı alabalığı üretimi, 1990’ lı yıllardan itibaren entegre üretim tesislerine dönüşmüştür (Çelikkale, 1988; Emre ve Kürüm, 1998; Çelikkale ve diğ., 1999; Emre 2004; Alpbaz, 2005).

Dünyada kültürü en fazla yapılan gökkuşağı alabalığı diğer salmonid balıklara göre kuluçka süresinin kısalığı, çevre koşullarına adaptasyonunun kolay olması, doğal ve yapay yemden yararlanma yeteneğinin yüksek olması ve hastalıklara karşı dayanıklılığı sebebiyle tercih edilmektedir (Edwards, 1978; Shepherd ve Bromage, 1988; Gall ve Crandel, 1992; Çelikkale, 1994; Rasmussen ve Ostefeld, 2000; Aras ve diğ., 2000).

Birçok gelişmiş ülkede balıkların intensif olarak yüksek populasyon yoğunluğunda yetiştiriciliğinin yapılması enfeksiyöz hastalık çıkışlarına dolayısıyla ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Roberts ve Shepherd, 1990; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007).

Gökkuşağı alabalıklarında *Aeromonas salmonicida* (Emmerich &Weibel, 1894) *Renibacterium salmoninarum* (Belding ve Merrill, 1935), *Flexibacter psychrophilus* (*Flavobacterium psychrophilum*) (Davis, 1946), *Yersinia ruckeri* (Ross ve diğ., 1966), *Vibrio anguillarum* (*Listonella anguillarum*) (Ross ve diğ., 1968), *Pseudomonas fluorescens* (Hatai ve diğ., 1975) ve *Vibrio salmonicida* (Egidius ve diğ., 1986) gibi patojen bakterilerin neden olduğu bakteriyel hastalıklar; İnfeksiyöz Pankreatik Nekrosis (IPN), (Wolf ve diğ., 1960), Viral Hemorajik Septisemi (VHS) (Meier ve Vestergaard-Jsrgensen, 1975) ve İnfeksiyöz Haemopoietik Nekrosis (IHN) (Bovo ve diğ., 1987) gibi viral hastalıklar ayrıca *Myxosoma cerebralis* (Hofer, 1903), *Hexamita salmonis* (Moore,

1922), *Ichthyophthirius multifiliis* (Meyer, 1974) ve *Costia necatrix* (Bohl, 1975) gibi protozoan parazitlerin neden olduğu parazitler hastalıkların görüldüğü bildirilmiştir.

Balık hastalıklarının teşhisinde bakteriyolojik, virolojik, parazitolojik ve histopatolojik yöntemlerin yanı sıra aglütinasyon, hemaglütinasyon, presipitasyon, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve Floresan Antikor Tekniği (FAT) gibi serolojik yöntemlerde kullanılmaktadır (Anderson, 1974; Anderson, 1990; Arkoosh ve Kaattari, 1990; Roberson, 1990; George, 2002; Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004; Austin ve Austin 2007).

Balık hastalıklarında antijen-antikor reaksiyonlarına bağlı olan serolojik teknikler; hastalığın hızlı teşhisi ve hemen tedavisine başlamasına olanak sağlaması ve dolayısıyla çıkan hastalığın zararının azaltılması, hastalığın yayılmasını önleyici uygun tedbirlerin alınabilmesine; zaman, insan gücü ve maliyeti azaltması ve saha çalışmalarında hızlı test uygulamasına imkân vermesi gibi nedenlerle kullanılmaktadır (Voller ve diğ., 1978; Schill ve diğ., 1989; Arkoosh ve Kaattari, 1990; Roberson, 1990; Whitman, 2004, Pasnik ve diğ., 2006; Adams ve diğ., 2008).

En çok kullanılan serolojik tekniklerden biri olan aglütinasyon testi serumdaki aglütinin isimli antikorla, hücrelerdeki aglütinojen isimli antijenin birleşmesi sonucu hücrelerin bir araya toplandığı bir testtir (Anderson, 1974; Buxton ve Fraser 1977; Roberson, 1990; Bilgehan, 2002; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin 2007). Lam aglütinasyon, mikroaglütinasyon, pasif hemaglütinasyon ve tüp aglütinasyon gibi testler bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde, balık patojenlerinin serotiplendirme çalışmalarında, balıklardaki patojen suşların serolojik olarak karşılaştırılmasında ve balık patojenlerine karşı antikor aranmasında, yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Sorensen ve Larsen, 1986; Toranzo ve diğ., 1987; Knappskog ve diğ., 1993; Roberson, 1990; Kubilay ve Timur, 1997; Kubilay ve Diler, 1999; Kubilay ve Timur, 2001; Timur ve Timur, 2003; Çağırgan, 2004; Austin ve Austin, 2007).

Floresan Antikor Tekniği (FAT) floresan madde ile işaretli olan antikorların antijene bağlanması ile ultraviyole ışıklı floresan mikroskopunda oluşan antijen-antikor komplekslerinin görüldüğü bir testtir. Bu test ile hem dokudaki patojenin varlığı hem de

serumdaki spesifik antikorların varlığı tespit edilmektedir (Lewis ve Savge, 1972; Anderson, 1974; Buxton ve Fraser, 1977; Anderson, 1990; Ağaçfıdan ve Badur, 2002; Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004; Us, 2006; Austin ve Austin 2007).

Veteriner ve insan hekimliğinde günümüzde ise balık hastalıklarında yaygın olarak kullanılan çok hassas, hızlı bir diğer serolojik teknik olan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testinde antijen- antikor birleşmesini ortaya çıkarmak için deneye antikora bağlanabilen enzim konjugatı ve enzim substratı ilave edilerek ELISA okuyucusunda okunması suretiyle test serumlarının antikor titreleri ortaya çıkarılır (Engvall ve Perlmann, 1972; Buxton ve Fraser, 1977; Voller ve diğ., 1978; Arkoosh ve Kaattari, 1990; Ağaçfıdan ve Badur, 2002; Bilgehan, 2002; Whitman, 2004; Us, 2006; Austin ve Austin, 2007).

Farklı coğrafik bölgelerde gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) enfeksiyona neden olan bakteriyel patojenler yoğun olarak araştırılmıştır. Özellikle *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Lactococcus garvieae* ve *Yersinia ruckeri* enfeksiyonlarının ciddi kayıplara yol açtığı vurgulanmaktadır (Emmerich & Weibel 1894; Timur ve Timur 1991; Burka ve diğ., 1997; Schmid ve diğ., 2000; Timur ve diğ., 2000; Diler ve diğ., 2002; Kum ve diğ., 2004; Timur ve Korun, 2004; Akinbowale ve diğ., 2006).

Lactococcosis dünyanın birçok ülkesinde yaz aylarında su sıcaklığı arttığında yetiştiriciliği yapılan birçok balık türünde özellikle gökkuşağı alabalıklarında ekonomik kayıplara neden olan septisemik bir hastalıktır (Palacios ve diğ., 1993; Carson, Gudkovs ve Austin, 1993; Bark ve McGregor, 2001; Diler ve diğ., 2002; Çağırhan, 2004; Soltani ve diğ., 2008; Eyngor ve diğ., 2004; Savvidis ve diğ., 2007; Evans, Klesius ve Shoemaker, 2009; Sharifiyazdi ve diğ., 2010; Avcı ve diğ., 2010).

Lactococcosis ilk olarak 1988 yılında İspanya' daki bir alabalık işletmesindeki balıklarda meydana gelmiş (Palacios ve diğ., 1993) daha sonra bu hastalık Avusturya, Güney Afrika (Carson, Gudkovs ve Austin, 1993), İtalya (Ghittino ve Prearo, 1992), Bulgaristan (Eyngor ve diğ., 2004), Fransa (Eyngor ve diğ., 2004), Yunanistan (Savvidis ve diğ., 2007), İran (Soltani ve diğ., 2008; Sharifiyazdi ve diğ., 2010),

İngiltere (Bark ve McGregor, 2001), Portekiz (Pereira ve diğ., 2004), İsrail (Eyngor ve diğ., 2004), Kore (Baeck ve diğ., 2006), Tayvan (Chen ve diğ., 2002) ve ABD (Evans, Klesius ve Shoemaker, 2009) gibi dünyanın birçok ülkesinde görülmüş ve kültür balıklarında ekonomik kayıplara neden olmuştur. Ülkemizde ise ilk olarak 2002 yılında Ege Bölgesi' ndeki bir gökkuşağı alabalığı işletmesinde görüldüğü rapor edilmiştir (Diler ve diğ., 2002).

Bu çalışmada ülkemizde kültür alabalıklarında enfeksiyona neden olan lactococcosis' in teşhisinde konvansiyonel bakteriyolojik metodlar ve hızlı tanı kitlerinin yanısıra lam aglütinasyon, IFAT ve ELISA gibi farklı serolojik yöntemlerin kullanılması ve histopatolojik konfirmasyonu amaçlanmaktadır. ATCC-43921 numaralı referans ve yerli *L. garvieae* suşları ile deneysel olarak enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarının visceral organlarından patojen bakteri re-izole edilerek bakterinin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri tespit edilecek, API 20 STREP (bioMérieux) ve API ZYM (bioMérieux) gibi hızlı tanı kitleri ile identifikasyonu yapılacaktır. Bu çalışmada deneysel olarak enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarının dokularındaki patojen bakterinin varlığı İndirekt Floresan Antikor Tekniği (IFAT) ile serumlarındaki spesifik antikorların varlığı ise lam aglütinasyon, IFAT ve ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay) teknikleri ile tespit edilerek lactococcosis' in hızlı serolojik teknikler ile kısa sürede teşhisinin yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*, W.) VE MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİ

1880' li yıllarda gökkuşağı alabalığının farklı formları Avrupa' daki balık çiftliklerine getirilerek burada aralarında melezleme ile karışmaları sağlanmıştır. Amerikan çelikbaş alabalığı (*Salmo gaidneri irideus*) Kuzey Amerika' nın batı kıyılarında yaşayan göçücü ve kıyısız bir balık olup bu balıkların biyolojik özellikleri Amerikan deniz alabalığının özelliklerine benzerlik gösterir. Amerikan gökkuşağı alabalığı (*Salmo gaidneri shasta*) ise kahverengi alabalığa benzer ve Sierra Nevada' daki dağ nehirlerinde yaşayan daha az göç eden bir alttürüdür (Muus ve Dahlstrom, 1971).

Gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) *Salmonidae* familyasının *Oncorhynchus* genusuna mensup Amerika orijinli bir balıktır. Salmonid balıkların vücutları ince uzun olup ışınli dorsal yüzgeci ile kuyruk yüzgeci arasında ışinsız adipoz yüzgeci bulunur. Bıyıkları yoktur. Pulları küçüktür. Kafanın üst kısmı ve arkası çelik mavisi, maviyeşil, sarı - yeşil ve kahverengidir. Vücutlarının yan tarafları gümüşü, beyaz veya soluk sarı -yeşilden griye eğilimli olan bir renktedir. Karın kısmı gümüşü beyaz veya sarıdır. Vücutlarının yan taraflarında bulanık pembe, mavimtrak veya geniş açık bir pembe bant ile çok sayıda küçük lekeler bulunur. Bu balıklar Avrupa da en fazla 70 cm boya ve 7 kg ağırlığına ulaşır (Muus ve Dahlstrom, 1971; Stevenson, 1987, Atay, 1987; Çelikkale 1988; Roberts ve Shepherd, 1990; Purser ve Forteach, 2005).

Gökkuşağı alabalıkları cinsi olgunluğa 2 - 3 yılda ulaşabilirler. Üreme dönemindeki alabalıklarda cinsiyet farkı kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Erkek bireylerde renkler daha parlak olurken daha yaşlı bireylerde üreme döneminde alt çenede bir çengel oluşumu meydana gelmektedir. Dişi bireylerde ise karın kısmı oldukça şişkindir ayrıca genişlemiş olan anüs kırmızı bir renk almaktadır. Anaçlarda yumurtlama zamanı renk çok koyu ve yanal çizgi ise çok kırmızı renk almaktadır. Cinsi olgunluğa ulaşan

balıkların üreme dönemi Kasım - Nisan ayları arasındadır ve 1 kilogram canlı ağırlığa 1600 - 2000 adet yumurta verirler. Karnivor olan bu balık özellikle hayvansal gıdalarla beslenir. Alabalık fryları göl ve nehirlerde zooplanktonla beslenirken daha sonra dönemlerinde böcek, krustase ve diğer balıklarla beslenir (Muus ve Dahlstrom, 1971; Leitritz ve Lewis, 1980; Atay, 1987; Purser ve Forteath, 2005; Alpbaz, 2005).

Gökkuşağı alabalığı yemeklik balık olarak yetiştirildiği gibi sportif balıkçılık için doğal suların aşılması amacıyla da yetiştirilmektedir. Bu nedenle gökkuşağı alabalığı bütün dünyada kültürü yapılan ve doğal sulara sportif amaçla aşılanan bir balıktır (Muus ve Dahlstrom, 1971; Roberts ve Shepherd, 1990; Purser ve Forteath, 2005). Gökkuşağı alabalığı tatlı sularda Atlantik salmonu ve kahverengi alabalığa göre daha hızlı geliştiği için en fazla sofralık balık olarak yetiştirilen balık türünü oluşturmaktadır (Roberts ve Shepherd, 1990).

Kuzey Amerika kökenli bir balık olan gökkuşağı alabalığının ilk yetiştiricilik çalışmaları Kaliforniya' daki McCloud adlı küçük bir nehirde başlamış daha sonra 1880 yılında Avrupaya getirilmiştir (Gall ve Crand, 1992). Gökkuşağı alabalığının Türkiye'de yetiştiriciliği 1970'li yıllarda kamu ve özel girişimciler tarafından başlatılmıştır. Dünya genelindeki kültür balıkçılığının gelişimine koşut olarak ülkemizde de özellikle üstün yetiştirme avantajları nedeniyle gökkuşağı alabalığı üretimi büyük aşamalar katetmiştir (Çelikkale, 1988; Çelikkale ve diğ., 1999; Alpbaz, 2005).

Ülkemizde 2000' li yıllarda alabalık üretimi önemli aşamalar kaydetmiş üretim yapan çiftliklerin sayısı 1,444' e ulaşırken Türkiye dünya su ürünleri üretiminde 30. sırada yer almıştır (FAO, 1999a). Günümüzde ise 75,657 tona ulaşmış olan alabalık üretimi toplam içsu balıkları üretimimizin neredeyse tamamını oluşturmaktadır (TÜİK, 2010).

2.2. GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL HASTALIKLAR

Hastalık; bir balığa veya bir popülasyona zarar vererek onu veya onları dezavantajlı duruma sokan herhangi bir fenomen olarak tanımlanmaktadır. Bu fenomen biyotik veya

abiyotik kökenli olabilir. Balıklardaki başlıca biyotik hastalık etkenlerini bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler oluşturur. Balıklarda hastalık genetik bir bozukluktan kaynaklanabildiği gibi fiziksel bir travma, kötü beslenme veya çevre kirliliği gibi abiyotik faktörler yada biyotik veya abiyotik faktörlerin kombinasyonundan kaynaklanabilmektedir (Stevenson, 1987; Timur ve Timur, 2003).

Balık hastalıklarının su ürünleri yetiştiriciliğinde başlıca sınırlayıcı etkeni oluşturduğu birçok ülkede ekonomik ve sosyoekonomik gelişimi önemli ölçüde de etkileyebildiği bildirilmiştir (Subasinghe ve Bernoth, 2000). Çeşitli balık hastalıklarının kültür balıklarında görülmesi çevre ve patojen-konakçı balık ilişkisinin bir sonucudur. 1980' li yıllarda kültür balıklarında 15 - 20 bakteri türünün izole edildiği bildirilirken (Munro, 1982) günümüzde hasta balıklardan 70'e yakın patojen bakteri türünün izole edildiği bildirilmiştir (Woo ve Bruno, 2003; Austin ve Austin, 2007).

Dünyada farklı coğrafik bölgelerde yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında enfeksiyona neden olan patojenler yoğun olarak araştırılmıştır. Salmonid balıkların kuluçkahane ve işletmelerinde ciddi kayıplara neden olan furunkulosis' in etkeni ve bilinen ilk balık patojeni olan *Aeromonas salmonicida*' nın ilk defa 1894 yılında Almanya' daki bir alabalık kuluçkahanesinden izole edildiği bildirilmiştir (Emmerich & Weibel, 1894). Daha sonraki yıllarda *Renibacterium salmoninarum* (Belding ve Merrill, 1935), *Flexibacter psychrophilus* (Davis, 1946), *Yersinia ruckeri* (Ross ve diğ., 1966), *Vibrio anguillarum* (Ross ve diğ., 1968), *Pseudomonas chlororaphis* (Hatai ve diğ., 1975), *Edwardsiella tarda* (Amandi ve diğ., 1982), *Vibrio salmonicida* (Egidius ve diğ., 1986), *Streptococcus iniae* (Eldar ve diğ., 1995), *Streptococcus difficilis* (Eldar ve diğ., 1995), Riketsiya benzeri organizmalar (RLO' s) (Cvitanich ve diğ., 1991), *Staphylococcus epidermidis* (Mousavi ve diğ., 2010) ve *Staphylococcus warneri* (Gil ve diğ., 2000; Mousavi ve diğ., 2010) gibi patojen bakterilerin gökkuşağı alabalıklarında hastalığa neden olduğuna dair raporlar mevcuttur. Ayrıca son yıllarda Gram pozitif bir bakteri olan *Lactococcus garvieae*' nin gökkuşağı alabalıklarında yüksek mortalite ile seyreden septisemik bir hastalığa neden olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Palacios ve diğ., 1993; Eldar ve Ghittino, 1999; Ghittino ve Muzquiz, 1998; Diler ve diğ., 2002; Çağırğan, 2004; Kav ve Erganis, 2007; Tanrıkul ve Gültepe, 2011).

Ülkemizde kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında furunkulosis (Timur ve diğ., 2000; Kırkan ve diğ., 2003; Akşit ve Kum, 2008), *Pseudomonas* enfeksiyonu (Akaylı ve Timur, 2004; Altınok ve diğ., 2006; Altınok ve diğ., 2007), lactococcosis (Diler ve diğ., 2002, Çağırkan, 2004; Kav ve Erganis, 2007; Akşit ve Kum, 2008), vibriosis (Timur ve Korun, 2004; Tanrıkul, 2007; Akşit ve Kum, 2008), bakteriyel soğuk su hastalığı (Korun ve Timur, 2001; Timur, Timur ve Korun, 2003; İspir ve diğ., 2004; Kubilay ve diğ., 2009), hareketli *Aeromonas septisemi* (Baran ve diğ., 1981; Sağlam ve diğ., 2006), yersiniosis (Timur ve Timur, 1991; Sağlam ve diğ., 2006; Kırkan ve diğ., 2000, 2006; Akşit ve Kum, 2008), edwardsiellosis (Keskin ve diğ., 2004), staphylococcosis (Turgay, 2009) ve kolumnaris (Kubilay ve diğ., 2008) gibi bakteriyel hastalıkların görüldüğüne dair raporlar mevcuttur.

2.3. LACTOCOCCOSIS

L. garvieae' nin neden olduğu lactococcosis dünyanın birçok ülkesinde yaz aylarında su sıcaklığı arttığında yetiştiriciliği yapılan tatlı su ve deniz balıklarında ekonomik kayıplara neden olan septisemik bir hastalıktır (Ghittino ve Prearo, 1992 ;Carson, Gudkovs ve Austin, 1993; Bark ve McGregor, 2001; Diler ve diğ., 2002; Çağırkan, 2004; Soltani ve diğ., 2008; Eyngor ve diğ., 2004; Vendrell ve diğ., 2006; Savvidis ve diğ., 2007; Evans, Klesius ve Shoemaker, 2009).

2.3.1. Hastalığın Tarihçesi

Lactococcosis' in ilk olarak 1988 yılında İspanya' daki bir alabalık işletmesindeki balıklarda çıktığı bildirilmiştir (Palacios ve diğ. 1993). Bu hastalığın 1988 yılından sonra dünyanın birçok ülkesinde görüldüğü ve kültür balıklarında ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir. Lactococcosis Avusturya, Güney Afrika (Carson, Gudkovs ve Austin, 1993), İtalya (Ghittino ve Prearo, 1992), Bulgaristan (Eyngor ve diğ., 2004), Fransa (Eyngor ve diğ., 2004), Yunanistan (Savvidis ve diğ., 2007), İran (Soltani ve diğ., 2008; Sharifiyazdi ve diğ., 2010), İngiltere (Bark ve McGregor, 2001), Portekiz (Pereira ve diğ., 2004), İsrail (Eyngor ve diğ., 2004), Kore (Baeck ve diğ., 2006), Tayvan (Chen ve diğ., 2002) ve ABD (Evans, Klesius ve Shoemaker, 2009) gibi değişik ülkelerden rapor edilmiştir.

Türkiye’ de ise ilk olarak Diler ve diğ. 2002 yılında Ege Bölgesi’ ndeki bir alabalık işletmesindeki 100-150 gr ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarından *L. garvieae*’ yi izole ve identifiye ederek bu hastalığın görüldüğünü bildirmişlerdir. Daha sonraki yıllarda bu hastalığın kültür balıklarında ekonomik kayıplara neden olduğuna dair raporlar birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Altun ve diğ., 2004; Çağırgan, 2004; Özer ve diğ., 2008; Türe ve Savaş, 2010; Avcı ve diğ., 2010; Tanrıkul ve Gültepe, 2011).

2.3.2. Hastalığın Konakçıları

Lactococcosis’ in etkeni olan *L. garvieae* sarıkuyruk balıklarından (*Seriola quinqueradiata*) (Kusuda ve diğ., 1991), tilapia balıklarından (*Oreochromis niloticus*) (Evans, Klesius ve Shoemaker, 2009), Japon yılan balıklarından (*Anguilla japonica*) (Kusuda ve diğ., 1991), dere pisisi balığından (*Paralichthys olivaceous*) (Kim ve Lee., 1994), kefal balıklarından (*Mugil cephalus*) (Chen ve diğ., 2002), yayın balıklarından (Ravelo ve diğ., 2003), Adriyatik mersin balıklarından (*Acipenser naccarii*) (Salati ve diğ., 1996), kral balıklarından (*Seriola lalandi*), tatlı su karideslerinden (*Macrobrachium rosenbergii*) (Cheng ve Chen, 1998; Chen ve diğ., 2001), *Coris aygula*’ dan (Colorni ve diğ., 2003) son yıllarda yunuslardan (*Tursiops truncatus*) (Evans ve diğ., 2006) ve akuakültür ürünlerinden (ahtapot, kalamar vb.) (Wang ve diğ., 2007) izole edildiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra deniz suyu ve çamurdan da bu patojenin izole edildiğine dair raporlar mevcuttur (Kitao, Aoki ve Iwata, 1979; Colorni ve diğ., 2003).

Sazan balığının (*Cyprinus carpio*) bu hastalığa karşı dayanıklı olduğu (Eldar ve diğ., 1995) ancak alabalıklarda yüksek mortaliteye neden olduğundan dolayı alabalıkların ise hastalığa en duyarlı tür olduğu bildirilmiştir (Ghittino ve Muzquiz, 1998).

L. garvieae’ nin konakçıları akuatik türlerle sınırlı değildir. Etken inek, bufalo, kedi, köpek bademciğinden, kümes hayvanlarının etinden, et ürünlerinden ve süttten izole edilmiştir (Devriese ve diğ., 1999; Barakat ve diğ., 2000; Villani ve diğ., 2001; Rantsiou, 2005). Bazı durumlarda insanlardan da izole edildiği için potansiyel zoonotik ajan olarak kabul edilmektedir (Bascomb ve Manafi, 1998)

2.3.3. Etiyolojisi

Tatlı su ve deniz balıklarında hemorajik sepsis ile karakterize edilen bir hastalık olan lactococcosis' e neden olan *Lactococcus garvieae*, *Streptococcaceae* familyasının *Lactococcus* genusu içinde yer alan Gram pozitif kok bakteridir (Schleifer ve diğ., 1985; Holt ve diğ., 1994).

2.3.3.1. Taksonomi

Aerobik veya fakültatif özellik gösteren Gram pozitif kok bakteriler katalaz aktivitesi, hücre morfolojisi ve hücre düzenine göre *Streptococcaceae* ve *Micrococcaceae* olmak üzere iki familyaya ayrılmaktadır (Konemann, 1992; Kloos ve Bannerman, 1995). *Micrococcaceae* familyası üyeleri, *Streptococcaceae* familyası üyelerinden katalaz testi ile ayırt edilmektedir. Buna göre *Micrococcaceae* familyasının üyeleri katalaz pozitif reaksiyon verirken *Streptococcaceae* familyasının üyeleri katalaz testinde negatif sonuç vermektedir (Inglis, Roberts ve Bromage, 1993; Facklam ve Elliott, 1995). Tablo 2.1' de balık patojeni olan bazı Gram pozitif kok bakteri genuslarının hücre düzeni, sitokrom oksidaz ve katalaz testlerine ait reaksiyonlar verilmiştir.

Streptococcaceae familyasına ait genusların tanımlanmasında başlıca hücre morfolojisi (kok veya kokko-basil), hücre dizilimi (dörtlü veya zincir oluşumu), koloni büyüklüğü (büyük veya küçük), kanlı agarda hemoliz oluşumu ve antijenik yapısı kullanılmaktadır (Bascomb ve Manafi, 1998).

Hasta balıklardan izole edilen Gram pozitif, sitokrom oksidaz ve katalaz testi negatif olan, hareketsiz kok bakteriler *Streptococcaceae* familyasının *Streptococcus* (Plumb ve diğ., 1974; Booker ve diğ., 1979; Bragg ve Broere 1986; Kim ve Lee, 1994) *Enterococcus* (Kusuda ve diğ., 1991), *Vagococcus* (Walbanks ve diğ., 1990) ve *Lactococcus* (Williams ve diğ., 1990; Prieta ve diğ., 1993) genusları içinde yer almaktadır. Tablo 2. 2' de *Streptococcaceae* familyasına ait bu genusların ayırımında kullanılan biyokimyasal testler verilmiştir.

Lactococcosis' in etkeni *L. garvieae* olarak tanımlanmış ve edilinceye kadar önceleri *Enterococcus* sp. olarak tanımlanmıştır (Prieta ve diğ., 1993). Daha sonraki yıllarda

biyokimyasal özellikleri *Enterococcus seriolicida*' ya çok benzeyen *Lactococcus garvieae* (sinonim: *Enterococcus seriolacida*) olarak isimlendirilmiştir. (Teixeira ve diğ., 1996, Eldar ve diğ., 1996). Bu sınıflandırma tüm hücre proteinlerinin SDS - PAGE analizi (Pot ve diğ., 1996), fenotipik karakterizasyonu ve DNA –DNA hibrit çalışmaları (Eldar ve diğ., 1996) ile kesinlik kazanmış ve *Enterococcus seriolacida*, *L. garvieae*' nin sinonimi olarak tekrar sınıflandırılmıştır (Teixeira ve diğ., 1996; Eldar ve diğ., 1996).

Tablo 2. 1: Balık patojeni olan bazı Gram pozitif kok bakteri genuslarının hücre düzeni, sitokrom oksidaz ve katalaz testleri (Facklam ve Elliott, 1995)

Genus	Sitokrom oksidaz testi	Katalaz testi	Hücre Düzeni
<i>Staphylococcus</i>	+	+	Küme oluşturma
<i>Micrococcus</i>	+	+	Küme oluşturma
<i>Streptococcus</i>	–	–	Zincir oluşturma
<i>Enterococcus</i>	–	–	Zincir oluşturma
<i>Lactococcus</i>	–	–	Zincir oluşturma
<i>Vagococcus</i>	–	–	Zincir oluşturma
<i>Aerococcus</i>	–	– / w	İkili veya dörtlü gruplar oluşturma

(+): Pozitif reaksiyon

(-): Negatif reaksiyon

(w): Değişken reaksiyon

Tablo 2. 2: *Streptococcaceae* familyasına ait genusların ayırımında kullanılan testler (Facklam ve diğ., 1989; Facklam & Washington, 1991)

Biyokimyasal test	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>
10 °C' de üreme	-	+	+
45 °C' de üreme	V	+	-
% 6.5 NaCl' de üreme	-	+	V
PYR hidrolizi	- (3)	+	- (3)
Bile-eskulin reaksiyonu	- (4)	+	V
Grup D antijeni	-	V	-

PYR: L- pyrrolidonyl- β- naphthylamide

(1): *E. malodoratus* negatif (2): *E. pseudoavium* negatif (3): *S. pyogenes* ve *L. garvieae* pozitif (4): Bazı türlerinde istisna

(+): Pozitif reaksiyon

(-): Negatif reaksiyon

(V): Değişken reaksiyon

Lactococcus cinsinin 5 türü içerdiği ve bunlardan *L. garvieae*, *L. lactis subsp. lactis* ve *L. lactis subsp. cremoris* insanlarda ve hayvanlarda klinik olarak önemi olan türler olarak tanımlanmıştır (Aguirre ve Collins 1993). Balıklarda ise hastalığa neden olan *Lactococcus* türlerinin *L. garvieae* ve *L. piscium* olduğu bildirilmiştir (William ve diğ., 1990; Eldar ve diğ., 1996).

2.3.3.2. Morfolojik Özellikleri ve Hareket

Lactococcus in etkeni olan *Lactococcus garvieae* fakültatif anaerob, hareketsiz, 0.7 - 1.4 µm çapında, ovoid, sıvı besiyerlerinde kısa zincirler oluşturan, Gram pozitif bakteridir (Holt ve diğ., 1994; Buller, 2004).

2.3.3.3. Koloni Morfolojisi

Bu patojen TSA (Tryptic-Soy Agar), BHIA (Brain Heart Infusion Agar) gibi vasatlarda 20-25 °C sıcaklıkta 48-72 saat inkübe edildiğinde 1 mm çapında gri veya beyaz renkli yuvarlak koloniler meydana getirir (Holt ve diğ., 1994; Buller, 2004).

2.3.3.4. Biyokimyasal Karakteri

L. garvieae'nin identifikasyonun rutin biyokimyasal testlerle gerçekleştiği ancak biyokimyasal özelliklerinin suşa bağlı olarak değişebildiği bildirilmiştir (Cheng ve Chen, 1998). Tablo 2. 3' de *L. garvieae*'nin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri verilmiştir.

Avrupa, Asya ve Avusturalya'daki hasta balıklardan izole edilen *L. garvieae* suşlarının D- tagatoz ve süktroz asidifikasyonuna göre üç biyotipi tanımlanmış (Eldar ve diğ., 1999) daha sonraki yıllarda farklı ülke ve kaynaklardan izole edilen *L. garvieae* suşları arasında biyolojik çeşitliliğin olduğu; *L. garvieae*'nin sakkaroz, tagatoz, mannitol ve cyclodextrin asidifikasyonu ve pyroglutamic acid arylamidase (Pyra) ve β-glucosaminidase (β-Nag) enzimlerinin varlığına göre 13 farklı biyotipe sahip olduğu bildirilmiştir (Vela ve diğ., 2000).

Tablo 2. 3: *Lactococcus garvieae*' nin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri
(Romalde ve Toranzo, 2002; Diler ve diğ., 2002; Austin ve Austin, 2007)

Özellikler	<i>L. garvieae</i>	Özellikler	<i>L. garvieae</i>
Hücre morfolojisi	Ovoid	Arjinin Dekarboksilazı	+
Gram Boyama	+	Ornitrin Dekarboksilazı	-
Hareket	-	Lizin Dekarboksilazı	-
4 °C' de üreme	+	Gliserol	-
20 °C' de üreme	+	Rafinoz	-
37 °C' de üreme	+	Arabinoz	-
45 °C' de üreme	+	Sorbitol	+
pH 9.6'da üreme	+	Mannitol	+
% 6.5 NaCl üreme	+	Sellobiyoz	+
Hemoliz	D	Galaktoz	+
Sitokrom Oksidaz varlığı	-	Maltoz	+
Katalaz Varlığı	-	Trehaloz	+
O/F	F	Laktoz	+
Nitrat Üretimi	-	Riboz	v
Sitrat vasatında üreme	-	Sükroz	v
Üre	-	Nişasta	-
İndol Üretimi	-	Tagatoz	v
Eskulin Hidrolizi	+	Salisin	+
Voges-Proskauer	+	İnositol	-
H ₂ S Üretimi	-	Metil Kırmızısı Testi	+

(+): Pozitif reaksiyon

(-) : Negatif reaksiyon

(F): Fermentatif

(V): Değişken reaksiyon

(D): Değişken α - hemolitik (Ravelo ve diğ., 2001), β hemolitik (Teixeira ve diğ., 1996)

2.3.3.5. Üreme İhtiyacı

L. garvieae 4 - 45 °C' deki ortamda; % 40 safra, % 0. 1 metilen mavisi sütü içeren pH'sı 9.6 olan ve % 6. 5 sodyum klorür içeren vasatta büyür (Eldar ve diğ.,1999). BHIA (Austin ve Austin, 2007), TSA (Austin ve Austin, 2007), Trypticase-Soy Broth (TSB), Bile (safra) Esculine Agar (BEA) (Toranzo ve diğ., 1994) ve % 5 koyun kanı içeren Columbia Agar (GIBCO) (Eldar ve diğ., 1996) gibi zengin vasatlarda 22 °C' de 48 saatlik inkübasyon sonucunda hızla üretildiği (Austin ve Austin, 2007) ancak yapılan bazı çalışmalarda kültür ortamının parametrelerinin bakteriyel enzim ve toksinlerin üretilmesiyle; patojenin üremesini etkilediği bildirilmiştir (Arp, 1988). TSA vasatına 1.5 mg^l-1 de nitrit-N ilave edildiğinde *L. garvieae*' nin üreme oranında önemli derecede azalma olduğu rapor edilmiştir (Chen ve diğ., 2002).

Buller (2004) *Lactococcus* genusunun üyeleri için % 5 koyun kanı içeren agar besiyerinin kullanılabileceğini bildirilmiştir. Ancak *L. garvieae*' yi bazı araştırmacılar α - hemolitik (Ravelo ve diğ., 2001) olarak bazı araştırmacılar ise β - hemolitik (Teixeira ve diğ., 1996) olarak tanımlamışlardır.

2.3.4. Hastalığın Çıkışı ve Yayılışı

Hastalığın çıkışı, balığın içinde bulunduğu çevresel koşullara, özellikle suyun mikrobiyolojik kalitesine ve sıcaklığına bağlıdır. Muzquiz ve diğ. (1999) su sıcaklığının 15 °C' nin üstünde olduğunda *L. garvieae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae* ve *Streptococcus difficilis* gibi balık patojenlerinin neden olduğu hastalıkların görüldüğünü bildirmiştir. Yüksek oranda organik materyal içeren deniz suyunda bulunan *L. garvieae* yılın en sıcak aylarında çevresel stres faktörlerine bağlı olarak kültür balıklarında hastalık çıkışına neden olmaktadır (Ghittino, 1996; Kusuda ve Salati, 1999). Bunun yanı sıra aşırı amonyum konsantrasyonu (Hurvitz ve diğ., 1997) ve oksijen yetersizliğinin de (Fukuda ve diğ., 1997) mortalitede artışa neden olduğu bildirilmiştir.

Hastalığın taşınması başlıca horizontal olarak gerçekleşmektedir. Fekal yolla veya balıklarda lezyonlar olduğunda hastalığın aynı havuzda yaşayan balıklar arasında direk olarak bulaşmasında büyük önem taşımaktadır (Afonso, Silva ve Gomes, 2003). Ayrıca etkenin taşıyıcısı olduğu düşünüldüğünden dolayı yabani balıkçıl kuşların işletmeye girişinin önlenmesi gerektiği bildirilmiştir (Romalde, 2004).

Asemptomik vakaların, bağırsak florasında bakteriyi taşıdıkları için enfeksiyonun ana kaynağını oluşturduğu (Wendrell ve diğ., 2006) ayrıca kontamine su ile hastalığın yayıldığı düşünülmektedir (Muzquiz ve diğ., 1999; Vela ve diğ., 2000).

Savvidis ve diğ. (2007) daha önce yaz aylarında enfeksiyonun gözlendiği bir alabalık çiftliğinden kış ayları içerisinde yapmış olduğu örneklemelerde klinik ve patolojik olarak lactococcosis belirtisi olmayan balıklardan *L. garvieae*' yi sadece endoptalmik sıvıdan izole etmişlerdir. Bu nedenle gözlerin kış ayları boyunca mikroorganizmanın yerleştiği organ olduğu düşünülmektedir.

Özellikle market büyüklüğündeki kültür balıklarında yüksek mortaliteye neden olmasından dolayı ekonomik açıdan hastalık çıkışının büyük önem teşkil ettiği, hastalığın teşhisi ve çıkışı ile ilgili önlemlerin alınması gerektiği bildirilmiştir (Vendrell ve diğ., 2006).

2.3.5. Hastalığın Klinik ve Otopsi Bulguları

Kültür balıklarında ekonomik kayıplara neden olan lactococcosis hemorajik septisemi ve meningoencephalitis ile karakterize edilmektedir (Kusuda ve diğ., 1991; Carson, Gudkovs ve Austin, 1993; Eldar ve diğ., 1996; Bercovier ve diğ., 1997; Eldar ve diğ., 1999).

Birçok balık türünde denge kaybı ve düzensiz yüzme gibi davranışsal bozuklukların görüldüğü, en çok zarar gören organın ise göz olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Buna göre intraoküler hemoroji, gözün bulutlanmasıyla birlikte tek veya çift taraflı ekzoftalmus arasına göz kaybının olduğu rapor edilmiştir (Carson ve diğ., 1993; Carson ve Statham, 1993; Nieto ve diğ., 1995; Eldar ve diğ., 1996; Altun ve diğ., 2005; Savvidis ve diğ., 2007; Soltani ve diğ., 2008; Kav ve Erganis, 2008, Sharifiyazdi ve diğ., 2010). Ayrıca hasta balıklarda anorexia, letarji, renkte koyulaşma ve operkula ile anüs etrafında hemorajilerin görüldüğü bildirilmiştir (Kusuda ve diğ., 1991; Eldar ve diğ., 1994; Eldar ve Ghittino, 1999; Chen ve diğ., 2002; Yanong ve Francis-Floyd, 2002). İnternal olarak abdominal boşlukta ve bağırsak lümeninde hemorajik bir sıvının görüldüğü, karaciğerin solgun bir renk aldığı, splenomegali ve bağırsağın hiperemik olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Kusuda ve diğ., 1991; Carson ve diğ., 1993; Eldar ve diğ., 1996; Muzquiz ve diğ., 1999; Eldar ve diğ., 1999; Soltani ve diğ., 2008).

Enfekte gümüşü altın balıklarında (*Notemigonus crysoleucas*) internal hastalık belirtilerinin görülmemesine karşın vücut yüzeyinde lezyonların olduğu bildirilmiştir. (Robinson ve Meyer, 1966). Sarı kuyruk balıklarında (*Seriola quinqueradiata*) ise bu patojenin karaciğer, dalak ve böbreğe zarar verdiği, peritonal boşlukta ise asidik bir sıvının biriktiği bildirilmiştir (Kusuda ve diğ., 1976a). Deniz balıklarında enteritis, karaciğerin renginin solgun olduğu, peritonal boşlukta kanama olmasına rağmen görünüşte böbreği etkilemediği bildirilmiştir (Plumb ve diğ., 1974). Kültürü yapılan

yılan balıklarının ventral vücut yüzeyi boyunca hemorajilerin olduğu rapor edilmiştir (Kusuda ve Komatsu, 1978).

Gökkuşığı alabalıklarında hastalık aniden başladığı için lactococcosis tüm vücudu etkileyen hiperakut hastalık olarak tanımlanmaktadır (Eldar ve Ghittino, 1999). *L. garvieae* ile enfekte olmuş gökkuşığı alabalıklarında eksternal olarak çift ekzozalmus ve korneada opaklaşma, deride hiper pigmentasyon, yüzgeç tabanında hemorajiler, bağırsak ve midede temiz bir sıvı birikimi nedeniyle abdomen genişlemesi; internal olarak ise karaciğerin açık sarı bir renk aldığı, dalağın büyüdüğü (splenomegali), hiperemik olan sindirim kanalının jelatinöz bir sıvı içerdiği, karaciğer, dalak, böbrek, yüzme kesesi ve bağırsak gibi viseral organlarda yoğun hemorajilerin görüldüğü bildirilmiştir (Kusuda ve Salati, 1999; Altun ve diğ., 2005).

Enfekte kalkan balıklarında (*S. maximus*) eksternal olarak tek veya çift ekzozalmusla birlikte göz kaybının olduğu, dorsal ve anal yüzgeçlerin tabanında olduğu gibi periorbital dokularda iltihaplı bir sıvının biriktiği, solungaçların solgun ve anemik olduğu internal olarak abdominal boşlukta purulent bir sıvının bulunduğu, periton ve epikardiyumda sarımsı renkte bir eksudatın bulunduğu ayrıca kasların hemorajik olduğu bildirilmiştir (Nieto ve diğ., 1995).

L. garvieae ile enfekte tatlı su karideslerinde (*M. rosenbergii*) anoreksia, büyümede yavaşlama ve vücut renginin beyazlaştığı gözlenmiştir (Cheng ve Chen, 1998). Kaslarda 0.5- 2 cm çapında yeşilimsi beyaz renkli nekrotik bölgelerin oluşması ve hepatopankreas'ın sarımsı renkte ve şişkin olması tatlı su karideslerinde görülen en belirgin patolojik değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Chen ve diğ., 2001).

2.3.6. Histopatolojik Bulgular

L. garvieae ile enfekte gökkuşığı alabalıklarında önemli patolojik bulguların karaciğer, böbrek, dalak, mide ve solungaçlarda görüldüğü bildirilmiştir. Karaciğerde peteşiyal hemorajik odaklar, hiperemi, hepatositlerde mikrovessiküler değişiklikler; böbrek venalarında genişleme, tübüler epitelyumda nekroz; dalakta hemorajik odaklar ve nekroz; solungaçlarda epiteliyal hipertrofi ve solungaç lamelalarında erime; mide

bezlerinin mukozal epitelyumunda ayrılmaların olduğu ayrıca solungaç ve midede eozinofilik granüler hücrelerin bulunduğu bildirilmiştir (Altun ve diğ., 2005).

Alabalıklarda enteritis, viseral organların hiperemik ve hemorajik olduğu ayrıca beynin yüzeyinde eksudat birikimi ile akut menenjitin olduğu bildirilmiştir. Eksudat içinde Gram pozitif kok kolonilerinin Virchoff' s alanı içinde ve meningeal yüzey üzerinde geniş bir şekilde dağıldığı ayrıca bu bulguların letarji ve denge kaybı gibi klinik belirtilerle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Eldar ve Ghittino, 1999).

Enfekte kalkan balıklarında solungaçlarda sekonder lamella ve interlamellar alandaki sinüs venosuslarda çok sayıda nötrofilin bulunduğu, göz ve periorbital adipoz dokularda ödem, hemoroji ve nötrofil infiltrasyonunun olduğu, dalakta nekroz, böbreklerde interstitial makrofaj ve haemopoietik dokularda nekroz odakları, beyinde suppurative menenjit, vestriculitis ve beyin damarlarında hiperemi; hepatositlerde yağ dejenerasyonu ve vakuolizasyon, iskelet ve kalp kasında ödem ve hemoroji; gastrointestinal kanalda kataral entritisin gözlemlendiği bildirilmiştir (Nieto ve diğ., 1995).

L. garvieae ile enfekte olan tatlı su karideslerinde (*M. rosenbergii*) epidermis ve kas dokusu arasında sıvı birikimi ve erime nekrozu ile kas demetlerinin parçalandığı bildirilmiştir (Gomes ve diğ., 2006).

2.3.7. Hastalığın Teşhisinde Kullanılan Yöntemler

2.3.7.1. Serolojik Teknikler

Lactococcosis' in teşhisinde en çok kullanılan serolojik test *L. garvieae*' nin saf kültürünün antijen olarak kullanıldığı lam aglütinasyon tekniğinin (Eldar ve diğ., 1995) yanı sıra karma kültürlerde etkenin bulunması için Floresan Antikor Tekniği (FAT) (Kawahara ve Kusuda, 1987) ve son yıllarda flov sitometre tekniği kullanılmaktadır (Endo ve diğ., 1998).

Kang ve diğ. (2004) siyah kaya balıklarında (*Sebastes schlegeli*) *L. garvieae*' nin varlığını FAT tekniği ile göstermiş ayrıca *L. garvieae*' yi fenotipik açıdan karakterize etmek için (kapsüllü veya kapsülsüz) aglütinasyon testini kullanmışlardır.

Savvidis ve diğ. (2007) farklı *Streptococcus* antiserumları ile aglütinasyon testini gerçekleştirmiş buna göre *L. garvieae* populasyonunun iki gruba ayrıldığını birinci grubun İtalya ve İsrail serotip 1 izolatlarını kapsadığını, ikinci grubun ise İspanya, Yunanistan ve Bulgaristan serotip 2 kapsüllü izolatlar olduğunu bildirmiştir.

Diler ve diğ. (2002) *L. garvieae* izolatlarının identifikasyonunda latex aglütinasyon tekniğini kullanmıştır. Çağırğan (2004) Türkiye’deki alabalık işletmelerinden izole edilen *L. garvieae* suşlarının serolojik özelliklerini kapsül oluşumu yönünden incelemiştir.

2.3.7.2. Moleküler Teknikler

Zlotkin ve diğ. (1998) farklı orijinli *L. garvieae* izolatlarının identifikasyonunda 16 S r DNA genindeki spesifik primerlere (pLG-1: 5’-CATAACAATGAGAATCGC-3’, pLG-1 (5’-GCACCCTCGCGGGTTG-3’) dayalı Polymerase Chain Reaction (PCR) tekniğini kullanmıştır. Hasta balıklarından elde edilen 1 µl plazmanın kullanıldığı bu moleküler çalışmada 35 *L. garvieae* suşunun 1,100 bp amplifikasyon ürününü verdiğini bildirmişlerdir. Günümüzde ise PCR tekniği *L. garvieae*’nin identifikasyonunu doğrulamak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Ravelo ve diğ., 2003; Colorni ve diğ., 2003; Savvidis ve diğ., 2007; Soltani ve diğ., 2008; Abdelsalam ve diğ., 2009).

Farklı kaynak (mastitisli sığırlar ve kültür balıkları) ve coğrafi alanlardan (Japonya, İspanya, Portekiz, İtalya, İngiltere, Fransa ve Türkiye) izole edilmiş *L. garvieae*’nin genetik çeşitliliğini göstermek için Random Amplified Polimorphic (RAPD) tekniği kullanılmıştır. Rastgele seçilmiş iki primere dayalı olan bu tekniğe göre 57 *L. garvieae* suşu 3 genetik gruba ayrılmıştır. Türkiye, İspanya, Portekiz ve İngiltere suşlarının grup A, İtalya ve Fransa suşlarının grup B ve Japon suşlarının grup C olduğu bildirilmiştir (Ravelo ve diğ., 2003).

Hussein ve Hatai (2006) Japonya’da kültürü yapılan sarıkuyruk balıklarında karma enfeksiyona neden olan *L. garvieae*, *S. iniae* ve *S. dysgalactiae* gibi Gram pozitif patojen bakterilerin identifikasyonunda multipleks PCR tekniğini kullanmıştır. Düşük dozlarda (3×10^2 cfu/ml) deneysel olarak enfekte ettikleri alabalık dokularının

kullanıldığı bu teknikte 1,100- 870- 259 bp amplifikasyon ürünü veren *L. garvieae*, *S. iniae* ve *S. dysgalactiae*' nin identifikasyonu yapılmıştır.

2.3.7.3.Hızlı Tanı Kitlerinin Kullanımı

Ticari bakteriyel identifikasyon sistemi olan Biolog Microlog kiti *L. garvieae* izolatlarının identifikasyonunda konfirmasyon amacıyla kullanılmaktadır. Bu kit ile *L. garvieae*' nin identifikasyonunun yapılabileceği ve polimeraz zincir reaksiyonuna alternatif bir teknik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Evans, Klesius ve Shoemaker, 2009).

19 adet enzimatik ve biyokimyasal testi içeren Rapid ID 32 STREP sistemleri 4 veya 24 saat içinde *Streptococcus* türlerinin identifikasyonunu sağlayan ticari kitler olarak bilinmektedir (Poutrel ve Ryniewicz, 1984; Watts ve Yancey, 1994). Bu kit ilk olarak mastitisli sığırlardan izole edilen *Streptococcus* türlerinin identifikasyonunda kullanılmıştır (Poutrel ve Ryniewicz, 1984). *L. garvieae*' nin identifikasyonda kullanılan sistemlere bağlı olarak riboz testinde farklı sonuçlar verdiği bildirilmiştir. API 50 CH sistemleri kullanıldığında riboz testi pozitif reaksiyon verirken API Rapid ID 32 Strep sistemleri kullanıldığında negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (Vela ve diğ., 2000). BA (Blood Agar) besiyerinden hazırlanan inokulumun optik yoğunluğu 580 nm de 0. 8' e ayarlandıktan sonra kullanılan Rapid ID 32 STREP kitinde beta-galaktosidaz, hippurat, beta-mannoz, melezitozdan ve pullulandan asit üretimi gibi biyokimyasal testlerinde küçük değişikliklerin görülebileceği bildirilmiştir (Ravelo ve diğ., 2001).

Günümüzde lactococcosis' in teşhisinde hızlı tanı kitleri olan API 20 STREP, Rapid ID 32 STREP ve API 50 CH birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır (Eldar ve diğ. 1999; Diler ve diğ., 2002; Çağırgan, 2004; Kang ve diğ., 2004; Abdelsalam ve diğ., 2009; Tanrıkul ve Gültepe, 2011).

Enzim belirleyici bir kit olan API ZYM kiti biyolojik sıvı veya bakteri inokulumlarından patojen α - hemolitik *Streptococcus* üyelerinin identifikasyonu için tek bir substrat ile spesifik enzimlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Waitkins, Ball ve Fraser, 1980; Baeck ve diğ., 2006).

Toranzo ve diğ. (1995) kalkan balıklarından izole ettikleri *Enterococcus* suşları ile Gram pozitif balık patojenlerini antijenik yapı bakımından karşılaştırmak için ticari streptokokal serotiplendirme kitlerini kullanmıştır. Ticari streptokokal gruplama kitinin kalkan balıklarından izole edilen *Enterococcus* türleri ile reaksiyon vermediği ancak *Carnobacterium* suşları ve *Enterococcus faecalis*' in D grubunun streptokok gibi davrandığını bu nedenle bu kitlerin memelilerdeki klinik izolatların serotiplendirilmesinde kullanılabileceğini, hasta balıklardan izole edilen *Enterococcus* ve *Streptococcus* suşlarının serotiplendirilmesinde ise kullanımının uygun olmadığı bildirilmiştir.

2.3.8. Hastalığın Kontrolü

Bu hastalığın tedavisindeki zorluk nedeniyle hastalık çıkışını önleyecek tedbirlerin alınması özellikle hasta balıkların işletmeye sokulmaması, hasta olan balıkların toplanıp imha edilmesi, ekipmanların devamlı olarak dezenfekte edilmesi ve iyi yetiştiricilik koşulları sağlaması gerektiği bildirilmiştir (Savvidis ve diğ., 2007). Ayrıca kimyasal ve mikrobiyolojik analiz ile yemlemenin kontrol altında tutulmasının çok önemli olduğu, *L. garvieae*' nin yemden izole edildiği ve dondurulmuş ürünlerde 6 ay yaşayabildiğine dair rapor mevcuttur (Yasunaga, 1982).

Fizikokimyasal parametrelerin kontrolü *L. garvieae*' nin neden olduğu enfeksiyonlarda oldukça önemlidir. Su sıcaklığı 15 °C' nin üstüne çıktığında hastalık çıkışları görülmektedir. Sudaki amonyum konsantrasyonu yüksek seviyeye ulaştığında kültür tankında düşük oksijenin yüksek virülense yol açtığı bildirilmiştir (Fukuda ve diğ., 1997; Hurvitz ve diğ., 1997).

Son yıllarda gökkuşağı alabalıklarında lactococcosis ve streptococcosis tedavisinde probiyotiklerin kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Gökkuşağı alabalıklarının sindirim kanalından izole edilen *Aeromonas sobria* kültürü 5×10^7 hücre/gr⁻¹ yeme ilave edilmiş ve ortalama 20 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalıkları 14 gün boyunca bu yem ile beslenmiştir. Sonuç olarak probiyotikle muamele edilmemiş yemle beslenen alabalıklar *L. garvieae* ve *Streptococcus iniae* ile intraperitoneal olarak enfekte edildiğinde mortalitenin %75 - 100 olduğu ancak probiyotikle muamele edilen yemle beslenen balıklarda mortalitenin % 0 - 6 olduğu bildirilmiştir (Brunt ve Austin, 2005).

Bir diğ er çalışmada ise *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactobacillus plantarum* gibi probiyotik suşlar 10^7 cfu /gr⁻¹ yeme ilave edilerek 30 gün yemlenen gökkuşağı alabalıklarında probiyotikle muamele edilmemiş yemle beslenen alabalıklarda mortalitenin % 78 ancak probiyotikle muamele edilen yemle beslenen balıklarda mortalitenin % 46 - 54 olduğu bildirilmiştir (Vendrell ve diğ., 2006).

Rattanachaikunsopon ve Phumkhachorn (2009), *L. garvieae* ile deneysel olarak enfekte edilen tilapia balıklarının enjeksiyondan 5 gün önce oxytetracycline ve karanfil yağı (% 3) içeren yemlerle beslendiğinde mortalitenin olmadığını, karanfil yağının deneysel olarak oluşturulan *L. garvieae* enfeksiyonlarında koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Geçmiş yıllarda antibiyotikler kültür balıklarında *Streptococcus* genusundaki mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların kontrolünde etkili bir metot olarak kullanılmış (Robinson ve Meyer, 1966; Kitao, 1982a) buna rağmen bu maddelerin gelişi güzel seçilmesi mikroorganizmalarda antibiyotik direncinin artmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Vendrell ve diğ., 2006).

Gökkuşağı alabalıklarında görülen lactococcosis' in tedavisinde erytromycine, oxytetracycline, amoxicillin ve düşük dozda doxycycline kullanılmaktadır. Narasin en etkili antibiyotik olmasına rağmen sadece *in vitro* koşullardaki etkileri ispat edilmiştir (Carson ve Statham, 1993).

Farklı coğrafik orijinli *L. garvieae* suşlarının enrofloxacyne ve nitrofurantoina duyarlı, oxolinic asit ve sulphametoxazol-trimethoprima dirençli olduğu ancak sonuçların erytromycine, chloramphenicol, oxytetracycline ve ampicillin bakımından farklı olduğu bildirilmiştir (Ravelo ve diğ., 2001). Türkiye' de gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *L. garvieae* suşlarının erytromycine, ofloxacin, ampicillin ve chloramphenicol duyarlı olduğu penicillin ve clindamycine karşı ise dirençli olduğu bildirilmiştir (Diler ve diğ., 2002; Kubilay ve diğ., 2005; Kav ve Erganis, 2008). Kav ve Erganis (2008) penicillin türevi olan beta-laktam antibiyotiklerinin lactococcosis' in tedavisinde kullanılması gerektiğini rapor etmişlerdir. Kum ve diğ. (2004) *L. garvieae* ile deneysel olarak

yaptıkları tedavi çalışmasında ampicillin, erythromycine, oxytetracycline ve amoxicillinin daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Erytromycine 25 mg/ kg balık /gün dozunda 4 ile 7 gün süreyle kullanımı ile sarıkuyruk balıklarında streptococcosis 'in kontrol altına alındığı (Kitao, 1982b) ve oxytetracycline ve ampicillinden, daha etkili olduğu bildirilmiştir (Shiomitsu ve diğ., 1980). Doxycycline 20 mg/lt balık ağırlığı/gün (Nakamura, 1982) ve josamycin 30 mg/kg balık ağırlığı gün olarak 3 gün destekleyici olduğu (Kusuda ve Takemaru, 1987; Takemaru ve Kusuda, 1988) ve terepatik olarak sodium nifursytrenate 50 mg/kg balık ağırlığı /gün olarak streptococcosis için kullanıldığı (Kashiwagi ve diğ., 1977a), ayrıca bu ilacın etkili olduğu ve plazmidlere ait bir direnç probleminin olmadığı da bildirilmiştir. Buna rağmen erythromycin, lincomycin ve oxytetracycline' nin Japonya' daki *L. garvieae* izolatlarında direnç oluşturduğuna dair rapor mevcuttur (Kawanishi ve diğ., 2005).

Re-enfeksiyon ve patojenin direnç kazanmasından dolayı hastalığın tedavisi kemoterapik ilaçların kullanımında başarı sağlanamadığı bu nedenle hastalığa karşı uygun olan antijen karakterini belirleyerek yapılan aşılarda kullanılması gerektiği (Ghittino ve Prearo, 1992) ayrıca aşılama için balık ağırlığının 50 gram ve su sıcaklığının 12 - 14 °C olması gerektiği bildirilmiştir (Ghittino ve Muizquiz, 1998).

Formalinle inaktive edilmiş *L. garvieae* ile immunize edilen sarıkuyruk balıklarında artan opsonik aktivite ile korumanın sağlandığı bildirilmiştir (Sato ve diğ., 1996). Ancak yapılan bu çalışmada patojenin fenotipik etkisi açısından immunizasyon değerlendirilmemiştir.

Ooyama ve diğ. (1999) formalin ile inaktive edilmiş fenotipik açıdan kapsül içeren (KG– fenotipli) ve kapsül içermeyen (KG+ fenotipli) *L. garvieae* bakterini ile sarıkuyruk balıklarını (*Seriola quinqueradiata*) aşılamıştır. Yapılan bu çalışmada kapsül içermeyen *L. garvieae* suşu ile oluşturulan deneysel enfeksiyon sonucuna göre KG (+) fenotipli hücrelere karşı uzun süreli koruma sağladığı ancak KG (-) fenotipli hücrelere karşı düşük aglütinasyon titresinin olduğu bildirilmiştir. Bu sonuca göre KG (-) fenotipli hücrelerdeki kapsül varlığının onların immunogeneteğini etkilediği ama lactococcosis' e karşı balıkta korumayı sağlayan antijenlerin KG (-) fenotipe sahip

hücrelerin kapsülünde değil KG (+) fenotipli hücrelerinin yüzeyinde lokalize olabileceği bildirilmiştir.

Son yıllarda farklı mineral yağları içeren adjuvantlı aşılar geliştirilmiştir. Laboratuarda ve saha koşullarında anestezi uygulanmış balıklara intraperitoneal yolla uygulanmış bu aşılarda tam korumanın bakterin ile aşılanan balıklarda aşılama 3 hafta sonra olduğu, yağ- adjuvantlı aşılarda aşılanmış balıklarda aşılama 4 - 5 hafta sonra olduğu bildirilmiştir. Ayrıca koruma etkisinin sadece bakterin içeren aşılarda 3 - 4 ay , adjuvantlı aşılarda 4 - 5 ay olduğunda rapor edilmiştir (Ghittino, 1999; Vendrell ve diğ., 2004).

Ravelo ve diğ. (2006) *L. garvieae*' ye karşı bakterinlerle hazırlanan aşı formülasyonlarında farklı adjuvantların etkilerini çalışmışlardır. Sulu ve mineral yağ içermeyen adjuvantlı aşılarda aşılanan gökkuşağı alabalıklarında immunizasyondan 4 hafta sonra korumanın gerçekleştiğini, Montanide- IMS- 2212 (immunostimülant içeren su bazlı nanopartiküller) ve Carbomer (yüksek molekül ağırlığına sahip poliakrilik asit organik polimer) adjuvantlarını içeren aşılardaki koruma oranının % 45. 7 ve % 56. 5 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada Aquamun adjuvantlı- aşılarda sağlanan koruma süreci ile sıvı bakterinli aşılar karşılaştırılarak çalışılmıştır. Aşılama 3 ay sonra sıvı bakterin ile aşılanmış balıklarda hayatta kalma oranı % 40 olarak saptanırken, Aquamun adjuvantlı- aşılarda aşılanan balıklarda ise bu oranının % 92 olduğu bildirilmiştir.

Altun ve diğ. (2007) *L. garvieae*' nin 9 suşunun SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ve Western Blotting analizlerini yaparak iyi bir immuniteye sahip M 1 suşunu deneysel aşı çalışmalarında kullanmışlardır. Diğer suşların 66, 52, 46 ve 40 kDa ortak antijenik yapılar içermesine rağmen M1 nolu suşun diğer izolatlardan farklı olarak 30 - 37 kDa' luk bantları içerdiğini tespit etmişlerdir. % 0.7 formaldehit ile inaktive ederek hazırlanan bakterinin gökkuşağı alabalıklarına intraperitoneal enjeksiyonu ile aşılama yapmışlardır. Aşılama sonrasında hayatta kalma oranının (RPS) bakterinli grupta % 87. 5, bakterin + FIA (Freund Incomplete Adjuvant) grupta ise % 100 olduğunu bildirmişlerdir. RPS ve mikroaglutinasyon sonuçlarına göre M 1 suşundan hazırlanan aşının iyi bir immunizasyon sağladığı saptanmıştır.

Kav 2005 yılında RAPD-PCR ve SDS-PAGE yöntemi ile Konya ve çevresindeki alabalık çiftliklerinden izole ettiği *L. garvieae* suşlarının protein analizleri ile belirlediği en yaygın izolatlar arasından bir patojen suş seçerek bu suşdan (ST-21) hazırladığı bakterin aşısı ile alabalıklara farklı uygulamalarla (banyo, enjeksiyon, oral ve yem içerisinde) verilerek aşılarda kontrol grubuna karşı etkinliği incelemiştir. Uygulanan aşı yöntemlerinden (daldırma aşısı, hiper ozmotik daldırma aşısı, intraperitoneal enjeksiyon aşısı, yeme kitozan mikroküre ile hazırlanan aşı ilavesi, yeme kitozan boncuk ile hazırlanan aşı ilavesi ve yeme bakterin aşısı ilavesi) hyperozmatik aşı ve intraperitoneal enjeksiyon aşısı uygulamalarının en uygun aşılama metotları olduğu bildirilmiştir.

2.3.9. *Lactococcus garvieae*' nin Diğer Patojen Kok Bakterilerden Ayırt Edici Özellikleri

Balık patojeni olan *Streptococcus iniae* *Streptococcus* türlerinden nişasta hidrolizi testi ile ayrılır. *S. iniae* nişasta testinde pozitif reaksiyon verirken, diğer *Streptococcus* türleri negatif reaksiyon verir. *S. iniae* 45 °C' de ve p H 9,6 üreme yeteneğine sahip değildir ve Voges- Proskauer testi negatif olup bu özellikleri ile *L. garvieae*' den kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Roberts, 2001). *L. garvieae*' nin 45 °C' de ve pH 9,6' da büyümesi ile *Enterococcus* üyelerinden de ayrıldığı bildirilmiştir (Holt ve diğ., 1994).

Yaz aylarında su sıcaklığının artmasıyla kültür balıklarında karma enfeksiyona neden olan Lancefield grup C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *gysgalactiae* (GCSD) ve *L. garvieae*' nin birbirinden ayırt edilmesi için 30 µg /ml⁻¹ Congo red boyası içeren Todd Hewitt Agar (TH- CR) besiyerinde turuncu renkli koloni oluşturan GCSD' nin, beyaz koloni oluşturan *L. garvieae* kolonilerinden kolaylıkla ayrılabilmesi bildirilmiştir (Abdelsalam ve diğ., 2009).

Farklı orijinli *L. garvieae* izolatlarının identifikasyonunda 16S rDNA genindeki spesifik primerlere (pLG-1:5'-CATAACAATGAGAATCGC-3', pLG-1 (5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3') dayalı PCR tekniği kullanıldığında 35 *L. garvieae* suşunun 1,100 bp amplifikasyon ürününü verdiğini ancak fenotipik açıdan *L. garvieae*' ye çok benzeyen *L. lactis*' in bu testte negatif sonuç vermesi nedeniyle PCR ile bu iki *Lactococcus* türünün ayırt edilebileceği bildirmişlerdir (Zlotkin ve diğ., 1998).

Tablo 2. 4: Bazı *Lactococcus* türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler
(Holt ve diğ., 1994)

<i>Lactococcus</i> Türleri	40°C	% 4 NaCl	Arjinin hidrolizi	Laltozdan asit üretimi	Mannitolden asit üretimi	Raffinozdan asit üretimi	PYR
<i>L. garvieae</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>L. lactis subsp. cremoris</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>L. lactis subsp. hordniae</i>	-	-	+	-	-	-	-
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. piscium</i>	-	v	-	+	+	+	v
<i>L. plantarum</i>	-	+	-	-	+	-	-
<i>L. raffinolactis</i>	-	-	-	+	v	+	-

(+): Pozitif reaksiyon

(-): Negatif reaksiyon

(V): Değişken reaksiyon

PYR: Pyrrolidonylarylamidase

L. garvieae ve *L. lactis* ssp. *lactis* türlerinin ayırımında TSA veya kanlı agar gibi besiyerlerinde 2 µg clindamycine diski ile yapılan antibiyogram testinde *L. garvieae*'nin clindamycin' e dirençli; *L. lactis* ise bu antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir (Elliot ve Facklam, 1996). Ancak iki tür arasında ayırımı sağlayan bu metot son yıllarda Colorni ve diğ. (2003) tarafından hasta yabani güneş balığından (*Coris aygula*) izole edilen *L. garvieae*'nin clindamycine duyarlı olduğu ve 22- 23 mm' lik bir zon oluşturduğu bildirilmiştir. Türkiye, İspanya, İtalya, Fransa ve İngiltere' deki gökkuşağı alabalıklarından, İtalya' daki kanal kedi balıklarından ve mastitisli sığırlardan izole edilen *L.garvieae* izolatlarının clindamycine dirençli olduğu halde Japonya' da sarı kuyruk balıklarından izole edilen *L. garvieae* izolatlarının duyarlı olduğu bildirilmiştir (Colorni ve diğ., 2003). Tablo 2. 4' de bazı *Lactococcus* türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler verilmiştir.

2.4. BALIKLARDA İMMÜNİTE

İmmunoloji, enfeksiyöz hastalıklara karşı canlının savunma mekanizmasının çalışmasını inceleyen bilim dalıdır. Savunma mekanizması spesifik ve spesifik olmayan savunma mekanizması olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Tüm canlılarda bulunan spesifik olmayan savunma mekanizmasında enfeksiyöz ajanlardan talk pudrası gibi inorganik tahriş edicilere kadar değişen çok farklı uyarıcı çeşitliliği ile immün yanıt oluşturulur. Spesifik immün sistem sadece omurgalılarda bulunur. Spesifik yanıt uyarıcının moleküler yapısına karşı direk oluşmaktadır. Spesifik immün hafıza, lenfoid sistemdeki kazanılmış değişikliği kapsamaktadır. Spesifik immün yanıt oluşturma yeteneğine sahip moleküller antijen olarak tanımlanmaktadır. Genellikle tüm protein molekülleri hatta mikroorganizmalar antijen olarak tanımlanırlar ancak çok farklı alanlara sahip büyük moleküller farklı özellikleri ile antikorlara bağlanırlar. Bu alanlar antijenik determinant alanları veya epitop olarak isimlendirilir (Ellis, 2001).

Savunma mekanizması spesifik ve spesifik olmayan grup olarak karakterize edilmekle birlikte bu mekanizma enfeksiyon süreci boyunca meydana gelen olayların kronolojisi ile ilgili ilişkiyi anlamak açısından önemlidir. Savunma mekanizmasının ilk basamağı tüm spesifik olmayan faktörleri içermesine rağmen bu faktörlerin aktiviteleri ve miktarları enfeksiyon boyunca değişebilir. Lenfoid sistemde kazanılmış değişiklikleri gerektiren spesifik immün mekanizma savunma mekanizmasının ikinci basamağını oluşturur (Ellis, 2001).

Balık immünolojisi balık sağlığı ile ilgili çok hızlı gelişen bilim dallarından biridir. Sadece spesifik hastalık organizmalarının belirlenmesinde değil aynı zamanda bazı önemli hastalık problemlerinin önlenmesinde kullanılmaktadır (Plumb ve Bowser, 1983).

Balıklarda immün sistemin ontogenik gelişimi başlıca kazanılmış immün parametreler (B ve T lenfositler ile IgM salgılanması) ve immün sistemin farklı lenfoid organlarının (Timus, böbrek, dalak) gelişim çalışmalarını kapsamaktadır (Ellis, 1998; Zapata ve diğ., 2006;). Kazanılmış savunma kabiliyeti ve spesifik immün parametrelerin varlığı balık türleri arasında hatta salmonid balıklar gibi yakın ilişkili türler arasında bile büyük

ölçüde farklılık içermektedir (Schroder ve diğ., 1998). Genelde marin türlerde kazanılmış immun sistem yumurtadan çıktıktan 2 veya 3 ay sonra geliştiği bildirilmiştir (Schroder ve diğ., 1998; Petrie-Hanson ve Ainsworth, 2001).

En ilkel omurgalı canlılar olan balıklardaki bağışıklık sistemi yüksek omurgalılar ile karşılaştırıldığında farklılık içermektedir. Balıklarda antikorların sentezi yüksek vertebralıların antikor üretimi ile karşılaştırıldığında nispeten daha yavaştır. Soğukkanlı canlılarda spesifik immün cevabın oluşumu su sıcaklığına bağlıdır ve belli bir süre gerekmektedir. Salmonid balıklarda bu sürenin 4 - 6 hafta arasında olduğu bildirilmiştir (Ellis, 2001).

Omurgalılarda spesifik olmayan (doğal) savunma mekanizması makrofajlar ve granüler lökositler tarafından geliştirilen fagositik savunma ile sağlanır. Balıklar lenfositler tarafından gerçekleştirilen hücresel ve humoral yanıtın gerçekleştiği ilk canlı grubunu oluşturmaktadır. Memelilerde kan hücrelerini üreten organ olan kemik iliği ve lenf yumruları balıklarda bulunmaz (Ellis, 1999). Balıklarda anterior böbrek, timus ve dalak balıklardaki başlıca lenfoid organlardır (Ellis, 1988b). Balıklarda spesifik olmayan immun sistem memelilerden farklı olarak savunma mekanizmasının temelini oluşturmaktadır (Tort ve diğ., 2003).

2.4.1. Doğal İmmunité (Spesifik Olmayan Bağışıklık)

Balıklar çok yüksek miktarda virüs ve bakteri içeren çevrelerinde bu canlılarla temas halindedir. Bu mikroorganizmaların çoğu saprofitik, birkaçı patojeniktir ve her ikisi de balık dokularını sindirebilme ve parçalama yeteneğine sahiptir. Balıklar normal koşullar altında doğal savunma mekanizmalarıyla böyle potansiyel istilacılara karşı kendilerini savunarak sağlık durumlarını korurlar. Bu mekanizmalar balık dokularında mikroorganizmaların tutunmasını, çoğalmasını veya invazyonunu engelleyerek balığın korunmasını sağlarlar. Bu mekanizmalar şu üç önemli maddeyi kapsar. İlki koruma olup non- spesifiktir ve istilacı türlerin ayırteıcı moleküler yapısının tanımlanmasına bağlı değildir. İkinci olarak onların aktive olabilmesi için çok kısa bir lag fazı (geçikme süresi) vardır hatta inflamasyon gibi uyarılabilen savunma nispeten çabuk gelişmektedir (1 - 2 gün). Böylece patojenlere yerleşmeleri için çok kısa bir süre verilmiş olunur. Üçüncü olarak nispeten sıcaklığa bağlı değildir. Soğukkanlı omurgalılarda bu özellik

çok önemlidir çünkü balıkların spesifik immun savunma mekanizması ile immun yanıtın oluşturabilmesi için epey zaman gerekir bu da suyun sıcaklığına bağlıdır (Ellis, 2001).

Dermis, epidermis, pullar ve mukus gibi fiziksel ve kimyasal bariyerler balıklarda mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklara karşı savunma mekanizmasının ilk hattını oluşturmaktadır. Epidermal hücreler farklı ajanlara karşı reaksiyon oluşturma yeteneğine sahiptir. Böyle hücrelerin bütünlüğü hem yabancı ajanların girişinin engellemesi hemde osmotik dengenin sürdürülmesi için önemlidir (Shephard, 1994). Patojen mikroorganizma konakçı canlıya girdiğinde hücresel ve humoral doğal savunma mekanizması aktive olur. Bu savunmadaki en önemli mekanizma monosit- makrofaj ve nötrofillerin fagositoz aktivitesidir (Magnadottir, 2006).

Balık vücut sıvıları çeşitli mikrobiyal ürünlere ve mikroorganizmalara karşı reaksiyon oluşturan proteinleri ve peptidleri içermektedir. Böyle nitrojenli bileşimler doğal humoral bağışıklığın bir bölümünü oluşturmakta ve antimikrobiyal peptidleri, lizozim, komplement, lektin, transferrin, pentraxin (C-reaktif proteinleri (CRP) ve serum amyloid proteini (SAP) ve antiproteazları içermektedir (Ellis, 1989).

Başlıca glikoproteinlerden oluşan ve goblet hücreleri tarafından sentezlenen mukus yabancı ajanların kolonizasyonunu engeller ve üretim miktarı enfeksiyonlarda, fiziksel veya kimyasal uyarıcılara karşı artış gösterir. Sürekli devam eden mukus tabakası bir substrat üretir. Antikor, lizozim komplement proteinleri ve lektin içeren biyolojik olarak aktif bileşenler sayesinde antibakteriyal mekanizma oluşur (Nowak, 1999; Nagashima ve diğ., 2001; Hellio ve diğ., 2002).

Lizozim balıkların serum, mukus, böbrek, bağırsak ve dalağında yaygın bir şekilde dağılmış olan katyonik bir enzimdir (Lie ve diğ., 1989). Bu enzim başlıca monosit-makrofaj ve nötrofiller tarafından sentezlenmektedir (Murray ve Fletcher, 1976; Nathan, 1987). Bu enzim bakteri hücre duvarının peptidoglikan tabakasındaki N - asetilmuramik asit ve N - asetilglukozamin arasındaki kimyasal bağları hidrolize etme yeteneğine sahiptir (Paulsen ve diğ., 2001).

Antiproteazlar, konakçıya nüfus etmek için bazı mikroorganizmaların kullandığı proteazların etkisini inhibe etme yeteneğine sahip enzimlerdir. Teleost balıklarda α_1 -antitripsin ve α_2 -makroglobulin gibi enzimlerin varlığı bildirilmiştir. Gökkuşığı alabalık serumundaki α_2 -makroglobuli' nin *A. salmonicida* proteazını inhibe ettiği rapor edilmiştir (Ellis, 1987).

Antimikrobiyal peptidler (AMPs) mast hücreleri gibi immun sistem hücrelerinde (Silphaduang ve Noga, 2001), deri ve mukus içeren yüzeyler (Cole, Weis, ve Diamond, 1997) gibi mikroorganizmaların yerleşebilecekleri dokularda bulunmaktadır. 12 - 50 amino asit içeren, bakteriyel, viral, fungal ve protozoan patojenlere karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahip peptidlerdir (Hancock ve Diamond, 2008). Balıkların mast hücrelerinden elde edilen AMPs' nin bir türü olan piscidin' in balık patojenlerine karşı geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Silphaduang ve Noga, 2001). Son yıllarda kırmızı deniz çipura balığının (*Chrysophrys major*) solungaçlarındaki mast hücrelerinde chrysophsin (Iijima ve diğ., 2003) ve pisi balığında (*Pleuronectes americanus*) pleurocidin (Murray ve diğ., 2003) identifiye edilmiştir.

CRP ve SAP pentamerik proteinler familyasına dahil edilmekte ve bunlara pentraxinler denilmektedir. CRP' nin başlıca biyolojik fonksiyonu patojenlerin tanımlanması, komplement sistem ve fagositik hücrelerle konakcının zarar gören hücrelerinin ortadan kaldırılmasıdır (Volanakis, 2001). Gökkuşığı alabalıklarının ön böbrek hücrelerindeki CRP' nin opsonik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Kodama ve diğ., 1999).

Doğal ve kazanılmış immunitede rol alan komplement 35' den fazla çözülebilen plazma proteininden oluşur. Komplement sisteminin aktivasyonu ardışık biyokimyasal reaksiyonlarla birlikte biyolojik olarak aktif araçların üretimiyle başlar. Bu reaksiyon hücre membranının erimesi (lisis) ve inflamasyonun spesifik olmayan araçları ile antijenin yok edilmesiyle sonuçlanır. Komplement sistemin aktive olması için üç yol vardır: antijen-antikor kompleksinin varlığını gerektiren klasik yol, mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan şeker kısmı ile mannoz bağlayan lektin ve fikolinler gibi lektinlerin etkileşimine bağlı lektin yolu ve son olarak virus bakteri mantar hatta tümör hücreleri ile direk olarak aktive edilen alternatif yol vardır ki bu yol

antikorlardan bağımsız gerçekleşir (Ellis, 1999; Ellis, 2001; Boshra ve Sunyer, 2006; Candan ve Karataş, 2010).

Glikoprotein ve proteinlerden oluşan lektinlerin birçok balık türünde mukus, serum ve yumurtada bulunduğu bildirilmiştir (Ellis, 1999). Lektinler karbonhidrat bağlarının yapısına, hücre içi lokalizasyonuna, bivalent katyonlara bağlı olmalarına göre gruplandırılmaktadır (Drickamer ve Taylor, 1993). Atlantik salmon balıklarının serumundan izole edilen mannoz bağlayan lektinin *Aeromonas salmonicida*'nın virulens suşlarında opsonizasyon aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Ottinger ve diğ., 1999).

İnterferonlar (IFN) makrofaj, lenfosit, doğal öldürücü hücreler ve fibroblastlar tarafından salgılanır (Haller, Kochs ve Weber, 2006). IFN işlevsel özellikleri, protein yapısı, gen diziliminin temeline bağlı olarak iki familyaya ayrılır (Gomez ve Balcazar, 2007). IFN- α ve IFN- β 'nin biyolojik aktiviteleri benzerdir. IFN- α başlıca lökositler tarafından sentezlenirken IFN- β fibroblastlar tarafından sentezlenir (Gomez ve Balcazar, 2007). İnterferonların her iki türü de virüs replikasyonunu inhibe eder (Ellis, 2001; Whyte, 2007).

2.4.2. Kazanılan İmmunite (Spesifik Bağışıklık)

Herhangi bir hastalık etkeni vücuda girdiğinde spesifik olmayan immun sistem devreye girer ancak enfeksiyonu durduramazsa enfeksiyon gelişir ve spesifik immun sistem devreye girer (Ellis, 2001).

2.4.2.1. Humoral İmmunite

Antikorların savunma sistemindeki rollerini virus, toksin ve bakteriyel adezyonların nötralizasyonu, koplement sisteminin aktivasyonu ve bakteri, virus gibi partiküllerin opsonizasyonu kapsamaktadır. Antikorlar immunoglobulin (Ig) denilen proteinlerin bir sınıfını oluşturmaktadır. Memelilerde immunoglobulinlerin 5 sınıfı veya Ig izotipleri tanımlanmış (Ig A, Ig D, Ig E, Ig G, Ig M) (Buxton ve Fraser, 1977; Black, 1993; Bilgehan, 2002; Candan ve Kartaş, 2010) ancak teleost balıklarda sadece tek izotipinin (Ig M) bulunduğu bildirilmiştir (Kaattari ve Piganelli, 1996). Ig'lerin temel yapısını molekül ağırlıkları ile ölçülen iki ağır (H) ve iki hafif zincirden (L) oluşturmaktadır. H

zincirinin fizikokimyasal özelliği isotiplerin sınıflandırılmasını belirlemektedir. Memelilerin serumundaki Ig M bu temel birimin pentameri iken bazı balık türlerinde serumda monomerik formları olmasına rağmen teleost balıklarda genellikle tetrameriktir. Ig'ler deri ve bağırsak mukus sekresyonunda hatta safrada bile bulunmaktadır. *Cyprinodon variegatus*' un safrasındaki Ig' lerin Ig M' nin dimerik formu, deri mukusunda ise tetramerik ve dimerik formunun bulunduğu bildirilmiştir. Pisi ve sazan gibi bazı teleost balık türlerinin yumurtalarında Ig bulunmuştur ki bu da maternal antikor transferi olabileceği varsayımını desteklemektedir (Ellis, 2001).

Memelilerde farklı Ig sınıflarının işlevsel olarak özelleşmesi sınıf ve alt sınıfları belirleyen H zincirinin yapı özelliğidir. Teleost balıklarda Ig M' nin alt sınıfları işlevsel heterojeniteye sahip olduğu bildirilmiştir (Kaattari ve Piganelli, 1996). *Cyprinodon variegatus*' da monomer (Ig M1), dimer (Ig M2) ve tetramer (Ig M4) heterojenitesi yanı sıra H zincirinin molekül büyüklüğünde heterojen olduğu rapor edilmiştir (Serum Ig M1 45 kDa; safra Ig M2 55 kDa, deri mukus ve serum Ig M 4 70 kDa) (Lobb ve Clem, 1981).

Bazı balık türlerinde Ig M ya direk olarak Ig reseptörleri ile ya da indirek olarak klasik olarak aktive edilmiş komplement reseptörleri ile opsonin gibi bir role sahiptir (O'Dowd ve diğ., 1998). Balık antikoru virüs enfeksiyonunun nötralizasyonunda önemlidir ve ayrıca toksin ve adhezinler gibi bakteriyel virülens faktörlerin nötalizasyonunda rol almaktadır (Ellis, 1999).

Lipopolisakkarit (LPS) gibi T hücrelerinden bağımsız antijenlerle antikor üretiminin başlamasında B hücrelerine ve monosit veya makrofaj olarak isimlendirilen interlökin-1 (IL 1) üreten yardımcı hücrelere ihtiyaç vardır. LPS, IL-1 üretimi için makrofajları uyarır ve antikor sekresyon hücrelerinin (plazma hücreleri) çoğalıp farklılaşmasıyla IL1' e yanıt oluşturmak için antijen spesifik B hücrelerinin yeteneğini artırır. T hücrelerine bağlı antijenlerle (çoğu protein) antikor üretiminin uyarılmasında T hücrelerine ihtiyaç vardır. Bu durumda antijenler makrofajlar tarafından alınır, kısmen MHC II. sınıf molekülünün oyuklarındaki makrofajların yüzeyinde sunulan peptidlere parçalanır. T lenfositleri bu yapıyı tanıyan reseptörleri ile aktif hale gelir lenfokin veya kimyasal maddeler salar ve B hücreleri bu sinyallere cevap verir. Aktif hale geçen B

hücreleri başkalaşır plazma hücrelerine veya hafıza hücrelerine dönüşür, plazma hücreleri kendilerinin oluşmasını uyaran antijene karşı özel antikor adı verilen proteinleri salgılar (Ellis, 1999; Iwama ve Nakanishi, 1996; Ellis, 2001).

T lenfositlerinin farklı görevleri vardır. Orijinal T hücreleri yardımcı hücreler olarak adlandırılır ve bir klon bir antijenle karşılaştığında yardımcı hafıza hücrelerine dönüşerek antijenle ikinci kez karşılaştığında B lenfositlerinin daha kuvvetli ve uzun süreli bir direnç göstermelerine yardımcı olur. Böylece spesifik immün sistem vasıtasıyla enfeksiyon durdurulduğunda aynı enfeksiyon ajanına karşı immünolojik bir hafıza gelişir (Ellis, 1999; Iwama ve Nakanishi, 1996; Ellis, 2001; Candan ve Karataş, 2010).

Spesifik immün cevabın gelişimi bazı canlılarda aşılama uygulamasının temel prensibini oluşturur (Ellis, 1999). Birçok pasif immunizasyon çalışması *Aeromonas salmonicida* (Marguis ve Lallier, 1989), *Vibrio anguillarum* (Harrell ve diğ., 1975; Çamlıbel, 2002) *Yersinia ruckeri* (Olesen, 1991; Kubilay ve Timur, 2001), *Edwardsiella tarda* (Gutierrez ve diğ., 1993), *Edwardsiella ictulari* (Klesius ve Sealey, 1995) *Flavobacterium psychrophilum* (LaFrentz ve diğ., 2003) gibi balık patojenlerine karşı koruyucu immünitede spesifik antikorların rolünü tanımlamak için kullanılmıştır.

2.4.2.2. Selüler İmmünite (Cell-Mediated Immunity: CMI)

Hücrel bağışık yanıtta timusdan köken alan T lenfositler rol oynar. Primer bir antijen uyarısında T lenfosit klonları farklı fonksiyonlu hücre gruplarına dönüşerek hücrel yanıt oluşturur. Bunlar lenfokin üreten hücreler, sitotoksik hücreler ve supresör (baskılayıcı) hücrelerdir. Lenfokin üreten hücreler makrofajların spesifik olmayan kapasitelerini artırır, sitotoksik hücreler yabancı hücreleri lizis ile ortadan kaldırır, supresör (baskılayıcı) hücreler ise antikor ve lenfokin üretimini gerektiğinde yönlendirerek sona erdirilmesini sağlayan hücrelerdir (Iwama ve Nakanishi, 1996; Ellis, 2001; Candan ve Karataş, 2010).

2.5. BAKTERİYEL BALIK HASTALIKLARINDA KULLANILAN SEROLOJİK TEKNİKLER

Günümüzde kültürü yapılan balıklarda, kabuklularda ve onların çevrelerindeki patojenlerin identifikasyonu ve hastalıkların kontrol altına alınması için hastalık teşhisinin hızlı bir şekilde yapılması büyük önem taşımaktadır. Dünya Hayvan Sağlık Örgütü' nün (The World Organisation for Animal Health, OIE) akuatik hayvanlarda teşhis klavuzu (2006) akuakültür türlerinde hastalık oluşturan patojenlerin identifikasyonu için geleneksel, immunolojik ve moleküler olmak üzere birçok teşhis yöntemini içermektedir. Hızlı teşhis metotlarının geliştirilmesi akuakültürde risk teşkil eden hastalıkların azaltılmasında önemli bir role sahiptir. Geleneksel metotlar olan bakteriyolojik, parazitolojik, mikolojik ve virolojik metotlar kültürü kolay yapılan patojenler için kullanılmasına rağmen bazı patojen türlerin identifikasyonu için bu yöntemler pahalı, zaman alıcı ayrıca uzmanlık gerektirmektedir (Whitman, 2004; Adams ve diğ., 2008).

Serolojik teknikler balık hastalıklarına neden olan patojenlerinin belirlenmesinde kullanılan alternatif yöntemleri içermektedir. Bu teknoloji patojenlerin konakçı balıkta meydana getirmiş olduğu yanıtın belirlenmesini sağlamaktadır. İnsan ve hayvanların serumlarında antikorların varlığı önceden patojenlere maruz kaldıklarını ifade eder ve bu metotlar insan ve veteriner hekimlikte hastalıkların teşhisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu testlerin balık immunolojisi alanına adaptasyonu ile balık hastalıklarının teşhisi yapılmakta ve böylece hastalıklara karşı önlemlerin alınmasını sağlamaktadır (Anderson, 1974; Adams ve diğ., 2008).

Tüm hücre veya antikor kaplı lateks aglütinasyon ve Floresan Antikor Testi (FAT) gibi serolojik testler balık patojenlerinin identifikasyonunda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Son yıllarda ticari olarak üretilmiş hızlı ELISA kitleri çeşitli hastalıkların teşhisi için geliştirilmiştir. Serolojik testlerin duyarlılığı ve özgünlüğü kullanılan antiserumun değişken kalitesine ve araştırmadaki ajanın antijen bileşenlerinin çeşitliliğine bağlıdır (Inglis ve diğ., 1993).

Günümüzde balık hastalıklarında lam aglütinasyon, FAT, ELISA, komplement fiksasyon, immunodiffüzyon, hemaglutinasyon ve presipitin reaksiyonu gibi çeşitli serolojik teknikler kullanılmaktadır (Anderson, 1974; Anderson, 1990; Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004; Austin ve Austin 2007; Adams ve diğ., 2008).

2.5.1. Lam Aglütinasyon Testi

Süspansiyon halindeki bakteriler elektrolitli ortamda kendi antikorları ile birleşecek olursa hücre veya parçacıklar birbirlerine yapışarak gözle görülebilecek büyüklükte kümeler halinde çökerler. Bu olaya aglütinasyon adı verilir (Anderson, 1974; Plumb ve Bowser, 1983; Ağaçfıdan ve Badur, 2002; Bilgehan, 2002; Us, 2006; Austin ve Austin, 2007).

Balık hastalığı araştırmalarında en çok kullanılan testlerden biri; aglütininlerin varlığını tespit etmek için kullanılan aglütinasyon testidir. Bu test kan serumunda mevcut antikorun varlığını aglütinasyon veya görülebilir antijen kümeleri ya da antijen taşıyıcıları ile görülebilir. % 0,85 oranında tuz içeren süspansiyonda bu kümeler taban çöker ve test çıplak gözle veya mikroskopda okunur (Anderson, 1974; Toranzo ve diğ., 1987; Roberson, 1990; Timur ve Timur, 2003; Ağaçfıdan ve Badur, 2002; Whitman, 2004; Us, 2006; Austin ve Austin, 2007).

Basit, çabuk negatif veya pozitif bir aglütinasyon testi bir damla antiserum ile bir damla antijenin fizyolojik su ile lam üzerinde karıştırılmasıyla yapılabilir. Standart titrasyon metotları ise 0. 1 ml Kahn tüpü ile yapılır. Günümüzde bu aglütinasyon metodunun modifikasyonu olan microwell plak sistemi kullanılmaktadır (Anderson, 1974; Whitman, 2004).

Lam, tüp, lateks ve mikro aglütinasyon olmak üzere çeşitli aglutinasyon yöntemleri patojen suşların serolojik karşılaştırılmasında, bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde ve balık patojenlerine karşı antikor aranmasında kullanılmaktadır (Timur ve Timur, 2003).

Lam aglütinasyon testinin basit, hızlı ve maliyetinin ucuz olmasından dolayı tercih edildiği (Toranzo ve diğ., 1987) ancak antijen ve antikor miktarının belli bir oranda

konulmamasından dolayı negatif reaksiyon verdiği, ayrıca bazı antiserumların benzer antijene sahip bakterilerle çapraz reaksiyon vererek yanlış pozitif reaksiyon verebileceği bildirilmiştir (Anderson, 1974). Toranzo ve diğ. (1987) bazı balık patojenlerinin serotiplendirme çalışmalarında kullandıkları lam aglütinasyon testinde antijen olarak tüm bakteri antijeni ile “O” somatik ısı antijeni kullanıldığında ısıya dayanıklı somatik “O” antijenlerinin çapraz reaksiyonları ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir.

Aglütinasyon testi furunkulosis (Rabb ve diğ., 1964), salmon balığında (*Oncorhynchus tshawytscha*) edwardiellosis (Amandi ve diğ., 1982), sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*) balıklarında streptococcosis (Kitao, 1982a), Atlantik salmon balığında (*Salmo salar*) kolumnaris'in teşhisinde (Anacker ve Ordal 1959); *Vibrio anguillarum* (Sorensen ve Larsen, 1986; Knappskog ve diğ., 1993), *Aeromonas sobria* ve *Aeromonas hydrophila* (Leblanc ve diğ., 1981), *Yersinia ruckeri* (Davies, 1990; Kubilay ve Diler, 1998), *L. garvieae* (Palacios ve diğ., 1993; Çağırgan, 2004) gibi balık patojenlerinin serotiplendirilmesinde; *A. salmonicida* (Krantz ve diğ., 1963), *Yersinia ruckeri* (Kubilay ve Timur, 2001) ile immünize edilen gökkuşağı alabalıklarında aşılama sonrasında antikor varlığının araştırılmasında kullanılmıştır.

2.5.2. FAT (Floresan Antikor Testi)

Floresan Antikor Tekniği (FAT) 1950 yılından beri birçok bakteriyel balık hastalık etkenlerinin dokuda aranmasında ya da balık serumunda antikorların araştırılmasında diagnostik amaçla kullanılmış ve hızlı sonuç alındığından dolayı sıklıkla kullanılan bir yöntem olmuştur (Anderson, 1974; Eurell ve diğ., 1978; Busch, 1981; Anderson, 1990; Klesius ve diğ., 2006; Timur ve Timur, 2003; Kubilay ve Timur, 2001; Austin ve Austin, 2007).

Floresan Antikor Tekniğinde antikor moleküllerinin bazı floresan boyalara olan duyarlılık özelliği ile antikorların spesifik antijenlere olan duyarlılık özelliklerinden yararlanılmaktadır. Fluorescein isothiocyanate (FITC) antikor molekülüne tutunur veya konjuge edilir. Antikor- FITC konjugatı şüpheli antijen içeren doku veya hücreleri boyamak için kullanılır. Boyanan örnekler UV ışığına sahip mikroskopta görüntülenir. Antijen ile reaksiyona giren antikorların görüldüğü bölgelerde UV ışığı floresan boyayı

ortaya çıkarır. Böyle teknikler direk ve indirek boyama yöntemleri ile uygulanır (Anderson, 1974; Plumb ve Bowser, 1983).

Bu diagnostik teknik direk (Bullock ve diğ., 1980; Smibert ve Krieg, 1981) ve indirek (Lewis ve Savage, 1972; Laidler, 1980) olmak üzere iki farklı yöntem şeklinde kullanılır. Direk Floresan Antikor Tekniğinde (FAT) balıklarda enfekte dokuların lam üzerine ezilerek yayılması suretiyle antijen aranmasında veya antijen- spesifik antikor floresan boya ile işaretlenmemiş ise İndirek Floresan Antikor Tekniği (IFAT) kullanılabilir. IFAT iki basamaktan oluşur. Birinci basamakta patojen- spesifik antikorlarla kaplanır, ikinci basamakta birinciye karşı oluşturulmuş işaretli antikor kullanılır (Anderson, 1974; Anderson, 1990; Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004; Austin ve Austin, 2007).

Sarıkuyruk balıklarından izole edilen α ve β *Streptococcus* spp. izolatlarının ayırımında (Kawahara ve Kusuda, 1987), tilapia balıklarının (*Oreochromis niloticus*) dokusundaki *Streptococcus iniae*' nin tanımlanmasında (Klesius ve diğ., 2006), sarı kuyruk balıklarında nocardiosis' in teşhisinde (Kawahara ve diğ., 1986), sarıkuyruk balıklarında *Pasteurella piscicida*' nın (*Photobacterium damsela* subs. *piscicida*) identifikasyonunda (Kitao ve Kimura, 1974), salmonid balıklarda *Aeromonas salmonicida*' nin identifikasyonunda (Lallier ve diğ., 1990), *Aeromonas salmonicida* izolatları arasındaki farklılıkların gösterilmesinde (Klontz ve Anderson, 1968), salmonid balıkların bakteriyel böbrek hastalığının teşhisinde (Bullock ve Stuckey, 1975; Bullock ve diğ., 1977; Laidler, 1980; Austin ve diğ., 1985; Meyers ve diğ., 1993a,b), *Aeromonas hydrophila*' nin identifikasyonunda (Lewis ve Allison, 1971; Lewis ve Savage, 1972) salmonid balıklarda enterik kızıl ağız hastalığının teşhisinde (Johnson ve diğ., 1974), *Flavobacterium* spp.' nin tanımlanmasında (Huh ve Wakabayasi, 1987), gökkuşağı alabalıklarında bakteriyel soğuk su hastalığının etkeni olan *Flavobacterium psychrophilum*' un identifikasyonunda (Lorenzen ve Karas, 1992; Delen, 2007), chinook salmon balığında (*Oncorhynchus tshawytscha*) *Edwardsiella tarda*' nin identifikasyonunda (Amandi ve diğ., 1982), gökkuşağı alabalıklarında *Vibrio anguillarum*' un identifikasyonunda (Nielson ve diğ., 1985b) IFAT ve FAT tekniğinin başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir.

2.5.3. ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testi balık hastalıklarında antijenin varlığını göstermek, serumdaki spesifik antikorların varlığını araştırmak ve hastalık etkenlerinin serotiplendirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılan serolojik bir tekniktir (Arkoosh ve Kaattari, 1990; Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004; Austin ve Austin, 2007).

ELISA testinde katı bir yüzey oluşturmak için plastik substrata tespit edilen antikor ve antijen kullanılır. ELISA patojenlerin varlığının çok kısa sürede gösterilmesine imkân veren serolojik bir testtir. Bu test için spesifik monoklonal veya poliklonal antiserum, enzim (alkalin fosfataz, horseradish peroksidaz), substrat (o- fenilen diamin) gerekmektedir (Austin ve diğ., 1986). Pozitif reaksiyon renk değişimi ile gösterilir ve spektrofotometre veya plate okuyucusu ile sonuçlar kantitatif olarak değerlendirilir (Arkoosh ve Kaattari, 1990; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007).

Bu teknikte antikor molekülü direk veya indirek enzimle bağlanır. Direk metotta enzim ile işaretli antikor antijene bağlanır. İndirek metotta ikinci bir basamak daha gereklidir. Bu basamakta enzim ile işaretli ikinci antikor kullanılır. Enzimle işaretlenmiş antikor ilk antikora bağlanır budan dolayı enzim ile antikor etiketlenir. Bu teknik prensipte FAT tekniğine benzer, ancak antikor floresan boya yerine enzim ile işaretlenir. Enzimle işaretlenmiş antikor ve antijen arasındaki reaksiyonu göstermek için enzim substratı eklenir. Enzim substrat ile reaksiyona girer ve renk değişimi meydana gelir. Bu renk değişimi spektrofotometrede okunur (Arkoosh ve Kaattari, 1990; Ağaçfıdan ve Badur, 2002; Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004; Us, 2006).

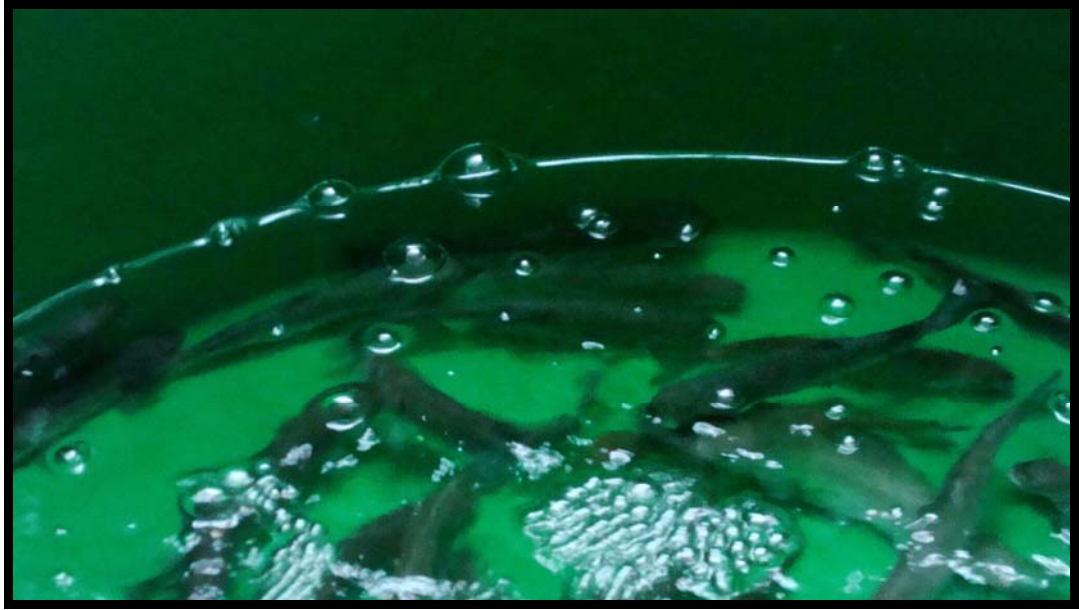
ELISA testinin *A. salmonicida* (Austin ve diğ., 1986), *R. salmoninarum* (Hsu ve diğ., 1991), *Photobacterium damsela* subs. *piscicida* (Bakopoulos ve diğ., 1997), *Vibrio vulnificus* (Biosca ve diğ., 1997), *Yersinia ruckeri* (Cossarini- Dunier, 1985), *Edwardsiella ictulari* (Earlix ve diğ., 1996) gibi balık ve kabuklu patojenlerinin identifikasyonunda başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERİYAL

3.1.1. Denemede Kullanılan Balık Materyali

Deneyisel enfeksiyon çalışmasında kullanılan 65 ± 5 gram ağırlığındaki 100 adet gökkuşağı alabalığı, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edilmiştir (Şekil 3. 1).



Şekil 3. 1: Denemede kullanılan gökkuşağı alabalıkları

3.1.2. Tavşan Materyali

Denemede kullanılan bir yaşında, dişi, Yeni Zelanda asıllı albino tavşan İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünden (DETAM) temin edilmiştir.

3.1.3. Deneysel Enfeksiyon ve İmmünizasyon Çalışmalarının Yapıldığı Yer

Deneysel enfeksiyon çalışması İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Anabilim Dalı Hastalıklar Programına ait olan kapalı devre uygulama tanklarında,

poliklonal antikor üretimi için yapılan immunizasyon çalışması ise İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünde (DETAM) gerçekleştirilmiştir.

3.1.4. Serolojik Testlerin Yapıldığı Yer

Deneysel olarak enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarında *L. garvieae*’ ye karşı oluşan spesifik antikorların varlığının araştırılmasında kullanılan serolojik testler Fakültemiz Hastalıklar Anabilim Dalına ait olan Mikrobiyoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1.5. Uygulama Tankları ve Uygulamada Kullanılan Su

Denemde 1 m çapında 70 cm derinliğinde biri kontrol diğer ikisi deneme tankı olmak üzere 3 adet fiberglas tank kullanılmıştır (Şekil 3. 2). Tanklar havalandırılmış musluk suyu ile doldurulmuştur. Tanklardaki suya hava motorları ile devamlı olarak oksijen verilmiş ve suyun sıcaklığı 17- 18 ° C olması sağlanmış ayrıca atman filtrelerle kapalı devre sistem oluşturulmuştur. Balıkların stres vb. etkiler nedeniyle dışarı sıçramalarını önlemek amacıyla tankların üstü 2 cm göz açıklığındaki ağ ile kapatılmıştır. Deneme boyunca kullanılan suyun pH, çözülmüş oksijen ve sıcaklık değerleri WTW marka cihaz ile alınmıştır. Araştırma boyunca, pH 7.0 ± 0.2 , oksijen 8.0 ± 0.1 mg/L ve sıcaklık 17 ± 2 °C değerlerinde olan su kullanılmıştır.

3.1.6. Yem

Deneme balıkları adaptasyon ve deneme süresince günlük vücut ağırlığının % 2’ si oranında pelet yem ile beslenmiştir.

3.1.7. Denemede Kullanılan *Lactococcus garvieae* Suşları

Denemede Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Öznur Diler ve arkadaşlarının 2002 yılında Fethiye’ de bir alabalık işletmesindeki epizootikden izole ettiği yerli *L. garvieae* suşu ile ATCC- 43921 nolu *L. garvieae* suşu (referans suş) kullanılmıştır.



Şekil 3. 2: Denemede kullanılan fiberglas tanklar

3.1.8. Bakteri Kültüründe Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

Bakteri kültüründe Todd Hewitt Broth (Himedia, M 313), Bile Esculin Azide Agar (Himedia, M 493), Tryptic Soy Agar (Merck, 1. 05458), Brain Heart Infusion Agar (Merck, 1. 13825), MR-VR Medium (Himedia, M 070), Simmons' Citrate Agar (Merck, 1.02501), Nutrient Broth (Merck, 1.05443), Mueller Hinton Medium (Difco, 0252-17-6), Mac Conkey Agar (Oxoid) gibi besiyerleri ve D-xylose (Merck, 816 M 195789), L-ornithine monohydrochloride (Merck, 1.06906), D+galactose (Merck, 1.04058), myo-inositol (Merck, 1.04728), L+ arabinose (Merck, 1.01492), L-arginine monohydrochloride (Merck 1.01544), D-fructose (Merck, 1.05323), L-lysine monohydrochloride (Merck, 1.05700), D+mannose (Merck, 1.05984), starch (Merck, 1.01253), lactose monohydrate (Merck, 1.07637), gelatin (Merck K25138478), sucrose (Merck, 1.07651), D+glukose anhydrous (Merck, 1.08337), maltose monohydrate (Merck, 1.05910), urea (Merck, 1.08486), mannitol (Merck, 5980), 2-phenoxyethanol

(Sigma P-1126), hydrogen peroxide (Riedel- De Haen), sulfuric acid (Fluka 84721) gibi kimyasal maddeler kullanılmıştır.

3.1.9. Tavşan İmmünizasyon Çalışmasında Kullanılan Adjuvant

Tavşan immunizasyon çalışmasında Freund's incomplete adjuvant (Sigma, F- 5506) kullanılmıştır.

3.1.10. IFAT ve ELISA Testlerinde Kullanılan Antiserum

ELISA ve IFAT testinde kullanılmak üzere Ray Biotech Inc firmasından Salmon IgM karşı oluşturulmuş ticari poliklonal tavşan antiserumu (DS-PB-02926) satın alınmıştır.

3.1.11. IFAT ve ELISA Testlerinde Kullanılan Konjugatlar

ELISA testinde kullanılmak üzere anti-tavşan IgG peroksidaz konjugatı (65- 6120) Invitrogen firmasından, Fluoresan Antikor Testlerinde kullanılmak üzere anti-tavşan IgG FITC konjugatı (AP132F) Chemicon International firmasından satın alınmıştır.

3.1.12. Serolojik Testlerde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

3.1.12.1. IFAT Testinde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

Yıkama Solüsyonu: PBS hazır tablet (Medicago, 09- 2051)

Fiksasyon Solüsyonu: PBS hazır tablet
% 3 Paraformaldehit (Merck, 1.04005)

Preparatların kapatılması: 1,4 Diazabicyclo (2,2,2) octane DABCO:
triethylene diamine (Sigma, D-2522)

3.1.12.2. ELISA Testinde Kullanılan Tampon ve Solüsyonlar

Yıkama Tampon Solüsyonu: PBS hazır tablet
% 0.05 Tween 20 (Sigma, P- 7949)
p H: 7.4

Karbonat bi karbonat solüsyonu: Karbonat bi karbonat hazır kapsül (Sigma C-3041)
p H: 9.6

Bloklama Solüsyonu: PBS hazır tablet

	% 3 BSA (Sigma, A-7030)
	p H: 7.4
Serum Sulandırma Solüsyonu:	PBS hazır tablet
	% 0.05 Tween 20 (Sigma, P-7949)
	p H: 7.4
Sitratlı Fosfat Solüsyonu:	Fosfat- sitrat hazır tablet (Sigma, P-4809)
Substrat:	O- phenylenediamine dihydrochloride (Sigma, P-1526)

3.1.13. ELISA Okuyucusu

Tavşan immunizasyon ve deneysel enfeksiyon çalışmalarında bakteri yoğunluğunu ayarlamak, ELISA testinde sonuçları değerlendirmek için İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Hastalıklar Anabilim Dalı Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan Bio-tek Instruments marka spektrofotometre kullanılmıştır (Şekil 3. 3).

3.1.14. Floresan Mikroskobu

Floresan mikroskop çalışmalarında İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Hastalıklar Anabilim Dalına ait olan fotoğraf makinesi ataçmanlı Nikon marka floresan mikroskobu kullanılmıştır (Şekil 3. 4).



Şekil 3. 3: Çalışmada kullanılan ELISA okuyucusu



Şekil 3. 4: Çalışmada kullanılan fotoğraf makinesi ataçmanlı floresan mikroskop

3.2.YÖNTEM

3.2.1. Denemede Kullanılan Alabalıkların Adaptasyonu ve Sağlık Kontrolü

İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Sapanca İç su Ürünleri Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edilen 100 adet 65 ± 5 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalığı 1 hafta süreyle adaptasyona tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda rastgele seçilen 6 adet balığın otopsileri yapılarak karaciğer, böbrek ve dalaklarında BHIA ve TSA besiyerlerine bakteriyolojik ekim yapılmıştır (Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004; Austin ve Austin, 2007). Ayrıca eksternal olarak solungaç ve deriden hazırlanan preparatlar ile internal olarak iç organlardan hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenerek parazit muayenesi yapılmıştır (Timur ve Timur, 2003)

3.2.2. Denemede Kullanılan Balık Grupları

Çalışmada 2 adet deneme ve 1 adet kontrol grubu oluşturulmuş, deneme gruplarının her birine 25' er kontrol grubunda ise 20 balık kullanılmıştır.

3.2.3. *Lactococcus garvieae* İnokulatlarının Hazırlanması ve Deneysel Olarak Enfeksiyon Oluşturma

Yerli ve referans *L. garvieae* suşları TSA besiyerine aseptik koşullarda ekilerek 24-25°C’ de 24 saat inkübasyon ile gençleştirilmiştir. Gençleştirilmiş *L. garvieae* suşları NB (Nutrient Broth) içeren tüplere ekilerek 24-25 °C’ de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 2500 devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. İki kere PBS ile yıkandıktan sonra PBS içersinde sulandırılmış ve mililitredeki canlı bakteri sayısı, yüzeye yayma yöntemi ile (Plumb ve Bowser, 1983; Bilgehan, 2002; Whitman, 2004; Buller, 2004) saptanarak 10^6 , 10^7 , 10^8 hücre/ml olacak şekilde farklı yoğunluklarda hazırlanmış olan yerli ve referans *L. garvieae* bakterisi 4’ er adet alabalığa intraperitoneal olarak uygulanmış ve hastalık yapan bakteri yoğunluğunun 10^7 hücre/ml (Kang ve diğ., 2004) olduğu tespit edilmiştir.

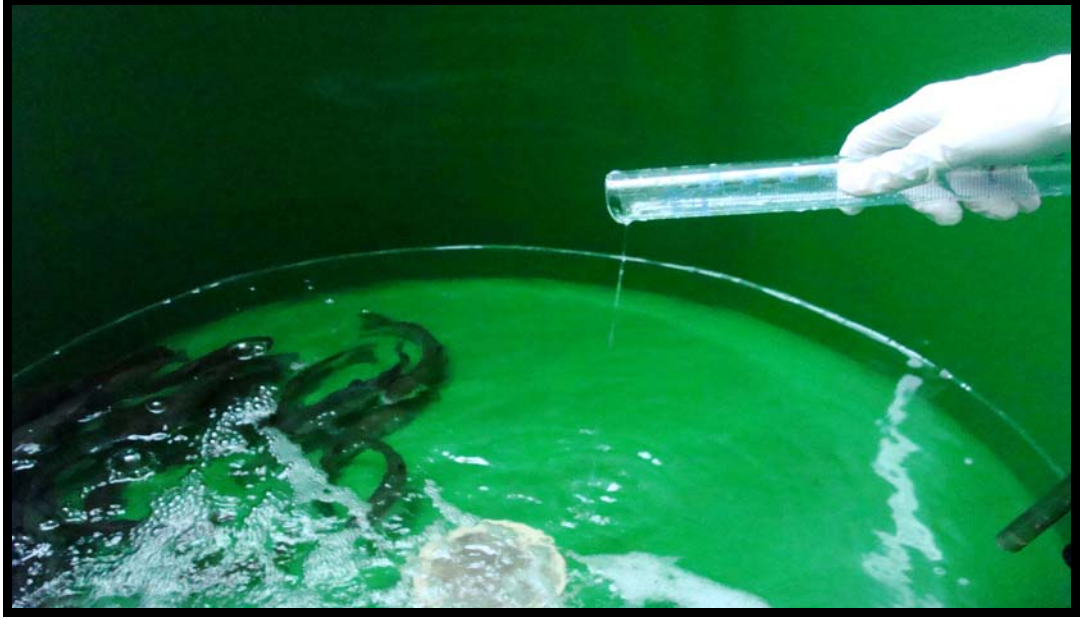
Deneme grubundaki balıklara 0.5 ppm 2-phenoxiethanol ile anestezi uygulanmıştır (Bell, 1964) (Şekil 3. 5). Daha sonra hazırlanan inokulat (10^7 hücre/ ml) 0. 1 ml olacak şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir (Şekil 3. 6). Kontrol grubundaki 20 adet balığa ise 0. 1 ml PBS intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir (Kang ve diğ., 2004). Enjeksiyon sonrası enfekte edilen balıkların klinik durumları ve ölümleri 34 gün boyunca takip edilmiştir.

3.2.4. Deneysel Olarak Enfekte Edilen Alabalıklardan *Lactococcus garvieae* Suşlarının Re-izolasyonu, Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Tespiti

3.2.4.1. Konvansiyonel Yöntem ile *L. garvieae* Suşlarının İdentifikasyonu

Denemede hastalık belirtisi gösteren balıkların otopsis yapılarak dalak, böbrek ve karaciğer gibi iç organlarından TSA ve BHIA besiyerlerine bakteriyolojik ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 22 °C’ de 24- 48 saat inkübe edilerek izole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tespiti için rutin bakteriyolojik metodlar uygulanmıştır. TSA ve BHIA besiyerlerinde üreyen bakterilerin koloni morfolojisi ve koloni rengi incelenmiş, Gram boyama metodu ile hücre morfolojisi, kapsül boyama yöntemi ile kapsül varlığı ve asılı damla metodu ile hareket testi yapılmıştır. Bunun yanı sıra sitokrom oksidaz, katalaz, O/F (Hugh ve Leifson

ortamı), arjinin (Moeller), lizin ve ornitin dekarboksilaz (Moeller), eskulin, maltoz, sukroz, mannitol, galaktoz, fruktoz, arabinoz ve laktoz asit üretimi, MR/VP (Clark-Lubs besiyeri), indol üretimi, jelatin, nişasta hidrolizi, üreaz testi, nitrat üretimi,



Şekil 3. 5: Denemede kullanılan alabalıklara 2-phenoxiethanol ile anestezi uygulanması



Şekil 3. 6: Denemede kullanılan gökkuşağı alabalıklarına intraperitoneal enjeksiyonun uygulanması

β -galaktosidaz testi, H₂S üretimi, sitrat kullanımı ve %5 koyun kanı içeren kanlı agarda hemoliz gibi biyokimyasal testlerde uygulanmıştır (Koneman, 1992; Timur ve Timur 2003; Çotuk, 2003; Whitman, 2004; Buller, 2004; Austin ve Austin, 2007). Ayrıca EDTA' lı kan plazmasındaki fibrinojeni pıhtılaştıran koagulaz enziminin varlığını ortaya koymak için lam koagulaz testi uygulanmıştır (Buxton ve Fraser, 1977; Koneman, 1992).

L. garvieae suşlarında bakteri hücrelerinin kapsüllü olup olmadığını tespit etmek için kapsül testi yapılmıştır. Bir damla çini mürekkebi ve kapsül varlığı araştırılacak *L. garvieae* izolatları lam üzerine iyice yayılmıştır. Daha sonra bir lamelle kapatılan preparat mikroskop altında incelenmiştir. Kahverengi-siyah olan zemin üzerinde açık bir hat şeklinde mikroorganizmayı çevreleyen kapsülün varlığı araştırılmıştır (Buxton ve Fraser, 1977).

3.2.3.2. Hızlı Tanı Kitleri ile *L. garvieae* Suşlarının İdentifikasyonu

Konvansiyonel olarak yapılan biyokimyasal testlerin yanı sıra patojen bakterinin identifikasyonu için hızlı tanı kiti olan API 20 STREP (bioMérieux) kiti ve API ZYM kiti kullanılmıştır (Whitman, 2004; Buller, 2004).

Patojenin API 20 STREP profilini çıkarmak için hasta balıklardan izole edilen bakteriler % 5 koyun kanı içeren kanlı agarda 24- 25° C' de 24 saat inkübe edildikten sonra 2 ml' lik API Suspension Medium içinde 5- 6 McFarland standardına eşit bulanıklık sağlayacak şekilde homojenize edilmiştir. Bakteri homojenatı API 20 STREP kitinin ilk yarısındaki tüm kuyucuklara 100 µl, ADH testi içinse kuyucuk yarısına kadar enjektör yardımıyla doldurulmuştur. Kitin diğer yarısı için API 20 STREP mediumun içine 500 µl bakteri homojenatı ilave edildikten sonra iyice homojenize edilmiş kuyucukların yarısı bu homojenatla doldurulduktan sonra üzerleri mineral yağ ile kapatılmıştır. 36°C' de 4 saatlik inkübasyon sonucunda kit ayrıcları damlatılmış sribin ilk yarısı değerlendirilmiştir. 24-72 saatlik inkübasyon sonucunda patojenin API STREP profili çıkarılmıştır (Poutrel ve Ryniewicz, 1984).

Patojen bakterinin enzim aktivitesini belirlemek için API ZYM kiti kullanılmıştır. Hasta balıklardan izole edilen bakteriler % 5 koyun kanı içeren kanlı agarda 24-25 °C' de 24

saat inkübe edildikten sonra 2 ml'lik API Suspension Medium içinde 5- 6 McFarland standardına eşit bulanıklık sağlayacak şekilde homojenize edilmiştir. API ZYM kitindeki her bir kuyucuğa 65 µl olacak şekilde dağıtıldıktan sonra 36 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kit ayıraçları damlatılarak patojenin API ZYM profili çıkarılmıştır (Waitkins, Ball, ve Fraser, 1980).

3.2.5. Enfekte Balıkların Klinik, Otopsi ve Histopatolojik Muayenesi

Enfekte edilen balıklardaki eksternal değişiklikler gözlenmiş, ölmekte olan veya yeni ölen balıkların otopsileri yapıldıktan sonra internal olarak *L. garvieae* 'nin neden olduğu otopsi bulguları not edilmiştir (Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004).

Histopatolojik olarak hasta olan balıkların karaciğer, böbrek ve dalak gibi iç organlarından alınan örnekler % 10 formalin solüsyonunda tespit edilmiştir. Tespit edilen doku örnekleri doku işleme basamağının ardından parafin içine gömülmüş ve doku örneklerinden 4-5 µm kalınlığında histolojik kesitler alınarak preparatlar Heamtoxilen & Eosin ve doku Gramı boyama yöntemi ile boyandıktan sonra mikroskop altında incelenmiştir (Culling, 1963; Bullock, 1978; Drury ve Wallington, 1980; Timur ve Timur, 2004; Mumford ve diğ, 2007).

3.2.6. Enfekte Balıklardan Serum ve Doku Örneklerinin Elde Edilmesi

Aglütinasyon, ELISA ve IFAT testlerinde kullanılmak üzere enfekte ve kontrol grubundaki balıklardan 2 ml' lik steril enjektör yardımıyla kaudal venadan kan alma yöntemi ile kan alınmıştır (Şekil 3. 7).

Kan örnekleri tüplere konularak bir gece 4 °C' de bekletildikten sonra 2500 devirde 20 dakika santrifüjlenerek serum kısmı ayrılmıştır. Elde edilen serumlar lam aglütinasyon, ELISA ve IFAT testlerinde kullanılıncaya kadar -20 °C' de saklanmıştır (Anderson, 1974; Özcel, 1978; Anderson, 1990). Enfekte balıklardan karaciğer, göz, böbrek ve dalaktan alınan doku örnekleri IFAT testinde kullanılana kadar -20 °C' de saklanmıştır (Özcel, 1978; Anderson, 1990).



Şekil 3. 7: Enfekte alabalıkta kaudal venadan kan alma yöntemi ile kan alınması

3.2.7. *L. garvieae* Suşlarının Antibiyogram Testi

L. garvieae suşları için belirli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş ticari disklerle uygulanan disk difüzyon metodu kullanılmıştır. Mc Farland 0,5 bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan Müller Hinton Agar besiyerine konularak yayılmıştır. Süspansiyon, tüm besiyeri üzerini kaplayacak şekilde steril eküvyon çubuğu ile dağıtılması sağlanmıştır. Daha sonra laminar flowda, petriler kuruması için 5- 10 dk bırakılmıştır. Daha sonra agarın yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda değişik antibiyotikleri içeren diskler steril pens ile yerleştirilerek 24- 25 °C’ de 24- 48 saat inkübe edilmiştir (Plumb ve Bowser, 1983; Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004).

Elde edilen sonuçlar her bir antibiyotik için CLSI (NCCLS) tarafından belirlenen zon çaplarına göre duyarlı veya direçli olarak değerlendirilmiştir (Raissy ve Ansari, 2011).

3.2.8. Tavşan İmmünizasyonu için Bakterin Hazırlanması ve Antiserum Elde Edilmesi

İmmünizasyon için kullanılacak *L. garvieae* suşları BHIA da aktif hale getirildikten sonra NB’ a ekim yapılmış ve 24-25 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 2500 devirde 20 dakika santrifüj edildikten sonra % 3’ lük formalin ile inaktive edilmiştir (Eynigor ve diğ., 2004). İnaktive edilen bakterin 2500 devirde PBS ile

üç kere yıkandıktan sonra sterilite kontrolü yapılmıştır. Bio-tek Instruments marka spektrofotometrede 540 nm de optik yoğunluk 1' e ayarlanmış (yaklaşık 10^9 /ml) (Barnes ve diğ., 2002) hazırlanan bakterin kullanılıncaya kadar 4 °C' de muhafaza edilmiştir. (Sorensen ve Larsen, 1986; Toranzo ve diğ., 1987; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007).



Şekil 3. 8: Çalışmada kullanılan tavşana intravenöz enjeksiyonun uygulanması



Şekil 3. 9: Çalışmada kullanılan tavşanın kulak venasından kan alımı

Formalin ile inaktive edilmiş *L. garvieae* ile hazırlanan antijen ekstratı tavşanlara haftada iki defa 0. 2- 0. 4- 0. 8 ve 1 ml olmak üzere artan dozlarda intravenöz (damar içi) yolla enjekte edilmiştir (Şekil 3. 8). Son enjeksiyondan bir hafta sonra tavşanın kulak venasından bir miktar kan alınmıştır (Şekil 3. 9). Bu işlemde bir hafta sonra 1 ml antijen ekstraktı enjekte edilerek ve bunu takip eden iki hafta sonunda bir miktar daha kan alınmıştır (Sorensen ve Larsen, 1986). Santrifüj edilerek alınan serumlar -20 °C’ de ELISA ve IFAT testlerinde kullanılıncaya kadar saklanmıştır (Sorensen ve Larsen, 1986; Anderson, 1990).

3.2.9. Deneysel Olarak Enfekte Edilen Alabalık Serumlarındaki Spesifik Antikorların ve Doku Örneklerindeki Patojenin Varlığını Göstermek İçin Kullanılan Serolojik Testler

3.2.9.1. Lam Aglütinasyon Testi

BHIA besiyerinde 24° C’ de 24- 48 saat inkübe edilen *L.garvieae* suşları 2 ml PBS içersinde toplanmış, 2 defa santrifüj edilerek yıkanmıştır. Hazırlanan bakteri 100° C’ de 1 saat kaynatılmıştır. Hazırlanan bu süspansiyon 2500 devirde 20 dakika santrifüj edildikten sonra PBS ile sulandırılarak hücre yoğunluğu 540 nm de 1’ e (Barnes ve diğ., 2002) ayarlandıktan sonra aglütinasyon testinde “O” somatik antijeni olarak kullanılmıştır (Sorensen ve Larsen, 1986; Toranzo ve diğ, 1987; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007).

Temiz bir lam üzerine 10 µl somatik “O” antijeni ve 10 µl hasta balık serumu damlatılarak lamın sağa sola hareket ettirilmesiyle lam üzerindeki antikor- antijen kompleksinin iyice karışması sağlanmıştır. Kontrol amaçlı olarak sağlıklı balıklardan elde edilen serumlar kullanılmıştır. Test sonuçları 2-3 dakika içersinde değerlendirilmiş, 5 dk. dan sonra oluşan zayıf aglütinasyon negatif olarak değerlendirilmiştir (Plumb ve Bowser, 1983; Toranzo ve diğ., 1987; Roberson, 1990; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007).

3.2.9.2. Indirekt Floresan Antikor Tekniği (IFAT)

Dokulardaki antijenin varlığını tespit etmek için lamlar üzerine elmas uçlu kalemle küçük daireler çizdikten sonra lamlar % 50 alkol-aseton karışımında 1 saat

bekletildikten sonra silinmiştir (Altındaş, 1985; Kubilay ve Timur, 2001). Temizlenen lamalar üzerine hasta balıklardan alınan $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edilen doku örnekleri ezilmek suretiyle ince bir tabaka oluşturacak şekilde yayılmıştır. Fiksasyon işlemi için iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde hazırlanan preparat % 100 metanol ile 5 dakika süreyle fikse edilirken (Kang ve diğ. 2004), diğer yöntemde % 3 paraformaldehit içeren PBS içerisinde 15 dakika tutmak suretiyle (Lorenzen ve Karas, 1992) fiksasyon sağlanmıştır.

Optimal antiserum ve konjugat dilüsyonlarını saptamak için lamalar üzerinde çizilmiş 6 adet halkada antiserumun 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200 dilüsyonları ve konjugatın 1/20, 1/40, 1/80, 1/100 ve 1/150 dilüsyonları denenmiştir. Negatif kontrol amacı ile kontrol grubu balıklardan alınan doku örnekleri kullanılmıştır. Fiksasyon işleminden sonra preparatlar üzerine en iyi sonucu veren 1/200 oranında sulandırılmış anti- *L. garvieae* poliklonal tavşan antikorundan 10 µl ilave edildikten sonra nemli ortamda $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında preparatlar 3 defa PBS ile yıkanmış, en iyi sonucu veren anti-tavşan Ig G FITC konjugatı 1/100 oranında sulandırılarak 10 µl ilave edildikten sonra 30 dakika $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de inkübe edilmiştir. PBS ile yıkanan preparatlar karşıt boyama amacıyla 30 dakika % 0. 1' lik Evans blue ile boyandıktan sonra 10 µl kaplama solüsyonu damlatılarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamelle kapatıldıktan sonra floresan mikroskopta incelenerek yeşil renkli koklar tespit edilmeye çalışılmıştır (Anderson, 1990; Timur ve Timur, 2003; Ağaçfıdan ve Badur, 2002; Whitman, 2004; Us, 2006; Austin ve Austin, 2007).

Enfekte edilen balık serumundaki spesifik antikorların varlığını göstermek için uygulanan IFAT testi için *L. garvieae* suşları THB (Todd-Hewitt Broth) besiyerinde $24-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de 72 saat inkübe edilmiştir. 2500 devirde 15 dakika süreyle santrifüj işlemi ile elde edilen bakteri çökeleği PBS ile iki kere yıkandıktan sonra tekrar PBS ile sulandırılmış ve Bio-tek Instruments marka spektrofotometrede 540 nm de optik yoğunluk 1' e ayarlanmıştır (yaklaşık 10^9 hücre/ml). Hazırlanan antijen Floresan Antikor Tekniğinde test antijeni olarak kullanılmıştır (Kubilay ve Timur, 2001, Anderson, 1990; Austin ve Austin, 2007).

%50 alkol- aseton karışımında 1 saat bekletilerek temizlenen lamalar üzerine 10 µl hazırlanan test antijeni damlatıldıktan sonra lamalar havada kurutulmuştur. Fiksasyon işlemi için iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde lamalar asetonunda 10 dakika tutulmuş (Whitman, 2004), ikinci yöntemde ise lamalar 60 °C’ de etüvde tutmak suretiyle fiksasyon gerçekleştirilmiştir (Ainsworth ve diğ., 1986; Anderson, 1990; Austin ve Austin 2007).

Optimal antiserum ve konjugat dilüsyonlarını saptamak için lamalar üzerinde çizilmiş 6 adet halkada salmon antikoruna karşı oluşturulmuş ticari poliklonal tavşan antiserumunun 1/3000, 1/4000 ve 1/5000 dilüsyonları ve konjugatın 1/50, 1/100 ve 1/150 dilüsyonları denenmiştir. Lamalar üzerinde çizilmiş 6 adet halkanın birincisine negatif ve diğerlerine pozitif serumlar dilüe edilmeden 10 µl konulmuştur. Nemli ortamda 37 °C’ de 30 dakika süre ile inkübe edilen preparatlar inkübasyon sonrasında 5 dakika PBS ile 2 defa yıkanmıştır. Preparatlar dik tutmak suretiyle havlu kâğıt üzerinde kurutulduktan sonra en iyi sonucu veren 1/4000 oranında sulandırılmış salmon antikoruna karşı oluşturulmuş ticari poliklonal tavşan antiserumundan 10 µl konulmuştur. Preparatlar nemli ortamda 37 °C’ de 30 dakika inkübe edilmiştir. PBS ile 5’er dakikalık iki yıkama işleminin ardından en iyi sonucu veren 1/ 100 oranında sulandırılmış konjugattan 10 µl damlatılmış ve 37 °C’ de 30 dakika inkübe edilmiştir. 2 kez PBS ile 5’ er dakika yıkanan preparatlar üzerine % 0.1 lik Evans blue solüsyonundan 10 µl damlatılarak preparatlar 37 °C’ de 30 dakika nemli ortamda bekletilmiştir. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkanan preparatlar kurutulduktan sonra kaplama solüsyonu damlatılarak lamelle kapatılmış hemen floresan mikroskobu ile antijen-antikor komplekslerinin varlığı gösteren yeşil floresan görünüm tespit edilmeye çalışılmıştır (Lewis ve Savage, 1972; Özcel, 1978; Anderson, 1990; Kubilay ve Timur, 2001; Austin ve Austin 2007).

Floresan mikroskopta incelenen preparatların FITC ile işaretli antijen- antikor komplekslerinin yeşil renkli görülmesi pozitif olarak değerlendirilirken, yeşil renkli floresan ışığın tespit edilememesi negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Lewis ve Savage, 1972; Kubilay ve Timur, 2001; Timur ve Timur, 2003; Austin, Austin, 2007).

3.2.9.3. Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

THB besiyerine ekim yapılan *L. garvieae* bakterisi 24-25 °C' de 72 saat süreyle inkübe edildikten sonra 2500 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen bakteri çökeleği PBS ile iki kere yıkandıktan sonra %3' lük formalinde 1 gece 4° C' de tutmak suretiyle inaktive edilmiştir. İnaktive edilen bakteri 2500 devirde PBS ile üç kere yıkandıktan sonra karbonat bi-karbonat solüsyonu içindeki antijen yoğunluğu spektrofotometrede 630 nm' de 0.6' ya ayarlanmış ve ELISA testinde antijen olarak kullanılmıştır (Eyngor ve diğ., 2004).

U tabanlı ELISA plağı hazırlanan antijenle her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde kaplanmıştır. Antijenle kaplanmış plak parafilm ile iyice kapatılarak gece boyunca 4 °C' de tutulmuştur (Voller ve diğ., 1978).

Antijen ile kaplanmış olan ELISA plağı silkelenmiş ve yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkandıktan sonra kuyucuklar içersinde boş kalan alanların doldurulması için kuyucuklara 150 µl bloklama solüsyonu konulmuş ve plak 25 °C' de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında silkelenen plak 3 kere yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve kuyucukların ilk sütünuna 100 µl PBS; 2 ve 11 numaralı sütunlara kontrol grubundan elde edilen serum örnekleri; 3, 4, 5, 6 numaralı sütunlara yerli suş ile enfekte edilen balık serumu; 7, 8, 9, 10 numaralı sütunlara referans suş ile enfekte balık serumu 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 dilüsyonlarında serum sulandırma solüsyonu ile sulandırılarak 100 µl konulmuş ve 1 saat 25 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında plak silkelenmiş 3 kere yıkama solüsyonu ile yıkanan kuyucuklara salmon immunoglobulinine karşı oluşturulmuş ticari poliklonal anti- tavşan serumu 1/5000, 1/6000, 1/7000, 1/10000 oranında sulandırarak 100 µl konulmuş ve ELISA plağı 1 saat 25 °C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında yıkama solüsyonu ile yıkanan kuyucuklara 1/3000 ve 1/4000 dilüsyonlarında hazırlanmış olan peroksidazla işaretli anti-tavşan Ig konjugatından 100 µl konularak plak 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra sitratlı fosfat tamponuna % 0.04 hidrojen peroksit ve % 0.04 orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) ilavesi ile hazırlanan substrattan kuyucuklara 50 µl konulmuş ve plak 30 dakika karanlıkta tutulmuştur. Reaksiyon kuyucuklara 50 µl 3 M sülfürik asit ilavesi ile durdurulmuştur. Sonuçlar Bio-tek Instruments marka spektrofotometre ile 450 nm' de okunmuştur (Pasnik ve diğ., 2006).

Absorbans değeri olarak alınmış olan sonuçların pozitif eşik değeri aynı plakta yer alan negatif serumların absorbans değerlerinin aritmetik ortalamasının +3 standart sapma değeri olarak alınmış bu değerin üstünde olan dilüsyon oranları pozitif olarak kabul edilmiştir (Konemann, 1992).

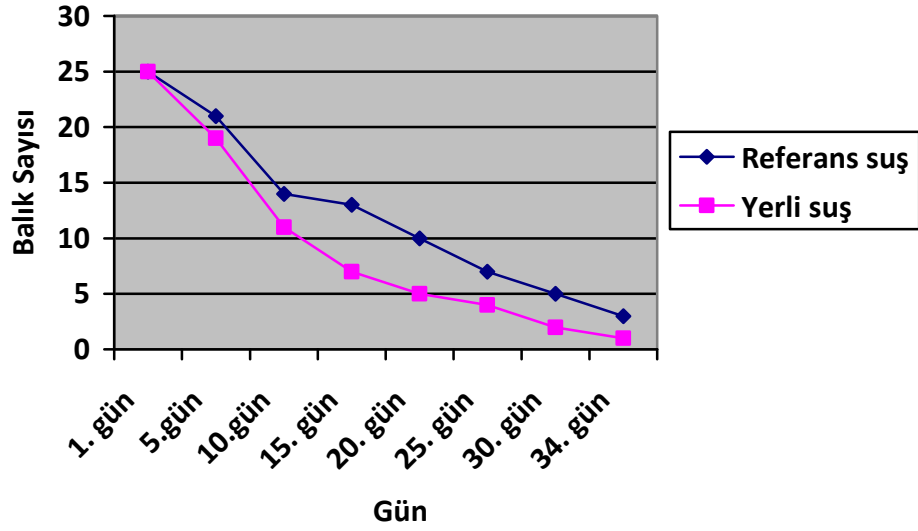
4. BULGULAR

4.1. DENEMEDE KULLANILAN ALABALIKLARIN ADAPTASYONU VE SAĞLIK KONTROLÜ BULGULARI

İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Sapanca İç su Ürünleri Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edilen 100 adet 65 ± 5 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalığı 1 hafta süreyle adaptasyona tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda rastgele seçilen 6 adet balığın otopsileri yapılarak karaciğer, böbrek ve dalak gibi organlarından BHIA ve TSA besiyerlerine bakteriyolojik ekim yapılmıştır. Yapılan ekimler sonrasında denemede kullanılacak alabalıkların herhangi bir patojen bakteriyi taşımadığı tespit edilmiştir. Ayrıca parazit muayenesi için hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenmiş parazit bulunmamıştır.

4.2. ENFEKTE EDİLEN BALIKLARDA *L. garvieae*' nin İNKÜBASYON SÜRESİ VE MORTALİTESİ İLE İLGİLİ BULGULAR

Yerli ve ATCC- 43921 referans nolu *L. garvieae* suşları ile gerçekleştirilen deneysel enfeksiyon çalışmasında her iki grupta 5. günden itibaren hastalık belirtileri görülmeye başlamıştır. 5. günden itibaren referans *L. garvieae* bakterisi ile enfekte edilen balıklarda 5., 10., 15., 20., 25., 30. ve 34 gün sonunda hayatta kalan balık sayısı sırasıyla 21, 14, 13, 10, 7, 5, 3; yerli *L. garvieae* bakterisi ile enfekte edilen balıklarda ise 19, 11, 7, 5, 4, 3, 1' dir. Çalışmanın sonunda yerli suş ile enfekte edilen alabalıklardan 1 tanesi hayatta kalırken referans bakteri ile enfekte edilen grupta 3 adet balık hayatta kalmıştır. Kontrol grubundaki alabalıklarda ise ölüm gözlenmemiştir. Deneme sürecinde her iki grupta ölen ve hayatta kalan balık sayıları Şekil 4. 1' de verilmiştir. Bu grafiğe göre yerli olan izolatin virulensinin daha yüksek olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.1: Yerli ve ATCC- 43921 referans nolu *L. garvieae* suşları ile enfekte alabalıkların deneysel enfeksiyon sonuçları

4.3. ENFEKTE BALIKLARIN KLİNİK, OTOPSİ VE HİSTOPATOLOJİ BULGULARI

Gökkuşağı alabalıklarına *L. garvieae* suşlarından hazırlanan inokulatın intraperitoneal enjeksiyonun 5. gününde yerli suş ile enfekte edilen alabalıklarda yem alımında azalma ve hareketlerde yavaşlama gibi bozuklukların yanı sıra tek veya çift taraflı ekzoftalmus gözlenmiştir. Referans suş ile enfekte edilen alabalıklarda ise sadece yem alımında azalma ve hareketlerde yavaşlama gibi klinik bulgular gözlenirken tek veya çift ekzoftalmus gözlenmemiştir.

Enjeksiyonun 5. gününün sonunda her iki grupta ölüm başlamıştır. Ölmek üzere olan balıklarda eksternal olarak anal yüzgeç tabanında, anüste ve ağız bölgesinde hemorajilerin olduğu, karın kısmının şişkin olduğu ayrıca gözlerde çift veya tek taraflı ekzoftalmus, hiperemi ve hemoroji yanı sıra sırt bölgesinde deri renginin koyulaştığı gözlenmiştir (Şekil 4. 2; Şekil 4. 3).

Otopsi yapılan her iki gruptadaki alabalıklarda splenomegali, ön böbrekte erime, solgun karaciğerin üzerinde peteşiyal hemorajiler, hiperemik ve hemorojik bağırsaklar, hava

kesesinde, pilorik seka ve viseral yağ dokusunda yaygın hemorajinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 4; Şekil 4. 5).



Şekil 4. 2: Yerli suş ile enfekte edilen alabalıkta gözlerde bilateral ekzoftalmus ve göz çevresinde hemoraji, ağız bölgesinde, anüste anal ve pelvik yüzgeçlerde hemoraji (10 gün sonra)



Şekil: 4. 3: Referans suş ile enfekte alabalığın sırt bölgesinde deride renkte koyulaşma ve bilateral ekzoftalmus (9 gün sonra)

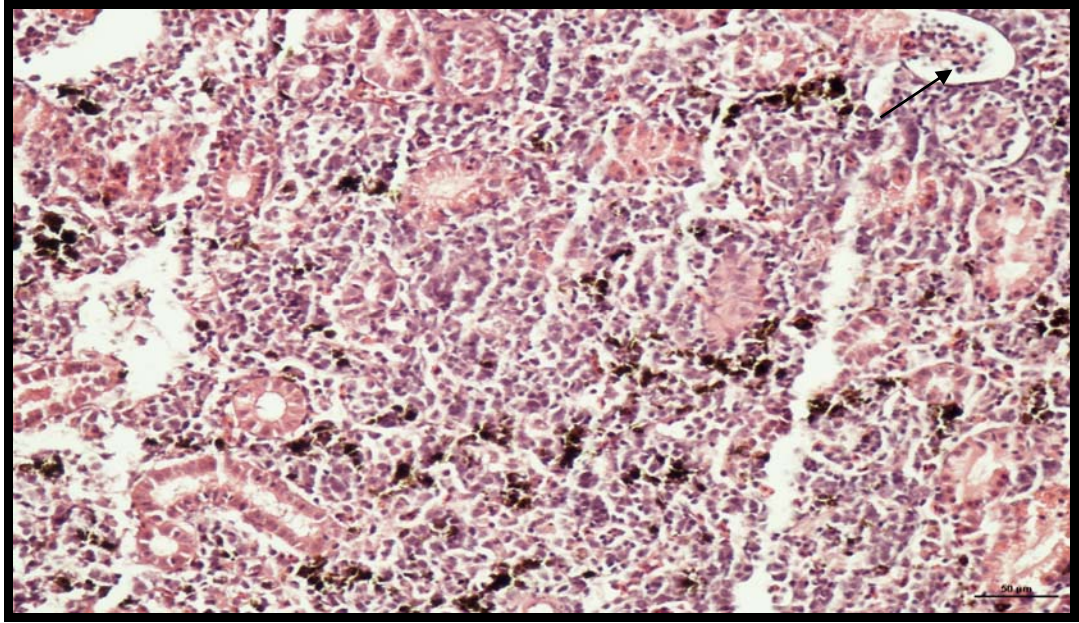


Şekil 4. 4: Yerli suş ile enfekte edilen alabalıkta dalakta büyüme, pilorik seka, hava kesesi ve yağ dokuda yaygın hemoraji ve hiperemi (17 gün sonra)

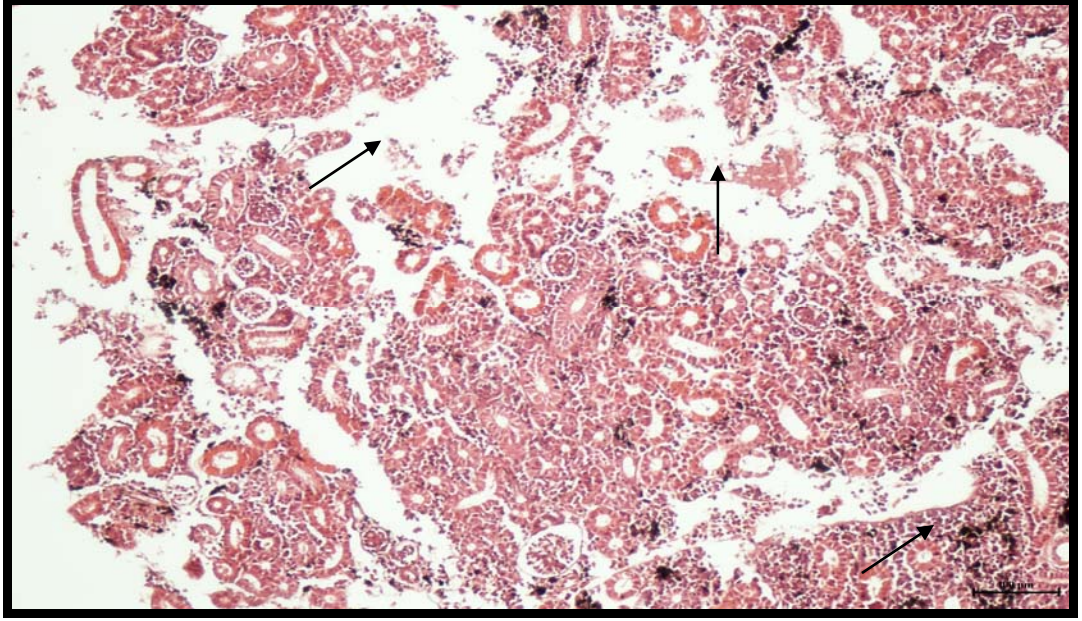


Şekil 4. 5: Referans suş ile enfekte edilen alabalıkta karaciğerde hiperemi ve peteşiyal hemoraji, hava kesesinde hemorajiler, hemorajik ve hiperemik bağırsak (15 gün sonra)

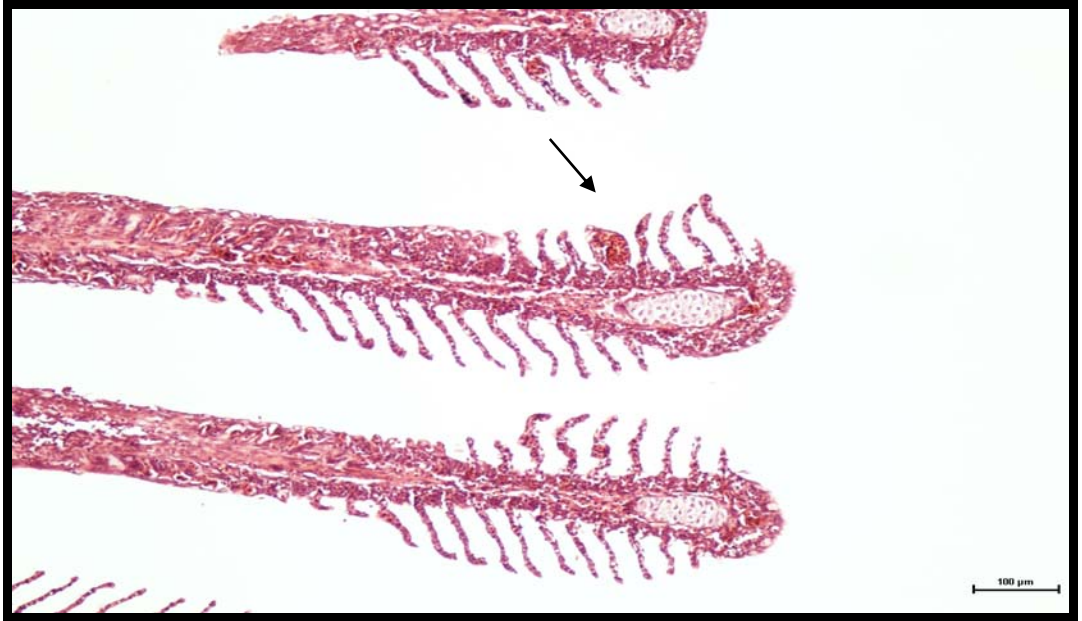
Histopatolojik olarak yerli ve referans suş ile enfekte alabalıkların böbrek tübül epitellerinde dejenerasyon ve nekroz yanısıra multifokal liquefactive (erime) nekroz, periglomerular ödem, interrenal haemopoietik dokuda boşalma ve melanomakrofaj odaklarında artma (Şekil 4.6; Şekil 4.7); solungaç filamentlerinde hemorajik odaklar, talengectiaisis ve solungaç epitelyum hücrelerinde hiperplazi (Şekil 4.8; Şekil 4. 9); dalakta multifokal liquefactive nekroz (Şekil 4.10; Şekil 4. 11); karaciğerde multifokal liquefactive nekroz, hepatosit hücrelerinde dejenerasyon, kan damarlarının içinde trombosit yığınakları (Şekil 4. 12; Şekil 4. 13) gözlenmiştir. Doku Gramı ile boyanan bağırsak kesitlerinde lamina propria mor renge boyanmış ovoid hücre morfolojisine sahip Gram pozitif bakteri kümeleri (Şekil 4. 14) ve gözlerde retina altında hemoraji tespit edilmiştir (Şekil 4. 15).



Şekil 4. 6: Yerli suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının böbrek tübül epitellerinde dejenerasyon, periglomerular ödem (okla gösterilmiş), haemopoietik dokuda boşalma, belirgin melanomakrofaj odakları H&E x 200 (13 gün sonra)



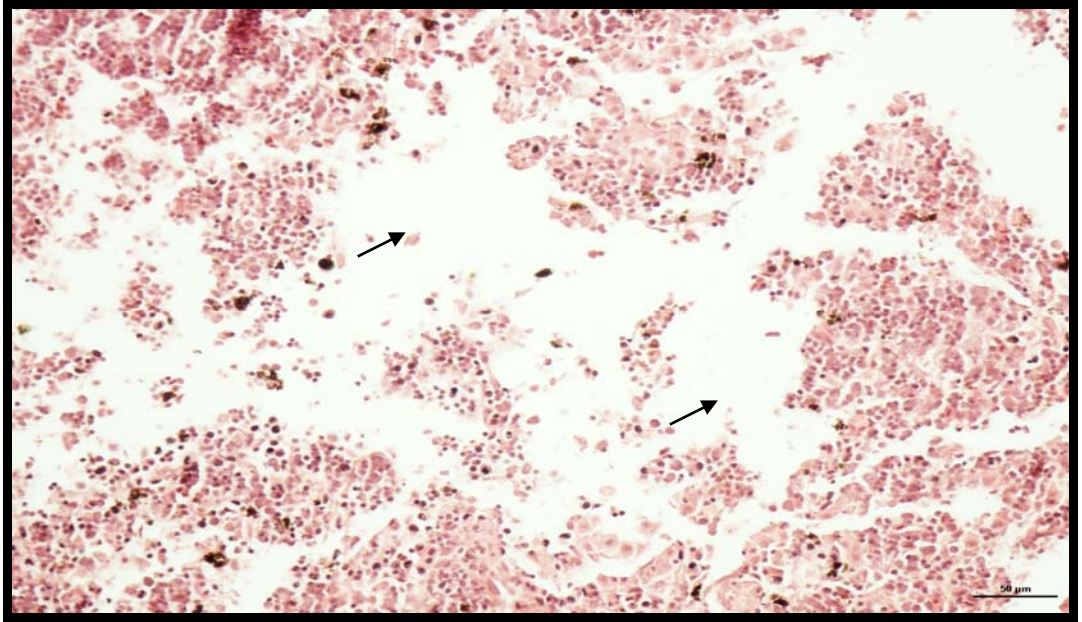
Şekil: 4. 7: Referans suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının renal dokusunda liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiş), periglomerular ödem, böbrek tübül epitellerinde dejenerasyon H&E X 100 (17 gün sonra)



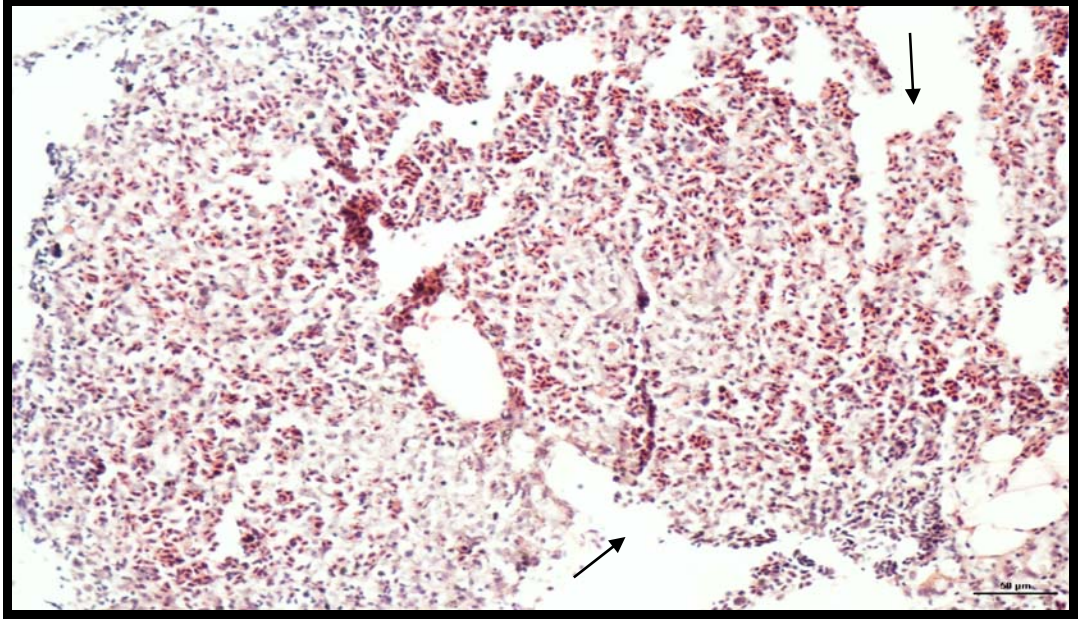
Şekil 4. 8: Yerli suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının solungaç filamentlerinde hemorajik odaklar, telangectiaisis (okla gösterilmiş) ve solungaç epitelyum hücrelerinde hiperplazi H&E x100 (15 gün sonra)



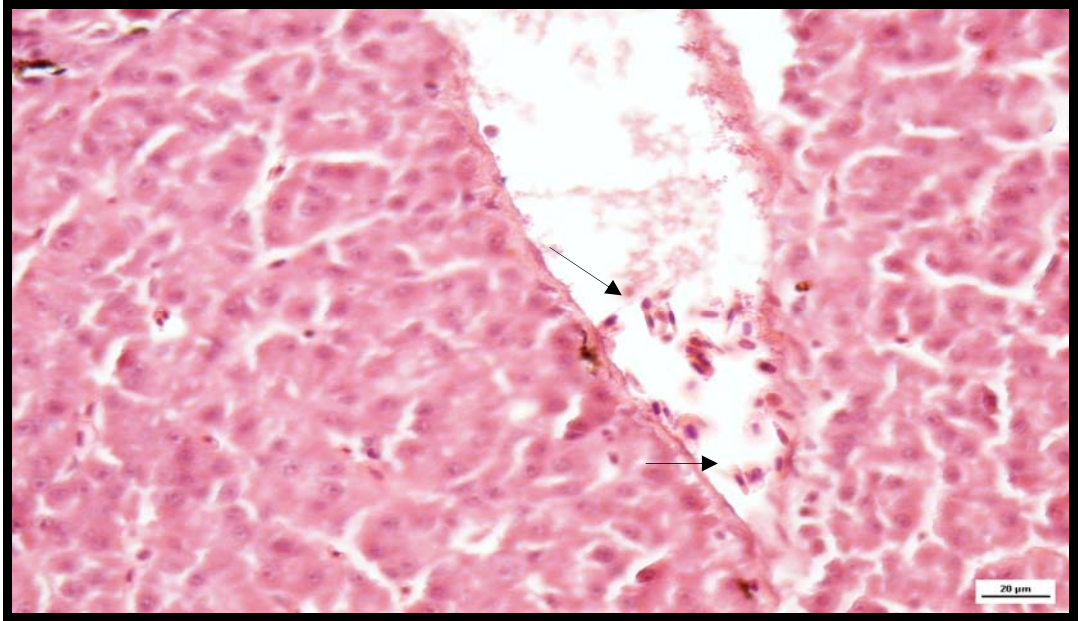
Şekil: 4. 9: Referans suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığında solungaç filamentlerindeki epitel hücrelerde hiperplazi, talengectiaisis ve goblet hücre sayısında artma H&E X100 (14 gün sonra)



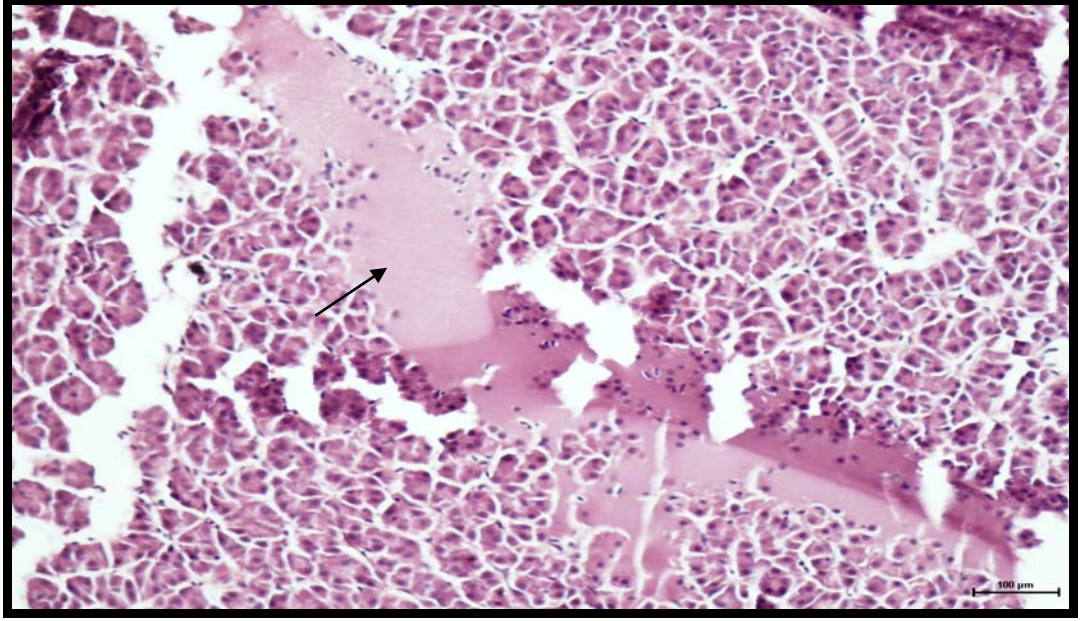
Şekil 4. 10: Yerli suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının dalağında multifokal liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiş) ve geri kalan haemopoiyetik dokuda boşalma H&E X200 (10 gün sonra)



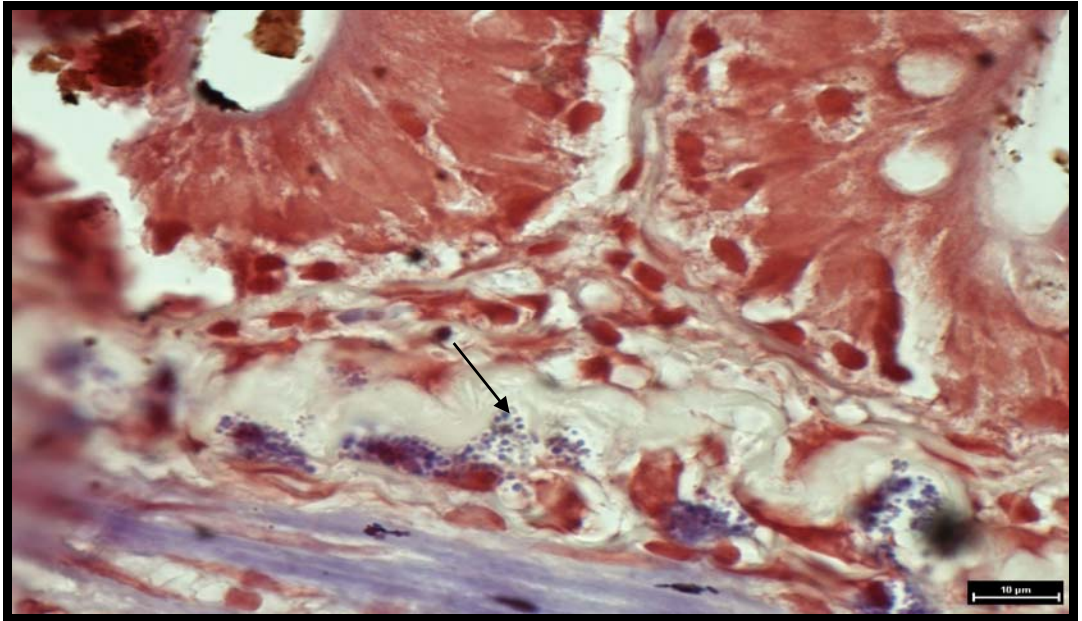
Şekil: 4. 11: Referans suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının dalağında liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiş) ve geri kalan haemopoietik dokuda boşalma H&E X200 (11 gün sonra)



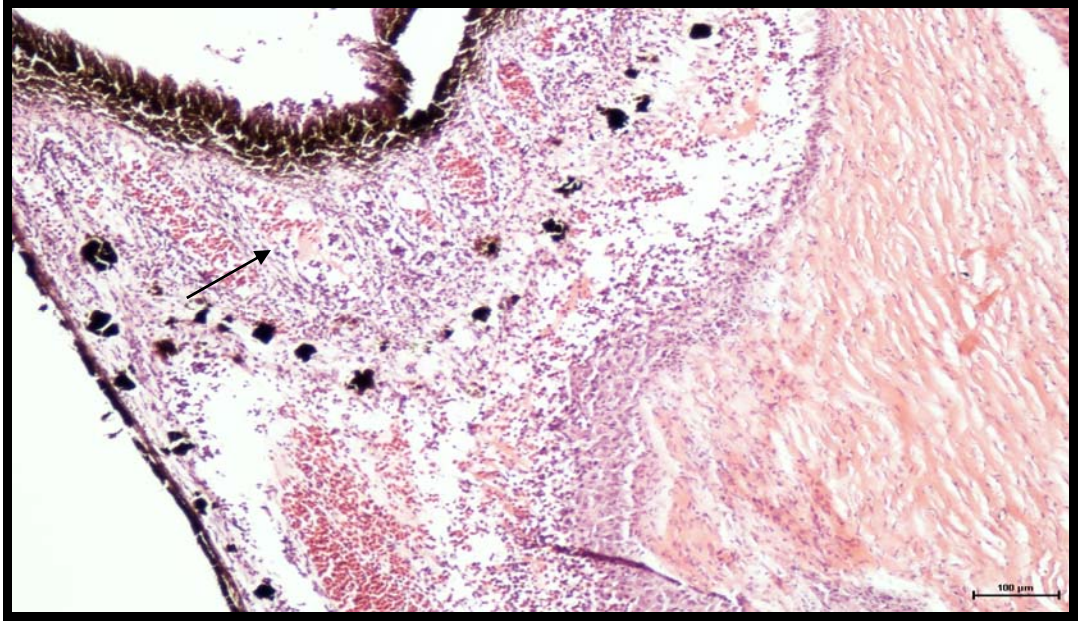
Şekil 4. 12: Yerli suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının hepatosit hücrelerinde yaygın dejenerasyon ve kan damarlarının içinde trombosit yığınları (okla gösterilmiş) H&E X400 (18 gün sonra)



Şekil: 4. 13: Referans suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının karaciğerinde liquefactive nekroz (okla gösterilmiş) ve ödem H&E X 100 (15 gün sonra)



Şekil 4. 14: Yerli suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının bağırsak kesitinde lamina propria içinde mor renge boyanmış ovoid hücre morfolojisine sahip Gram pozitif bakteri kümeleri (okla gösterilmiş) Doku Gramı x 1000 (12 gün sonra)



Şekil: 4. 15: Referans suş ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığının gözünde sub-retinal hemoraji (okla gösterilmiş) H&E X 100 (13 gün sonra)

4.4. DENEYSEL OLARAK ENFEKTE EDİLEN ALABALIKLARDAN RE-İZOLE EDİLEN *L. garvieae* SUŞLARININ MORFOLOJİK, FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNE AİT BULGULAR

4.4.1. Konvansiyonel Bakteriyolojik Yöntem Bulguları

Deneysel olarak enfekte edilen alabalıkların karaciğer, böbrek ve dalak gibi iç organlarından TSA ve BHIA besiyerlerine yapılan ekimler sonucunda üreyen bakteriler 1 mm çapında beyaz renkli yuvarlak koloniler meydana getirmiştir.

Deneysel enfeksiyon sonrasında hasta alabalıklardan re-izole edilen bakteriler Gram pozitif boyanma özelliği gösteren (Şekil 4. 16), kapsüllü (Şekil 4. 17), hareketsiz, kısa zincir oluşturan, ovoid hücre yapısına sahip bakterilerin sitokrom oksidaz testinde negatif reaksiyon verdiği, % 5 koyun kanı içeren agarda alfa hemolitik aktivite gösterdiği (Şekil 4. 18) ve eskulini hidrolize ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4. 19).



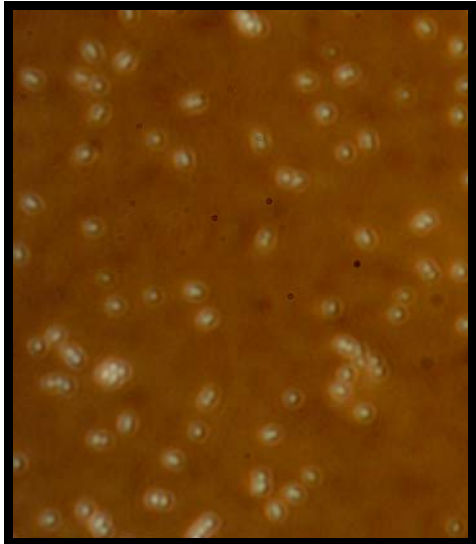
(A)



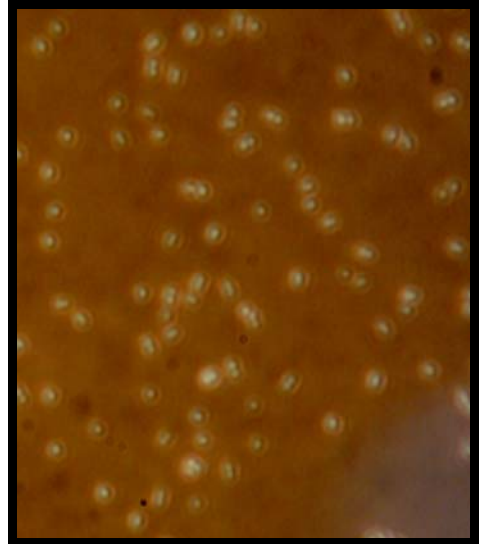
(B)

Şekil 4. 16: Gram (+) boyanma özelliği gösteren kısa zincirler oluşturan ovoid hücre morfolojisine sahip bakteri hücreleri x 400

(A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş



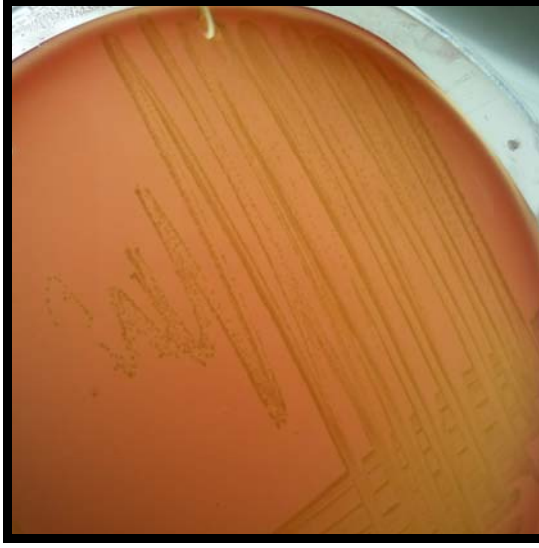
(A)



(B)

Şekil 4. 17: Re- izole edilen bakterilerin siyah zemin üzerinde boşluklar şeklinde görülen kapsül varlığı x 400

A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş



(A)



(B)

Şekil 4. 18: Re- izole edilen bakterilerin %5 koyun kanı içeren agarda alfa hemolitik zon oluşumu (A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş



(A)



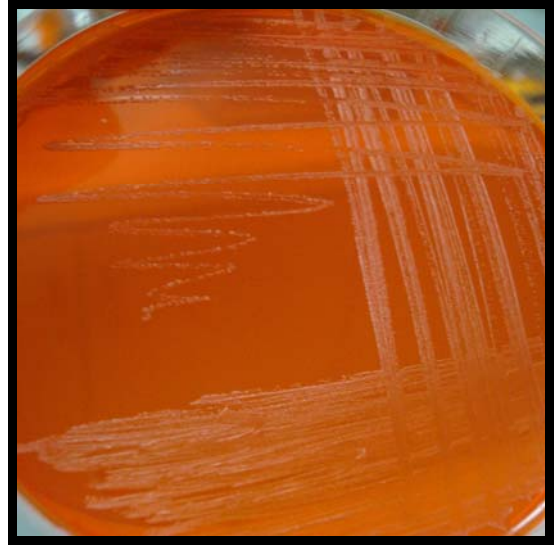
(B)

Şekil 4. 19: Re- izole edilen patojen bakterilerde siyah renkli eskulin hidrolizi (A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş

Ayrıca Lancefield grup C *Sterptococcus dysgalactiae* subsp. *gysgalactiae* (GCSD) ve *L. garvieae*'nin ayırımında kullanılan TH- CR (Todd-Hewitt Kongo Red) agar besiyerinde re-izole edilen patojen bakterilerin beyaz renkli koloniler oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4. 20).



(A)



(B)

Şekil 4. 20: Re- izole edilen patojen bakterilerin TH- CR agar besiyerinde oluşturduğu beyaz koloniler (A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş

Yerli ve referans *L. garvieae* suşları ile deneysel olarak enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarının visceral organlarından re-izole edilen bakterilerin identifikasyonu amacı ile yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin sonuçları tablo 4. 1' de verilmiştir. Bu test sonuçlarına göre re-izolatlar *Lactococcus garvieae* olarak identifiye edilmiştir.

Tablo 4. 1: Enfekte alabalıklardan re-izole edilen bakteri suşlarına ait morfolojik, fiziksel ve biyokimyasal testlerin sonuçları

Özellikler	Yerli <i>L.garvieae</i> suşu	Referans <i>L.garvieae</i> suşu	Özellikler	Yerli <i>L.garvieae</i> suşu	Referans <i>L.garvieae</i> suşu
Hücre morfolojisi	ovoid	ovoid	Arjinin Dekarboksilazı	+	+
Gram Boyama	+	+	Ornitritin Dekarboksilazı	-	-
Hareket	-	-	Lizin Dekarboksilazı	-	-
Kapsül Varlığı	+	+	Karbonhidrat Fermantasyon Testleri		
Sitokrom Oksidaz varlığı	-	-	İnositol	-	-
Katalaz Varlığı	-	-	Arabinoz	-	-
% 5 Kanlı Agarda Üreme	α	α	Laktoz	-	-
% 1.5 NaCl içeren NB' da üreme	+	+	Mannitol	+	+
% 6.5 NaCl içeren NB' da üreme	+	+	Maltoz	+	+
20 °C' de üreme	+	+	Salisin	+	+
37 °C' de üreme	+	+	Mannoz	+	+
45 °C' de üreme	+	+	Sükroz	+	+
0/F	F	F	Galaktoz	-	-
Nitrat reduksiyonu	-	-	TCBS Besiyerinde Üreme	-	-
Simon's Sitrat vasatında üreme	-	-	BHIA Besiyerinde Üreme	+	+
H ₂ S Üretimi	-	-	TSA Besiyerinde Üreme	+	+
Koagülaz Varlığı	-	-	NB Besiyerinde Üreme	+	+
Üre	-	-	THB Besiyerinde Üreme	+	+
İndol Üretimi	-	-	MacConkey' de Üreme	-	-
Metil Kırmızısı testi	+	+	TH-CR' de Üreme	beyaz	beyaz
Voges-Proskauer testi	+	+	CA' da Üreme	pembe	pembe
Eskulin hidrolizi	+	+	O/129 (10 g)	S	S
Jelatin hidrolizi	-	-	O/129 (150 g)	S	S
Nişasta hidrolizi	-	-	ONPG	-	-

+: Pozitif reaksiyon

-: Negatif reaksiyon

S: Duyarlı

F: Fermentatif

4.4.2. Hızlı Tanı Kitlerine Ait Bulgular

4.4.2.1. API 20 STREP Kiti ile Re-izolatların İdentifikasyonuna Ait Bulgular

Yerli ve referans *L. garvieae* suşları ile inoküle edilmiş kitler 36 °C sıcaklıkta 4 saat inkübe edildikten sonra kit ayıraçları damlatılmış ve renk değişimi gözlenmiştir (Şekil 4. 21). Şeker testlerinden laktoz şekerinin kullanımı her iki izolat için 4 saatlik inkübasyonda negatif sonuç vermiştir. Ancak tüm şeker testlerinin sonuçları 24 saatlik inkübasyon sonrasında değerlendirilmiş ve her iki izolat için laktozun kullanımının pozitif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 22). Tüm testler renk değişimine göre pozitif ve negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4. 2).

Tablo 4. 2: Deneysel olarak enfekte edilen alabalıklardan re- izole edilen bakterilere ait API 20 STREP profilinin sonuçları (24 saatlik inkübasyon)

API 20 STREP Profil Testleri	Yerli suş	Referans suş	API 20 STREP Profil Testleri	Yerli suş	Referans suş
Voges- Proskauer	+	+	D-riboz asidifikasyonu	+	+
Purik asit hidrolizi	+	+	L- arabinoz asidifikasyonu	-	-
β glukozidaz hidrolizi	+	+	D-mannitol asidifikasyonu	+	+
PYRolidonil arylamidaz	+	+	D- sorbitol asidifikasyonu	-	-
α - galaktozidaz	-	-	D- laktoz asidifikasyonu	+	+
β -glukoronidaz	-	-	D- trehaloz asidifikasyonu	+	+
β -galaksidaz	-	-	İnulin asidifikasyonu	-	-
Alkale fosfataz	-	-	D- rafinoz asidifikasyonu	-	-
Lökin amino peptidaz	+	+	Nişasta	+	+
Arjinin Dehidrolaz	+	+	Glikojen	-	-

(+) : Pozitif reaksiyon

(-) : Negatif reaksiyon



(A)



(B)

Şekil 4. 21: Deneysel olarak enfekte edilen alabalıklardan re- izole edilen bakterilere ait API 20 STREP profili (4 saatlik inkübasyon)

(A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş



(A)



(B)

Şekil 4. 22: Deneysel olarak enfekte edilen alabalıklardan re- izole edilen bakterilere ait API 20 STREP profili (24 saatlik inkübasyon)

(A): Re- izole edilen yerli suş (B): Re-izole edilen referans suş

4.4.2.2. API ZYM Kiti ile Re-izolatların İdentifikasyonuna Ait Bulgular

Re-izole edilen yerli ve referans suşlarla inoküle edilmiş kitler 36 °C sıcaklıkta 24 saat inkübe edildikten sonra kit ayıraçları damlatılmış ve renk değişimi gözlenmiştir (Şekil 4. 23). Bu renk değişimine göre pozitif ve negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiş ve

L. garvieae' nin API ZYM profili çıkarılmıştır. Yerli olan suşun N-asetil – α -glucosaminidase enzimine sahip olduğu ancak referans suşun bu enzime sahip olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4. 3).

Tablo 4. 3: Yerli ve referans *L. garvieae* suşlarına ait re- izolatların API ZYM profilinin sonuçları

API ZYM Profil Testleri	Yerli suş	Referans suş	API ZYM Profil Testleri	Yerli suş	Referans suşu
Kontrol	-	-	Asit Fosfataz	+	+
Alkalen Fosfataz	-	-	Naphthhol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+
Esteraz	+	+	α - galaktosidaz	-	-
Esteraz Lipaz	+	+	β - galaktosidaz	-	-
Lipaz (C 14)	-	-	β -glucuronidase	-	-
Leucine Arylamidase	+	+	α - glucosidase	+	+
Valine Arylamidase	+	+	β - glucosidase	+	+
Cystine arylamidase	+	+	N-asetil– α -glucosaminidase	+	-
Trypsine	+	+	α - mannosidaz	-	-
Alfa-chymotrypsin	+	+	α - fucosidase	-	-

(+) : Pozitif reaksiyon

(-) : Negatif reaksiyon



(A)

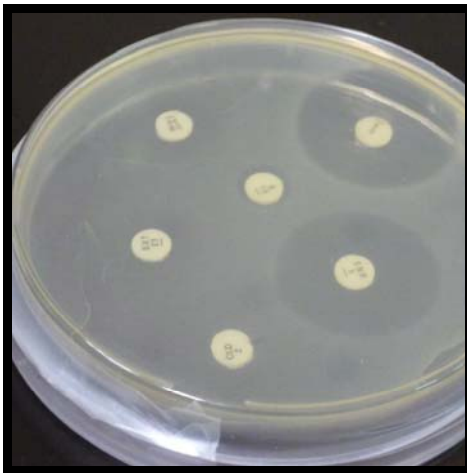


(B)

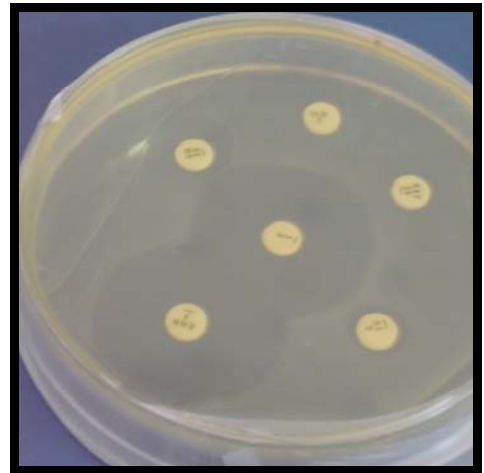
Şekil 4. 23: Yerli ve referans *L. garvieae* suşlarına ait re- izolatların API ZYM profili
(A): Yerli suş (B): Referans suş

4.5. ANTİBİYOGRAM DUYARLILIK TESTİNE AİT BULGULAR

Yerli ve referans *L. garvieae* suşlarının antibiyogram testinde 12 farklı antibiyotik kullanılmıştır. Her iki suşun sulphamethoxazole ve clindamycine dirençli, ayrıca yerli olan suşun ciprofloxacin' e dirençli olduğu tespit edilmiştir. Yapılan antibiyogram testine göre her iki suşun en duyarlı olduğu antibiyotiğin chloromphenicol, florfenicol ve oxytetracycline olduğu tespit edilmiştir. *L. garvieae* suşlarının antibiyotik duyarlılık testine ait sonuçlar tablo 4. 4 ve şekil 4. 24' de verilmiştir.



(A)



(B)

Şekil 4. 24: Flumequine (UB 30 µ g), Streptomycin (S 10 µ g), Sulphamethoxazole (SXT 25 µ g), Clindamycine (CLD2 µg), Enrofloxacin'e (ENR 5 µg) ait antibiyogram duyarlılık testinin sonuçları (A): Yerli suş (B): Referans suş

Tablo 4. 4: Yerli ve referans *L. garvieae* suşlarının antibiyogram test sonuçları

Antibiyogram Testinde Kullanılan Antibiyotikler	Yerli <i>L. garvieae</i> Suşu (R/S)	Referans <i>L. garvieae</i> Suşu (R/S)
Flumequine (UB 30 µ g)	S (1.7 cm)	S (1.4 cm)
Erythromycine (E 5 µ g)	S (2.9 cm)	S (3.2 cm)
Kanamycin (K 30 µ g)	S (1.3 cm)	S (1.5 cm)
Oxytetracycline (OT 30 µ g)	S (3.5 cm)	S (4.0 cm)
Ciproflaxacin (CIP 1 µ g)	R (0 cm)	S (1.7 cm)
Ampicillin (AMP 10 µ g)	S (3.4 cm)	S (3.1 cm)
Sulphamethoxazole (SXT 25 µ g)	R (0 cm)	R (0 cm)
Streptomycin (S 10 µ g)	S (1.0 cm)	S (1.0 cm)
Chloromphenicol (C 30 µ g)	S (3.5 cm)	R (4.0 cm)
Clindamycine (CLD2 µg)	R (0 cm)	R (0 cm)
Enrofloxacin (ENR 5 µg)	S (2.5 cm)	S (3.0 cm)
Florfenicol (FFC 30 µg)	S (4.1 cm)	S (3.6 cm)

4.6. LAM AGLÜTİNASYON TESTİNE AİT BULGULAR

Hazırlanan somatik “O” antijeni ve tüm bakteri hücresi ile hasta balıklardan elde edilen serum örneklerinin lam üzerinde sağa sola hareket ettirmek suretiyle karıştırılmasını takiben 1 dakika sonra makroskopik olarak gözle görülebilen beyaz çökelekler tespit edilmiştir (Şekil 4. 25).

Aglütinasyonun olduğu preparatlar ışık mikroskobu altında incelendiğinde antijen–antikor komplekslerinin oluşturduğu kümeleşmeler belirgin bir şekilde gözlenmiş ve pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.26). Kontrol grubundan elde edilen serum örneklerinde antijen- antikor komplekslerinin oluşturduğu beyaz çökelekler oluşmamış ve negatif reaksiyon olarak kabul edilmiştir.

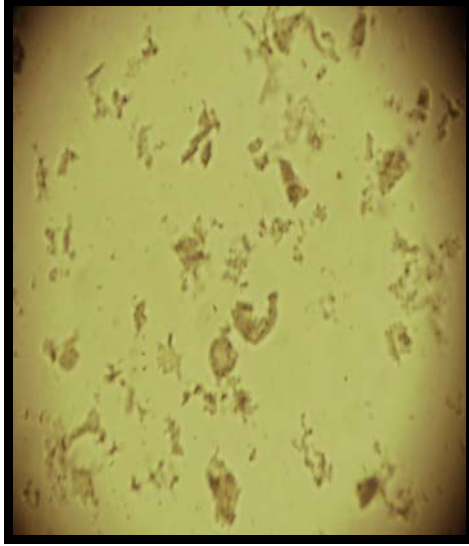


(A)

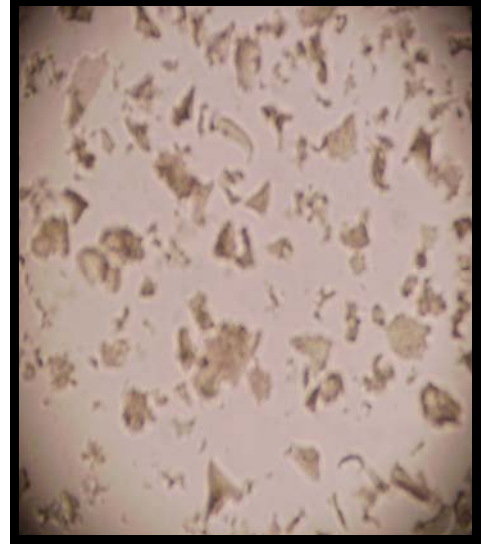


(B)

Şekil 4. 25: Enfekte balık serumunda antikorlarla *L. garvieae* antijeninin birleşerek oluşturduğu beyaz çökelekler (pozitif reaksiyon) (Çıplak gözle)
(A): Yerli suş (B): Referans suş



(A)



(B)

Şekil 4. 26: Lam aglütinasyon testinde antijen-antikor komplekslerinin oluşturduğu kümelerin ışık mikroskopunda görünümü x 400
(A): Yerli suş (B): Referans suş

4.7. IFAT' ne AİT BULGULAR

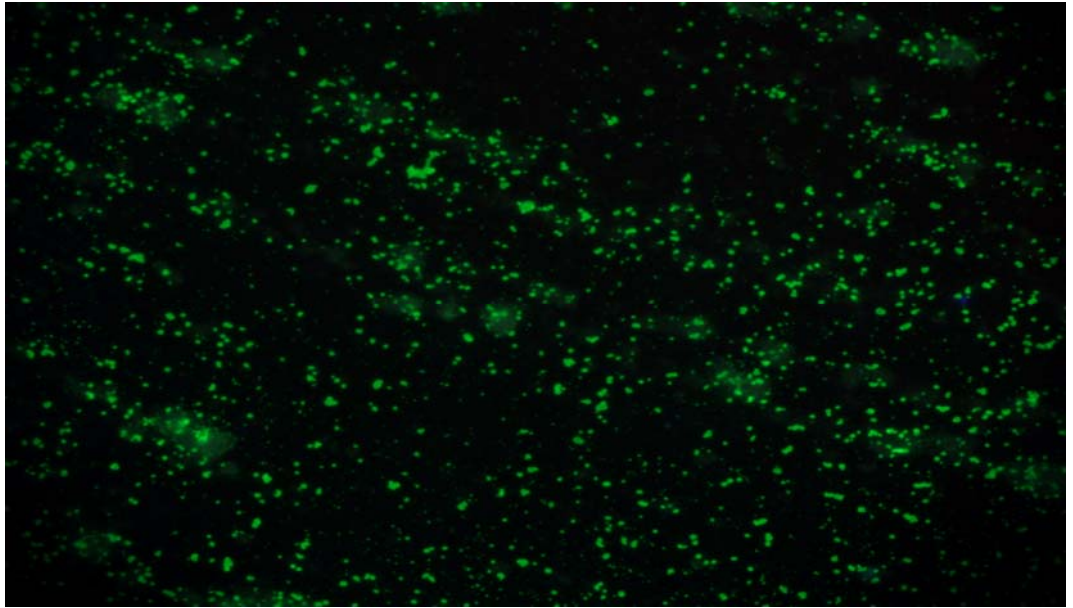
4.7.1. Enfekte Edilen Alabalık Dokularındaki Antijen Varlığına Ait Bulgular

Hasta balık dokularının fiksasyon işleminde kullanılan iki yöntemlede fiksasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği gözlenmiştir. Deneysel enfeksiyonu takiben 5. günden sonra hastalık belirtisi gösteren balıkların böbrek, dalak, karaciğer ve göz gibi farklı dokularından hazırlanan preparatlarda patojenin varlığını gösteren yeşil floresan

görünümüne sahip kok bakteriler tespit edilmiştir. Bu floresan görünümüne sahip kok bakterilerin göz ve dalak dokusuna ait preparatalarda çok yoğun olduğu ancak böbrek ve karaciğer dokularından hazırlanan preparatlarda ise daha az olduğu saptanmıştır (Şekil 4. 27; Şekil 4. 28). Ayrıca kontrol grubundaki balıkların iç organlarından hazırlanan preparatlarda floresan görünümüne rastlanmamıştır.



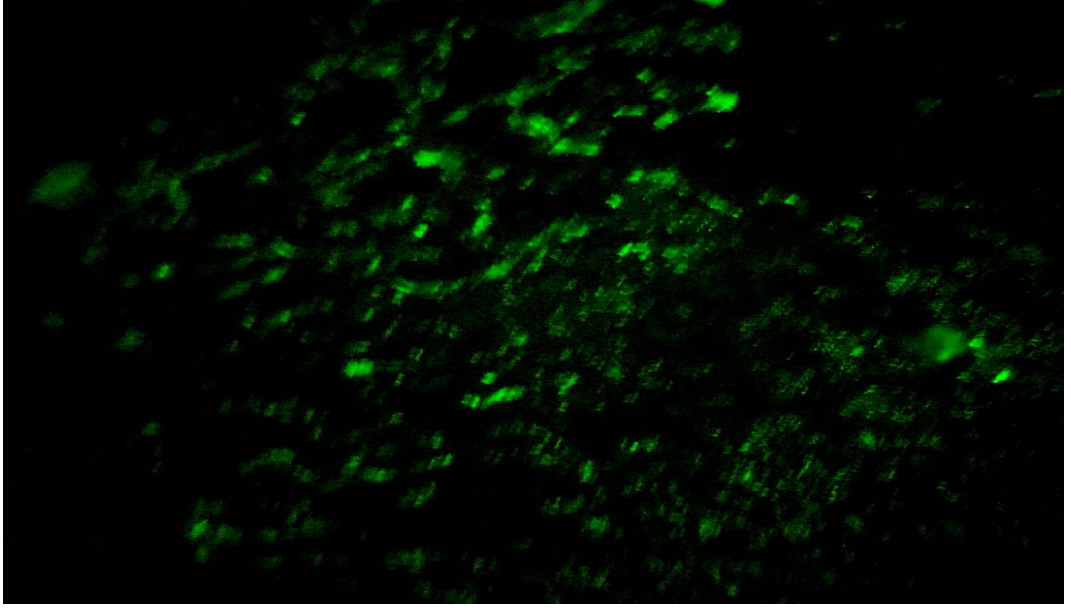
Şekil 4. 27: Yerli suş ile enfekte edilen alabalığın karaciğer dokusunda ovoid yeşil floresan görünümüne sahip kok bakterilerin varlığının floresan mikroskopta görünümü x 400



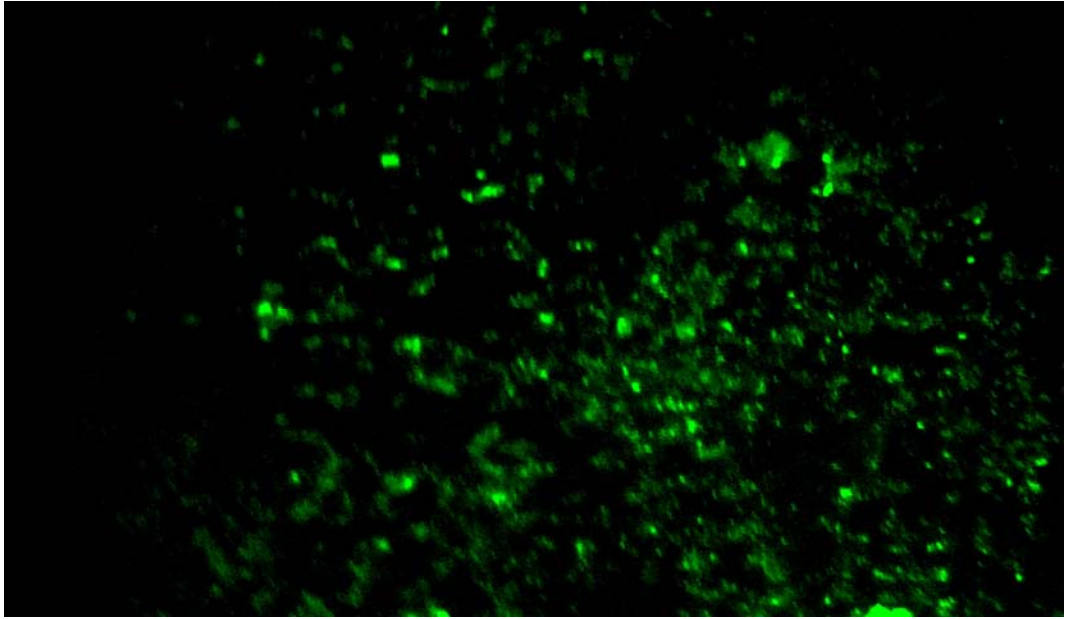
Şekil 4. 28: Referans suş ile enfekte edilen alabalığın göz dokusunda yeşil floresan görünümüne sahip kok bakterilerin varlığının floresan mikroskopta görünümü x 200

4.7.2. Enfekte Edilen Alabalık Serumundaki Spesifik Antikorların Varlığına Ait Bulgular

Enfekte edilen balıklardan elde edilen serumlardaki spesifik antikor-antijen komplekslerinin oluşturduğu floresan görünümün olduğu preparatlar pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Fiksasyon işleminde kullanılan asetonda 10 dakika tutma ile fiksasyonun daha başarılı bir şekilde gerçekleştiği gözlenmiştir. IFAT testinde her iki grupta 1. 2. ve 3. haftada antikor üretimi gözlenemezken 4. hafta da zayıf antikor oluşumunun ancak 4. haftadan sonra antikor üretiminin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4. 29, Şekil 4. 30). Kontrol grubundaki balıklardan elde edilen serum örneklerinde antijen-antikor komplekslerinin varlığını gösteren floresan ışına tespit edilememiştir.



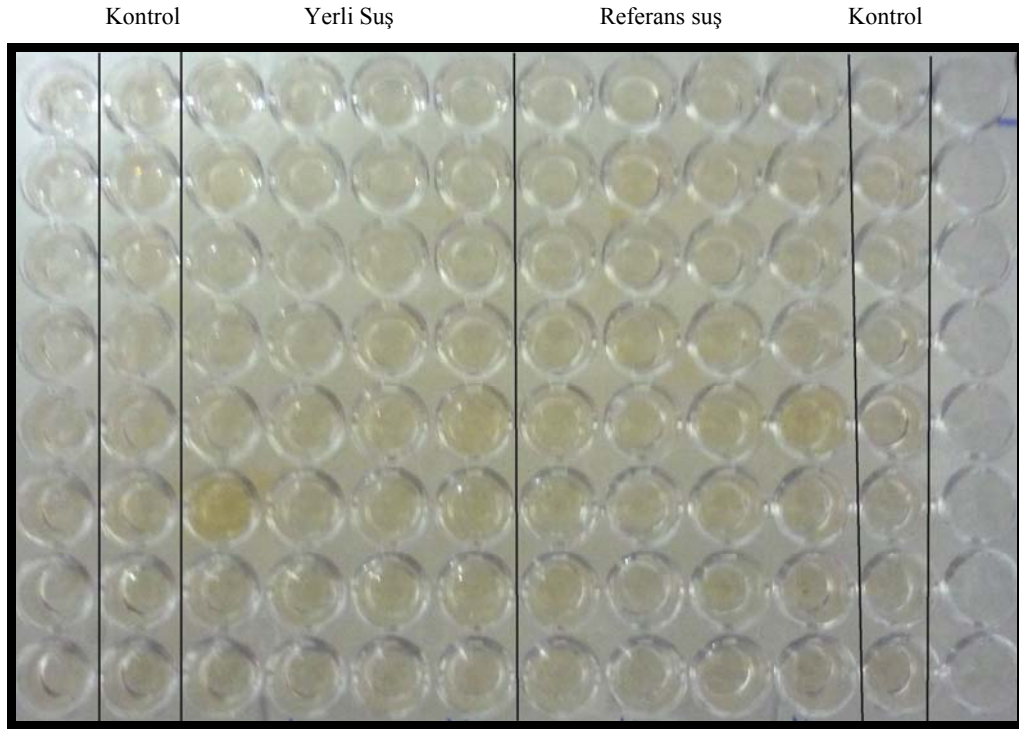
Şekil 4. 29: Yerli suş ile enfekte edilen alabalığın serumundaki spesifik antikorların *L. garvieae* antijeni ile oluşturduğu yeşil floresan görünüme sahip antijen- antikor kompleksleri x400



Şekil 4. 30: Referans suş ile enfekte edilen alabalığın serumundaki spesifik antikorların *L. garvieae* antijeni ile oluşturduğu yeşil floresan görünüme sahip antijen- antikor komplekslerinin floresan mikroskoptaki görünümü x400

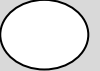
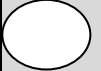
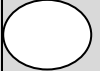
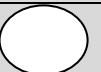
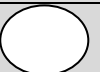
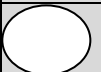
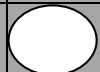
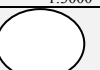
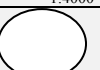
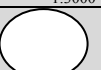
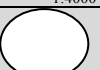
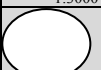
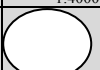
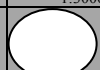
4.8. ELISA TESTİNE AİT BULGULAR

Hasta balıkların serumlarındaki antikorların varlığını göstermek için antijenle kaplı kuyucuklar önce hasta balık serumu ile ardından salmon Ig karşı geliştirilmiş poliklonal tavşan serumu sonrada peroksidazla işaretli anti-tavşan Ig konjugatı ile reaksiyona sokulmuştur. Kontrol ve hasta balıklardan elde edilen serum örnekleri kullanılarak ELISA testi gerçekleştirilmiştir. Yerli bakteri suşu ile enfekte edilen balık serum dilüsyon oranının en iyi 1/20, konjugat dilüsyon oranının 1/3000 ve antikor oranının 1/6000 olduğu referans bakteri suşu ile enfekte edilen balık serum dilüsyon oranının ise en iyi 1/20 konjugat dilüsyon oranının 1/5000 ve antikor oranının ise 1/3000 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4. 31, tablo 4. 5).



Şekil 4. 31: ELISA testinin uygulandığı plaktaki renk değişimi (koyu sarı pozitif reaksiyon)

Tablo 4. 5: ELISA testinde kullanılan dilüsyon oranları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	 PBS 1:5000 1:3000	 1:10 1:5000 1:4000	 1:10 1:5000 1:3000	 1:10 1:5000 1:4000	 1:50 1:5000 1:3000	 1:50 1:5000 1:4000	 1:50 1:5000 1:4000	 1:50 1:5000 1:3000	 1:10 1:5000 1:4000	 1:10 1:5000 1:3000	 1:50 1:5000 1:3000
B	 PBS 1:6000 1:3000	 1:10 1:6000 1:4000	 1:10 1:6000 1:3000	 1:10 1:6000 1:4000	 1:50 1:6000 1:3000	 1:50 1:6000 1:4000	 1:50 1:6000 1:4000	 1:50 1:6000 1:3000	 1:10 1:6000 1:4000	 1:10 1:6000 1:3000	 1:50 1:5000 1:4000
C	 PBS 1:7000 1:3000	 1:10 1:7000 1:4000	 1:10 1:7000 1:3000	 1:10 1:7000 1:4000	 1:50 1:7000 1:3000	 1:50 1:7000 1:4000	 1:50 1:7000 1:4000	 1:50 1:7000 1:3000	 1:10 1:7000 1:4000	 1:10 1:7000 1:3000	 1:50 1:6000 1:3000
D	 PBS 1:10000 1:3000	 1:10 1:10000 1:4000	 1:10 1:10000 1:3000	 1:10 1:10000 1:4000	 1:50 1:10000 1:3000	 1:50 1:10000 1:4000	 1:50 1:10000 1:4000	 1:50 1:10000 1:3000	 1:10 1:10000 1:4000	 1:10 1:10000 1:3000	 1:50 1:6000 1:4000
E	 PBS 1:5000 1:3000	 1:20 1:5000 1:4000	 1:20 1:5000 1:3000	 1:20 1:5000 1:4000	 1:100 1:5000 1:3000	 1:100 1:5000 1:4000	 1:100 1:5000 1:4000	 1:100 1:5000 1:3000	 1:20 1:5000 1:4000	 1:20 1:5000 1:3000	 1:50 1:7000 1:3000
F	 PBS 1:6000 1:3000	 1:20 1:6000 1:4000	 1:20 1:6000 1:3000	 1:20 1:6000 1:4000	 1:100 1:6000 1:3000	 1:100 1:6000 1:4000	 1:100 1:6000 1:4000	 1:100 1:6000 1:3000	 1:20 1:6000 1:4000	 1:20 1:6000 1:3000	 1:50 1:7000 1:4000
G	 PBS 1:7000 1:3000	 1:20 1:7000 1:4000	 1:20 1:7000 1:3000	 1:20 1:7000 1:4000	 1:100 1:7000 1:3000	 1:100 1:7000 1:4000	 1:100 1:7000 1:4000	 1:100 1:7000 1:3000	 1:20 1:7000 1:4000	 1:20 1:7000 1:3000	 1:50 1:10000 1:3000
H	 PBS 1:1000 1:3000	 1:20 1:10000 1:4000	 1:20 1:10000 1:3000	 1:20 1:10000 1:4000	 1:100 1:10000 1:3000	 1:100 1:10000 1:4000	 1:100 1:10000 1:4000	 1:100 1:10000 1:3000	 1:20 1:10000 1:4000	 1:20 1:10000 1:3000	 1:50 1:10000 1:4000

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İlk defa 1988 yılında İspanyadaki bir alabalık işletmesindeki balıklarda görülen (Palacios ve diğ., 1993) ve yüksek mortalite ile seyreden lactococcosis daha sonra Güney Afrika (Carson ve diğ., 1993), İtalya (Ghittino ve Prearo, 1992), Bulgaristan (Eyngor ve diğ., 2004), Fransa (Eyngor ve diğ., 2004), Yunanistan (Savvidis ve diğ., 2007), İran (Soltani ve diğ., 2008), İngiltere (Bark ve McGregor, 2001), Potekiz (Pereira ve diğ., 2004), İsrail (Eyngor ve diğ., 2004), Kore (Baeck ve diğ., 2006), Tayvan (Chen ve diğ., 2002) ve ABD (Evans, Klesius ve Shoemaker, 2009) gibi dünyanın diğer ülkelerindeki işletmelerde epizootikler oluşturduğu bildirilmiştir. Türkiye’ de ilk olarak bu hastalık 2002 yılında Ege Bölgesindeki bir alabalık işletmesinde tespit edildiği bildirilmiştir (Diler ve diğ., 2002). Daha sonra bu hastalık ülkemizde Konya ve çevresinde (Kav ve Erganis, 2007), Akdeniz Bölgesinde (Özer ve diğ., 2008; Tanrıkul ve Gültepe, 2011), Karadeniz Bölgesinde (Türe ve Savaş, 2010) Ege Bölgesinde (Altun ve diğ., 2004; Avcı ve diğ., 2010) işletmelerde ekonomik kayıplara neden olan bir sorun haline gelmiştir.

Akut epizootiklerde gökkuşağı alabalıklarında görülen tek veya çift taraflı ekzoftalmus ve korneada opaklaşma, deride hiper pigmentasyon, yüzgeç tabanında hemorajiler, karaciğerin açık sarı bir renk alması, splenomegali, hiperemik olan sindirim kanalının jelatinöz bir sıvı içerdiği, karaciğer, dalak, böbrek, yüzme kesesi ve bağırsak gibi viseral organlarda yoğun hiperemi ve hemorajiler gibi tipik klinik belirtiler (Kusuda ve Salati, 1999; Diler ve diğ., 2002; Altun ve diğ., 2005, Avcı ve diğ., 2010) bu çalışmada deneysel olarak enfekte edilen her iki deneme grubundaki balıklarda da gözlenmiştir.

L. garvieae ile enfekte gökkuşağı alabalıklarında karaciğerde peteşiyal hemorajilerle birlikte hiperemi, hepatositlerde mikrovasküler değişiklikler; böbrek venalarında genişleme, tübüler epitelyumda nekroz; dalakta hemorajik odaklar ve nekroz; solungaçlarda epiteliyal hipertrofi ve solungaç lamelalarında erime gibi histopatolojik

değişikliklerin olduğunu bildirmesine (Altun ve diğ., 2005) rağmen bu çalışmada yerli ve referans suş ile enfekte alabalıkların böbrek tübül epitellerinde dejenerasyon ve nekroz yanı sıra multifokal liquefactive (erime) nekroz odakları, periglomerular ödem, interrenal haemopoietik dokuda boşalma ve melanomakrofaj odaklarında artma; solungaç filamentlerinde hemorajik odaklar, talengectiaaisis ve solungaç epitelyum hücrelerinde hiperplazi; dalakta multifokal liquefactive nekroz odakları; karaciğerde multifokal liquefactive nekroz, hepatositlerde diffüz dejenerasyon ve nekroz ve kan damarlarının içinde trombosit yığınakları gözlenmiştir. Enfekte alabalıkların doku Gramı ile boyanan bağırsak kesitlerinde lamina propria mor renge boyanmış ovoid hücre morfolojisine sahip Gram pozitif bakteri kümeleri ve göz kesitlerinde ise Avcı ve diğ. (2010) bildirdiği gibi retina altında hemorajik odaklar tespit edilmiştir.

Sarı kuyruk balıklarında intraperitoneal olarak oluşturulan deneysel enfeksiyon çalışmasında 2-3 gün sonra hastalık septomları görülürken (Itami ve diğ., 1996) kefal balıklarında (*M. cephalus*) ilk hastalık belirtisinin 2 gün içinde görüldüğü ve %100 oranında mortaliteye neden olduğu rapor edilmiştir (Chen ve diğ., 2002). Yapılan bir diğer çalışmada deneysel olarak enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarında inokulasyondan 3 gün sonra ilk hastalık belirtisinin ve ölümlerin görüldüğü tespit edilmiştir (Muzquiz ve diğ., 1999). Gökkuşağı alabalıklarında deneysel enfeksiyon oluşturarak farklı su sıcaklıkların streptococcosis'in mortalite üzerine etkisi araştırılmış ve su sıcaklığı 18 °C' yi aştığında (21- 24 °C) mortalitenin % 100 olduğu rapor edilmiştir (Munday, Jack ve Schmidtke, 1993). Bu çalışmada referans ve yerli *L. garvieae* suşu ile deneysel olarak enfekte edilen ve 17 ± 1 °C su sıcaklığında tutulan her iki deneme grubundaki balıklarda 5. günün sonunda ölümlerin başladığı, yerli suş ile enfekte alabalıklarda 34. günde mortalite oranının % 96 olduğu, referans suş ile enfekte alabalıklarda %84 olduğu tespit edilmiştir. Ancak lactococcosis' in doğal epizootiklerinde ise alabalık popülasyonun % 50- 80' inin kaybına neden olduğu bildirilmektedir (Ghittino ve Prearo, 1992; Diler ve diğ., 2002).

TSA ve BHIA besiyerlerinde 1 mm çapında beyaz koloniler meydana getiren, Gram pozitif ve ovoid hücre morfolojisine sahip re-izole edilen *L. garvieae* suşlarının kapsül içerdiği, sitokrom oksidaz ve katalaz testinde negatif reaksiyon verdiği, O/F glukoz ortamında fermentatif özelliğe sahip olduğu, eskulini hidrolize ettiği, % 6.5 NaCl

içeren vasatta ürediği ancak %8 NaCl içeren vasatta üremediği, 45 °C’ de üreme yeteneğine sahip olduğu ve *L. garvieae*’ ye ait diğer araştırmacılarında (Krieg ve Holt, 1994; Romalde ve Toranzo, 2002; Diler ve diğ., 2002; Buller, 2004; Çağırğan, 2004; Vendrel ve diğ., 2006; Sharifiyazdi ve diğ., 2010; Tanrikul ve Gültepe, 2011) bildirdiği biyokimyasal özellikleri gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada re- izole edilen *L. garvieae* suşlarının API 20 STREP profilinde Eldar ve diğ., (1999) ve Vela ve diğ., (2000) yapmış olduğu çalışmadan farklı olarak nişastayı ve hippuratu hidrolize ettiği tespit edilmiştir. Ancak Çağırğan (2004) Türkiye’ den izole edilen *L. garvieae* suşlarının Japon, Avusturalya ve İtalya suşlarından farklı olarak hippuratu hidrolize ettiğini bildirmiştir. Bu çalışmada konvansiyonel bakteriyolojik yöntemle yapılan nişasta hidroliz testi negatif sonuç verdiği halde API 20 STREP kitinde pozitif reaksiyon verdiği gözlenmiş bu tanı kitinin kullanımının konvansiyonel yöntemlerle desteklenmesinin gerektiği anlaşılmaktadır.

Bakterilerin enzim aktivitesini saptayarak identifikasyonun yapılması amacıyla kullanılan API ZYM kiti ile re- izole edilen suşların API ZYM profilleri çıkarıldığında referans *L. garvieae* suşunun yerli suştan farklı olarak N-asetil – α -glucosaminidase enzimine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç daha önce hasta pisi balıklarından izole edilen *L. garvieae* suşlarının enzim aktivitesine benzerlik göstermektedir (Baeck ve diğ., 2006).

Disk diffüzyon yöntemine göre uygulanan antibiyogram testinde re- izole edilen yerli ve referans *L. garvieae* suşlarının chloromphenicol, florfenicol ve oxytetracycline karşı duyarlı olduğu ve hastalığın tedavisinde kullanılabileceği tespit edilmiştir. Geçmiş yıllarda *L. garvieae* ve *L. lactis* ssp. *lactis* türlerinin ayırımında kullanılan clindamycin (CLD 2 μ g) antibiyotiğine *L. garvieae*’ nin dirençli olduğu *L. lactis* ssp. *lactis*’ in ise duyarlı olduğu (Elliot ve Facklam, 1996) olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da suşların clindamycin’ e (CLD 2 μ g) dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada deneysel olarak enfekte edilen alabalıkların serumundaki spesifik antikorların varlığı tespit etmek için lam aglütinasyon, IFAT ve ELISA gibi serolojik

testlerin yanı sıra patojenin dokudaki varlığını göstermek için IFAT başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Balık hastalıklarında hızlı sonuç veren pratik bir serolojik test olan aglütinasyon testi furunkulosis (Rabb ve diğ., 1964; Michel ve Faivre, 1982), edwardiellosis (Amandi ve diğ., 1982), streptococcosis (Kitao, 1982a), kolumnaris hastalığı (Anacker ve Ordal 1959) gibi bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde; *Vibrio anguillarum* (Kitao ve diğ., 1983; Sorensen ve Larsen, 1986; Knappskog ve diğ., 1993), *Aeromonas sobria* ve *A. hydrophila* (Leblanc ve diğ., 1981); *Yersinia ruckeri* (Davies, 1990; Kubilay ve Diler, 1998); *L. garvieae* (Palacios ve diğ., 1993; Diler ve diğ., 2002; Çağırğan, 2004) gibi bakteriyel balık patojenlerinin serotiplendirilmesinde; *A. salmonicida* (Krantz ve diğ., 1963), *Yersinia ruckeri* (Kubilay ve Timur, 2001), *V. anguillarum* (Çamlıbel, 2002) ile immünize edilen balıklarda aşılama sonrasında antikor varlığının araştırılması amacıyla sıklıkla kullanılmıştır.

Bu çalışmada deneysel olarak *L. garvieae* ile enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarında lactococcosis' in teşhisi için lam aglütinasyon testi uygulanmıştır. Her iki deneme gruptaki enfekte alabalık serumlarında oluşan spesifik antikorların varlığı antijen-antikor komplekslerinin oluşturduğu kümeleşme nedeniyle gerek çıplak gözle gerekse mikroskop altında belirgin bir şekilde gözlenmesiyle anlaşılmıştır (Anderson, 1974; Toranzo ve diğ., 1987; Anderson, 1990; Timur ve Timur 2003; Austin ve Austin, 2007) Ayrıca bu serolojik test yerli ve referans her iki suşun anti- kapsüllü bakteri serumu (KG-) ile aglütine olmaları nedeniyle fenotipik olarak kapsüllü *L. garvieae* olduklarını da göstermiştir. Zira anti- kapsüllü bakteri serumu ile kapsüllü bakteri reaksiyona girdiğinde aglütinasyon oluşturdıkları bildirilmektedir (Kitao 1982,1993; Yoshida ve diğ., 1997; Ooyama ve diğ., 2002; Kang ve diğ., 2004; Çağırğan, 2004). Lam aglütinasyon testinin lactococcosis' in teşhisinde kullanılabilecek çok kısa bir sürede gerçekleştirilen maliyeti düşük, pratik bir serolojik test olduğu, ancak identifikasyon amacıyla uygulandığında kullanılan anti-serumun (KG -, KG +) kapsüllü veya kapsülsüz olma özelliğinin dikkate alınması gerektiği tespit edilmiştir.

Lam aglütinasyon testi çok kısa sürede gerçekleşen ve en çok kullanılan serolojik test olmasına rağmen bazı çapraz reaksiyonlar vermesi nedeniyle sadece bakteriyel balık

hastalıklarının teşhisinin onaylanması amacıyla kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Schiil ve diğ., 1989).

Günümüzde insan ve veteriner hekimlikte yaygın bir şekilde kullanılan Floresan Antikor Tekniği (FAT) (Ağaçfıdan ve Badur, 2002; Us, 2006) bakteriyel ve viral balık hastalıklarının teşhisinde kullanılarak hem dokudaki patojenin hemde serumdaki spesifik antikorların varlığı araştırılmakta böylece hastalıkların teşhisi yapılmaktadır. Balık hastalıklarının teşhisinde kısa sürede sonuç alındığından dolayı sıklıkla tercih edilmektedir (Anderson, 1974; Eurell ve diğ., 1978; Busch, 1981; Anderson, 1990; Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004; Austin ve Austin, 2007).

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda IFAT ve FAT' nin BKD (Bakteriyel Böbrek Hastalığı) (Bullock ve Stuckey, 1975; Bullock ve diğ., 1977; Paterson ve diğ., 1979; Laidler, 1980; Austin ve diğ., 1985; Meyers ve diğ., 1993a, b), streptococcosis (Klesius ve diğ., 2006), furunkulosis (Lewis ve Savage, 1972; Lallier ve diğ., 1990), hareketli *Aeromonas septisemi* (Lewis ve Allison, 1971), Enterik kızıl ağız hastalığı (Johnson ve diğ., 1974), bakteriyel soğuk su hastalığı (Lorenzen ve Karas, 1992; Delen, 2007), edwardsiellosis (Amandi ve diğ., 1982; Ainsworth ve diğ., 1986) ve vibriosis (Nelson ve diğ., 1985b) gibi bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde başarılı bir şekilde kullanıldığı rapor edilmiştir.

Bu çalışmada IFAT ile her iki deneme grubundaki alabalık dokularında Kang ve diğ.' nin (2004) bildirdiği gibi yeşil renkli floresan görünüme sahip ovoid hücrelerin yanı sıra enfekte alabalıklardan elde edilen serum örneklerinde diğer araştırmacılarında bildirdiği gibi (Lewis ve Savage, 1972; Anderson, 1990; Kubilay ve Timur, 2001; Delen, 2007) yeşil renkli floresan görünüme sahip antijen- antikor kompleksleri tespit edilmiştir.

IFAT testinin fiksasyon aşamasında kullanılan % 3' lük paraformaldehit ve % 100 metanol ile fiksasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Farklı dilüsyon oranlarında inkübe edilen preparatlarda en iyi sonucu veren dilüsyon oranlarının sırasıyla anti- *L. garvieae* poliklonal tavşan antikoruna 1/200, anti-tavşan Ig G FITC konjugatı 1/100 oranında olduğu saptanmış ayrıca bu dilüsyon oranlarının daha önce yapılmış bir araştırmadaki sonuçlara (Kang ve diğ., 2004) benzerlik gösterdiği

tespit edilmiştir. Ovoid hücre yapısına sahip patojenin en çok göz ve dalak dokularında bulunduğu tespit edilirken, bu oranın böbrek ve karaciğer dokusunda daha az olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar patojenin balık dokusunda yerleştiği organ hakkında daha önce yapılan çalışmaları desteklemektedir (Carson ve diğ., 1993; Carson ve Statham, 1993; Nieto ve diğ., 1995; Eldar ve diğ., 1996; Austin ve Austin 1999; Altun ve diğ., 2005; Savvidis ve diğ., 2007; Soltani ve diğ., 2008; Kav ve Erganis, 2008, Sharifiyazdi ve diğ., 2010; Avcı ve diğ., 2010). IFAT ile her iki gruptaki deneme balıklarında 1. 2. ve 3. haftada balık serumlarında antikor üretimi tespit edilememiş, 4. haftada antikor oluşumu zayıf 4. haftadan sonra ise arttığı tespit edilmiştir.

Son yıllarda insan ve sıcak kanlı hayvan enfeksiyonlarının teşhisinde geniş bir kullanım alanı bulan ELISA balık hastalıklarının teşhisinde de geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Austin ve diğ., 1986; Hsu ve diğ., 1991; Biosca ve diğ., 1997; Cossarini- Dunier, 1985; Waterstrat ve diğ., 1989; Earlix ve diğ., 1996).

Balıklardaki humoral antikor yanıt ile ilgili daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda ELISA testinin çok sayıda serum örneğinin hızlı bir şekilde incelenmesini mümkün kılan, duyarlı ve ucuz bir metot olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Roberson, 1981; McArthur ve Sengupta, 1982; Bortz, 1984; Chart, Pearson, ve Trust, 1984; Cossarini-Dunier, 1985)

Shelby ve diğ. (2002) Nil tilapia balıklarında (*Oreochromis niloticus*) *Streptococcus iniae* enfeksiyonuna karşı oluşan humoral yanıtı indirek ELISA tekniği kullanılarak ölçmüşlerdir. ELISA test sonuçlarının aglütinasyonla büyük oranda ilişkili olduğunu tespit etmişler ayrıca ELISA testinin mikro aglütinasyon testine göre daha az miktarda serum örneği ve daha kısa sürede gerçekleştiği için daha avantajlı bir teknik olduğu saptanmışlardır. ELISA testinde plate okuyucu ile kantitatif değerlerin alındığı böylece aglütinasyonun kendine has görsel gözlem öznelliğini elimine ettiğini vurgulamışlardır.

ELISA testi ile az miktarda serum (1 µl) ile humoral antikorların varlığının yaklaşık üç saatte ispatlanabileceği ve dolayısıyla hastalık teşhisinde yapılacağı bildirilmiştir (Shoemaker, Shelby ve Klesius, 2003). Ayrıca sonuçlar kantitatif olduğu için yüksek veri avantajına sahip olduğu bu nedenle diğer bir serolojik teknik olan FAT' a göre daha

kompleks bir teknik olduğu bildirilmiştir (Boulot ve diğ., 1989; Rose ve diğ., 1989; Adams ve Thompson, 1990; Cochenec ve diğ., 1992; Adams, 2004).

Bu çalışmada deneysel olarak enfekte edilen balıkların serumundaki spesifik antikorların varlığı ELISA testi ile araştırılarak lactococcosis' in teşhisi yapılmıştır. Farklı dilüsyon oranlarında inkübe edilen plakta yerli bakteri ile enfekte edilen balık serum dilüsyon oranının en iyi 1/20, konjugat dilüsyon oranının 1/3000 ve antikor oranının 1/6000 olduğu referans bakteri ile enfekte edilen balık serum dilüsyon oranının ise en iyi 1/20 konjugat dilüsyon oranının 1/5000 ve antikor oranının ise 1/3000 olduğu tespit edilmiştir. Reaksiyon sonrasında koyu sarı rengin oluşumu diğerk araştırmacılarında (Arkoosh ve Kaattari, 1990; Timur ve Timur, 2003; Ağaçfıdan ve Badur, 2002; Uř, 2006; Austin ve Austin, 2007) bildirdiğı gibi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada yurdumuzda ve dünyanın birçok ülkesinde görülen lactococcosis' in etkeni olan *L. garvieae* suşları ile gökkuşağı alabalığı intraperitoneal olarak enfekte edilmiş alabalıklarda yerli ve referans bakterinin inkübasyon süresinin 5 gün olduğu, mortalite oranının ise yerli suşla enfekte edilen balıklarda % 96, referans suşla enfekte balıklarda ise % 84 olduğu tespit edilmiştir. Enfekte balıklardan re- izole edilen suşların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri konvansiyonel bakteriyolojik yöntem ve API 20 STREP, API ZYM hızlı tanı kitleri kullanılarak yapılmış ayrıca konfirmasyon amaçıyla hasta balıklardan elde edilen doku örnekleri histopatolojik olarak incelenmiştir. Bu çalışmada kültür balıklarında epizootik oluşturan *L. garvieae*' nin neden olduğu lactococcosis' in teşhisinin konvansiyonel bakteriyolojik yöntemeye göre daha kısa sürede sonuç alınan lam aglütinasyon, IFAT ve ELISA gibi serolojik teknikler kullanılarak yapılabileceğı tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- ABDELSALAM, M., NAKANISHI, K., YONEMURA, K., ITAMI, T., CHEN, S. C., YOSHIDA, T., 2009, Application of Congo Red Agar for detection of *Streptococcus dysgalactiae* isolated from disease fish, J. Appl. Ichthyol. 25, 442-446.
- ADAMS, A., THOMPSON, K.D., 1990, Development of an ELISA for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue. J. Aquat. Animal Health 2: 281-288.
- ADAMS., A., 2004, Immunodiagnostics in Aquaculture. Bull. Euro. Assoc. Fish Pathol. 24, 33-37.
- ADAMS, A., AOKI, T., BERTHE, F., J., GRISEZ, L., KARUNASAGAR, I., 2008, Recent Technological Advancements on Aquatic Animal Health and Their Contributions Toward Reducing Disease Risks - a Review, pp. 71-88. In Bondad-Reantaso, M.G., Mohan, C.V., Crumlish, Margaret and Subasinghe, R.P. (eds.). Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
- AFONSO, A., SILVA, J., GOMES, S., 2003, *Lactococcus garvieae* trout infections in Portugal: a new challenge on fish vaccinology, IBMC News.
- AGUIRRE, M., COLLINS, M.D., 1993, Lactic acid bacteria and human clinical infection, Journal of Applied Bacteriology, 75, 95-107.
- AĞAÇFIDAN, A., ANĞ, Ö., BADUR, S., BOZKAYA, E., DERNETLİ, Ş., KÜÇÜKER, M., GÜRLER, B., ÖNER, Y.A., ÖNGEN, B., TÖRECİ, K., YEĞENOĞLU, Y., 2002, Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antijen- Antikor Reaksiyonları ve İndirekt Tanı Yöntemleri, (Ed: Bozkaya, E.) Nobel Tıp Kitabevi, 975-420-230-3.
- AINSWORTH, A.J., CAPLEY, G., WATERSTREET, P., MUNSON, D., 1986, Use of monoclonal antibodies in the indirect fluorescent antibody technique (IFA) for diagnosis of *Edwardsiella ictaluri*, J Fish Dis 9:439-444.
- AKAYLI, T., TİMUR, G., 2004, Yavru Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) *Pseudomonad* Septisemisi Üzerinde Bir Çalışma, J. Fac. Vet. Med. Istanbul Uni. , 30(1), 121-131.

- AKINBOWALE, O.L., PENG, H., BARTON, M. D, 2006, Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia, J. Appl. Microbiol., 100: 1103-1113.
- AKŞİT, D., KUM, C., 2008, Gökkuşığı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda Sık Görülen Patojen Mikroorganizmaların Tespiti ve Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi, YYÜ Vet. Fak. Derg. 19(1): 1-7.
- ALPBAZ, A., 2005, Su Ürünleri Yetiştiriciliği, Genel Su Ürünleri Yetiştiriciliği, Yetiştirilen Su Canlıları ve Üretim Yöntemleri, Alp Yayınları, ISBN 975- 97056-1-3.
- ALTINOK, I., BALTA, F., CAPKIN, E., KAYIS, S., 2007, Disease of rainbow trout caused by *Pseudomonas luteola*, Aquaculture, 273: 393-397.
- ALTINOK, I., KAYIS, S., CAPKIN, E., 2006, *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout, Aquaculture 261, 850–855.
- ALTUN, S., ADILOĞLU, A., KUBILAY, DILER, Ö.,DEMIRBAS, N., SUTCU, R., 2007, Immunogenic and Antigenic Profiles of Nine *Lactococcus garvieae* Strains from Different Rainbow Trout Farms, The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh, 59(2), 111-116.
- ALTUN, S., DİLER, A., DİLER, Ö., BAŞAK, K., ISIKLI, B., 2005, Histopatology of Streptococcosis in Rainbow Trout, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol, 25(3) 131-135.
- AMANDI, A., HIU, S.F., ROHOVEC, J.S., FRYER, J.L., 1982, Isolation and Characterization of *Edwardsiella tarda* from Fall Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) Applied And Environmental Microbiology, 1380-1384.
- ANDERSON, D.P., 1974, Fish Immunology, T.F.H. Publications Inc. Ltd.,0-87666-036-7.
- ANDERSON, D.P., 1990, Fluorescent Antibody Test, Fish Immunology Technical Communications-1 (FITC), Edited by J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. van Muiswinkel, SOS Pub., USA, 0-9625505-0-7.
- ARAS, N.M., KOCAMAN, E. M., ARAS, M. S., 2000, General Fisheries and Fundamental Principals of Aquaculture (in Turkish), Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Ders Yayınları No 216, Erzurum.
- ARKOOSH, M.R., KAATTARI, L.S., 1990, Quantitation of Fish Antibody to a Specific Antigen by an Enzyme-Linked Immunosorbent Asay (ELISA), Fish Immunology Technical Communications-1(FITC), Edited by J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. van Muiswinkel, SOS Pub., USA, 0-9625505-0-7.

- ARP, L.H., 1988, Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms, In: Roth JA, editor. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- ATAY, D., 1987, İçsu Balıkları Üretim Tekniği, Ankara Üni., Ziraat Fak. Yayınları: 1035, Ders Kitabı. 300.
- AUSTIN, B., AUSTIN, D., 2007 , Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed And Wild Fish, Fourth Edition, Springer Dordrecht Berlin Heidelberg New York, ISBN 978-1-4020-6068-7.
- AUSTIN, B., BISHOP, I., GRAY, C., WATT, B., DAWES, J., 1986, Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and furunculosis in fish farms, J. Fish Dis. 9, 469–474.
- AVCI, H., AYDOĞAN, A., TANRIKUL, T.T., BIRINCIOĞLU, S.S., 2010, Pathological and Microbiological Investigations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Naturally Infected with *Lactococcus garvieae*, Kafkas Uni. Vet Fak. Derg., 16: S313-S318.
- BAECK, G.W., KİM, J.H., GOMEZ, D.K., PARK, S.C., 2006, Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island, J. Vet. Sci. 7 (1), 53-58.
- BAKOPOULS, V., VOLPATTI, D., PAPAPANAGIOTOU, E., RICHARD, R., GALLEOTTI, M., ADAMS, A., 1997, Development of an ELISA to detect *Pasteurella piscicida* in culture and in fish tissue, Aquaculture 156, 359- 366.
- BARAKAT, R.K., GRIFFITHS, M.W., HARRIS, L.J., 2000, Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere, packaged, refrigerated, poultry meat, Int. J. Food Microbiol., 62:83–94.
- BARAN, İ., TİMUR, T., AYDIN, N., İSTANBULLUOĞLU, E., AYDINTUĞ, M.K., 1981, Çifteler-Sakaryabaşı Balık Üretim Ve Araştırma İstasyonunda, Alabalıklarda (*Salmo gairdneri*) Görülen Bakteriyel Hemorajik Septisemi Hastalığı Üzerinde İncelemeler, A.Ü.Veteriner Fakültesi Su Ürünleri ve Hastalıkları Kürsüsü.
- BARK, S., MCGREGOR, D., 2001, The first occurrence of lactococcosis in farmed trout in England. Trout News. 31: 9-11.
- BARNES, A., GUYAT, C., HANSEN, B., HORNE, M., ELLIS, A., 2002 Antibody increases phagocytosis and killing of *Lactococcus garvieae* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages, Fish & Shellfish Immunology 12, 181–186.
- BASCOMB, S., MANAFI, M., 1998, Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic gram-positive cocci, clinical

- microbiology reviews, American Society for Microbiology p. 318–340 Vol. 11, No. 2.
- BELDING, D.L., MERRILL, B., 1935, A preliminary report upon a hatchery disease of the *Salmonidae*. Transactions of the American Fisheries Society 65, 76-84.
- BELL, G. R., 1964, A guide to the properties, characteristics, and uses of some general anaesthetics to fish. Bull. Fish. Res. Bd Can. 148, 1-4.
- BIOSCA, E.G., AMARO, C., LARSEN, J.L., PEDERSEN, K., 1997, Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio vulnificus*: proposal for the substitution of the subspecific taxon biotype for serovar, Applied and Environmental Microbiology 63, 1460– 1466.
- BİLGEHAN, H., 2002, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları, 10. Basım, İzmir.
- BLACK, J.G., 1993, Microbiology Principles and Applications, Second Edition, Prentice Hall. Cliffs. New jersey.
- BOOKER, J., JR. IMES, G. D., CAMERON, C. M., NAUDE, T. W., SCHOONBEE, H. J., 1979, Trout Mortalities as a result of *Streptococcus* Infection, Onderstepoort. J.Vet. Res., 46: 71-77.
- BOSHRA, H., Lİ, J., SUNYER, J.O., 2006, Recent advances on the complement system of teleost fish, Fish Shellfish Immunol. 20: 239–262.
- BORTZ, B. M., 1984, The immune response in immunized and naturally infected rainbow trout (*Salmo gaidneri*) *Diplostomum spataceum* as detected by Enzyme-Linked immunosorbent assay (E LISA), Dev. Comp.Immunol., 8. 813-822.
- BOULOT, V., MIALHE, E., ROGIER, H., PAOLUCCI, F.,GRIZEL, H., 1989, Immunodiagnosis of *Bonamia ostreae* (Ascetospora) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. *J. Fish Dis.* 12: 257-262.
- BOVO, G., GIORGETTI, G., JORGENSEN, P.E.V., NELSON, N. J., 1987, Infectious hematopoietic necrosis: first detection in Italy, Bull. Eur. Assoc. Fish Pathologists, 7:124.
- BRAGG, R., BROERE, J. S. E., 1986, Streptococcosis in Rainbow Trout in South Africa, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 6 (3) 89-91.
- BRUNT, J., AUSTIN, B., 2005, Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Journal of Fish Disease 28, 693- 701.
- BULLER, N.B., 2004, Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. CABI Publishing, UK.

- BULLOCK, A.M, 1978, Laboratory Methods in Fish Pathology, Ed. by Roberts R.J., Bailliere Tindall, London, 235-267.
- BURKA, J. F., HAMMELL, K. L., HORSBERG, T. E. , JOHNSON, G. R., RAINNIE, D. J., SPEARE, D. J., 1997, Drugs in salmonid culture - a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 20: 333-349.
- BUXTON, A., FRASER, G., 1977, Animal Microbiology, Volume:1 Immunology, Bacteriology, Mycology, Disease of Fish and Laboratory Methods, Blackwell Sci. Pub., London.
- CANDAN, A., KARATAŞ, S., 2010, Balık Sağlığı, Kalmak Ofset Yayıncılık, ISBN: 978-605-88665-0-8.
- CARSON, J., GUDKOV, N., AUSTIN, B., 1993, Characteristics of an *Enterococcus-like* bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, 16, 381-388.
- CARSON, J., STATHAM, P., 1993, The inhibition by ionophores *in vitro* of an *Enterococcus-like* pathogen of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Veterinary Microbiology*, 36, 253- 259.
- CHART, H., T. W. PEARSON, T. J. TRUST, 1984, Detection of specific fish antibody using an inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (inhibition ELISA), *J. Immunol. Methods*, 68, 19-24.
- CHEN, S.C., LIAW, L. L., SU, H. Y., KO, S.C., WU, C.Y., CHAUNG, H.C., TSAI, Y.H., YANG, K.L., CHEN, Y.C., CHEN, T.H., LIN, G.R., CHENG, S.Y., LIN, Y.D., LEE, J.L., LAI, C.C., WENG, Y.J., CHU, S.Y., 2002, *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Taiwan. *J. Fish. Dis.* 25: 727-732.
- CHEN, S.C., LIN, Y.D., LIAW, L.L., WANG, P.C., 2001, *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing, *Dis. Aquat. Org.* 45: 45-52.
- CHENG, W., CHEN, J.C., 1998, Isolation and characterization of an *Enterococcus-like* bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Macrobrachium rosenbergii* in Taiwan, *Dis Aquat Org*, Vol. 34: 93-101.
- COCHENNEC, N., HERVIO, D., PANATIER, B., BOULO, V., MIALHE, E., ROGIER, H., GRIZEL, H., PAOLUCCI, F., 1992, A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (Ascomycota) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca: Bivalvia). *Dis. Aquat. Org.* 12: 129-134.

- COLE, A.M., WEIS, P., DIAMOND, G., 1997, Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder, J Biol Chem 272: 12008–12013.
- COLORNI, A., RAVELO, C., ROMALDE, J. L., TORANZO, A. E., DIAMANT, A., 2003, *Lactococcus garvieae* in wild Red Sea wrasse *Coris aygula* (Labridae), Diseases of Aquatic Organisms, 56: 275–278.
- COSNRINI-OUNIER, M., 1985, Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to titrate rainbow trout serum antibodies against two pathogen: *Yersinia ruckeri* and Egtved virus, Aquaculture. 49:197- 208.
- CULLING, C.F.A., 1963, Handbook of Histopatological Tecniques (Including Museum Tecnique) Second education, Butterworth& Co. (Publisher) Ltd.
- CVITANICH, J. D., GARATE, O., SMITH, C. E., 1991, The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate, J. Fish Dis., 14, 121-145.
- ÇAĞIRGAN, H., 2004, Biotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated from Turkey E.Ü. Journal of Fisheries & Aquatic Science 21, (3-4), 267-269.
- ÇAMLIBEL, U.R., 2002, Levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*, L.) *Vibrio anguillarum* Bakterinine Karşı Antikor Reaksiyonunun Aglütinasyon Testleri ile Ortaya Çıkarılması Üzerine Bir Çalışma, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- ÇELİKKALE, M. S., 1988, İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği. Cilt 1, K.T.Ü.Yayın, No:124 TRABZON.
- ÇELİKKALE, M., DÜZGÜNEŞ, E., OKUMUŞ, İ., 1999, Türkiye Su Ürünleri Sektörü, Yayın No: 1992-2, 975-512-321-0.
- ÇELİKKALE, M.S., 1994, İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği. Cilt, I. K.T.Ü. Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi. Yayın No: 2. 419 s. TRABZON.
- ÇOTUK, A., 2003, Genel Mikrobiyoloji Laboratuar Yöntemleri, Nobel Tıp Kitapevi, 975-420-290-7.
- DAVIES, R., 1990, O-serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates, Veterinary Microbiology 22, 299–307.
- DAVIS, H. S., 1946, Care and diseases of trout, United States Fish and Wildlife Service Research Report 12. Washington, DC.
- DELEN, D., 2007, Deneyisel olarak enfekte edilen Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nda *Flavobacterium psychrophilum*’un Floresan Antikor Teknikleri ile saptanması üzerine bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, T.C. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- DEVRIESE, L.A., HOMMEZ, J., LAEVEN, H., BANADME, P., HAESBROUCK, F., 1999, Identification of aesculin hydrolyzing streptococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows, *Vet Microbiol*, 70:87–94.
- DILER, O., ALTUN, S., ADILOGLU, A., KUBILAY, A., ISIKLI, B. 2002 , First Occurrence of Streptococcosis Affecting Farmed Rainbow Trout in Turkey , *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 22(1) 21-26.
- DRICKAMER, K., TAYLOR, M.E., 1993, Biology of animal lectins, *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 237–264.
- DRURY, R.A.B. WALLINGTON, E.A., 1980, Carleton's Histological Technique, Fifth Edition, Oxford University Press, ISBN 0-19-261310-3.
- EARLIX, D.J., PLUMB, J.A., ROGERS, W.A., 1996, Isolation of *Edwardsiella ictaluri* from channel catfish by tissue homogenization, filtration and enzyme linked immunosorbent assay, *Dis. Aquat. Org.* 27:19–24
- EDWARDS, D.J., 1978, Salmon and Trout Farming in Norway. Farnham, England, Fishing News Books Ltd.
- EGIDIUS, I., WIİK, R., ANDERSEN, K., HOFF, K. A., HLELTNES, B., 1986, *Vibrio salmophilus* sp. nov., a new fish pathogen, *Int J. Syst. Bacteriol.* 36, 518-520,
- ELDAR, A., FRELIER, P.F., ASSENTA, L., VARNER, P.W., LAWHON, S., BERCOVIER, H., 1994, *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is as junior synonym of *Streptococcus iniae*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 840–842.
- ELDAR, A., BEJERANO, Y., LIVOFF, A., HOROVITZ, A., BERCOVIER, H., 1995, Experimental streptococcal meningoencephalitis in cultured fish, *Veterinary Microbiology*, 43:33- 40.
- ELDAR, A., GHITTINO, C., 1999, *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout similar; but different disease, *Disease of Aquatic Organisms Vol :36*, 227-231.
- ELDAR, A., GHITTINO, C., ASANTA, L., BOZETTA, E., GORÌA, M., PREARO, M., BERCOVIER, H., 1996, *Enterococcus seriolicida* Is a Junior Synonym of *Lactococcus garvieae*, a Causative Agent of Septicemia and Meningoencephalitis in Fish, *Current Microbiology* , 32: 85–88.
- ELDAR, A., GHITTINO, C., ASANTA, L., BOZZETT, E., GORIA, M., 1996, *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *L. garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish, *Curr. Microbiol.*, 32:85–8.

- ELDAR, A., GORIA, M., GHITTINO, C., ZLOTKIN, A., BERCOVIER, H., 1999, Biodiversity of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Fish in Europe, Asia, and Australia, *Applied and Environmental Microbiology*, 1005–1008.
- ELLIOTT, J.A., FACKLAM, R.R., 1996, Antimicrobial Susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a Proposed Method To Discriminate between Them, *Journal of Clinical Microbiology*, 1296–1298.
- ELLIS, A. E., 1999, Immunity to bacteria in fish, *Fish & Shellfish Immunology* 9, 291-308.
- ELLIS, A. E., 2001, Innate host mechanism of fish against viruses and bacteria, *Developmental and Comparative Immunology* 25, 827- 839.
- ELLIS, A.E., 1998, Meeting the requirements for delayed release of oral vaccines for fish, *Jour. Of Appl. Ichthyology* 14, 149- 152.
- ELLIS, A.E., 1987, Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by α_2 -macroglobulin in the serum of rainbow trout, *Microbial Pathogenesis* 3:167-177.
- ELLIS, A.E., 1988b, Ontogeny of the immune system in the teleost fish, Academic Press, London, UK.
- ELLIS, A.E., 1989, The immunology of teleosts, *Fish Pathology* (Roberts, R.J., ed), Bailliere Tindall, London.
- EMMERICH, R., WEIBEL, E., 1894, über eine durch Bakterien erzeugte Seuche unter den Forellen, *Arch. Hyg. Bakteriologie*, 21:1-21
- EMRE, Y., 2004, Alabalık Yetiştiriciliği. T.C Başbakanlık Güneydoğu Anadolu Projesi Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı.
- EMRE, Y., KÜRÜM, V., 1998, Havuz ve Ağ kafeslerde Alabalık Yetiştiricilik Teknikleri, Minpa Matbaacılık Tic. Ltd. Şti, Ankara.
- ENDO, H., NAKAYAMA, J., USHIO, H., HAYASHI, T., WATANABE, E., 1998, Application of flow cytometry for rapid detection of *Lactococcus garvieae*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 75: 295–306.
- ENGVAL, E., PERLMANN, P., 1972, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes, *J. Immunol.*, 109- 129.
- EURELL, T.E., LEWIS, D.H., GRUMBLES, L.C., 1978, Comparison of selected diagnostic tests for detection of motile *Aeromonas septicemia* in fish, *Am. J. Vet. Res.*, 39(8):1384-1386.

- EVANS, J. J., PASNIK, D.J., KLESIUS, P. H., ALABLANI, S., 2006, First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), Journal of Wildlife Diseases, 42(3), 561-569.
- EVANS, J.J., KLESIUS, P.H., SHOEMAKER, C.A., 2009, First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, Journal of Fish Diseases, 32, 943–951.
- EYNGOR, M., ZLOTKIN, A., GHITTINO, C., PREARO, M., DOUET, D.G., CHILMONCZYK, S., ELDAR, A., 2004, Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries, Appl. Environ. Microbiol., 70: 5132-5137.
- FACKLAM, R., ELLIOTT, J. A., 1995, Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci clinical microbiology reviews, American Society for Microbiology, p. 479–495 Vol. 8, No. 4.
- FAO, 1999a, FAO Yearbook fishery statistics –capture production, Vol 88-1. Rome, Italy.
- FUKUDA, Y., MAITA, M., SATOH, K., OKAMOTO, N., 1997, Influence of dissolved oxygen concentration on the mortality of yellowtail experimentally infected with *Enterococcus seriolicida*, Fish Pathol., 32: 129–30.
- GALL, G.A.E., CRANDEL, P. A., 1992, The Rainbow Trout, Aquaculture, 100, 1-10.
- GEORGE, K. C., 2002, Immuno - Diagnostic Techniques In Aquatic Animal Diseases, Indian Council of Agricultural Research Central Marine Fisheries Research Institute, Technical.
- GHITTINO, C., 1999, La estreptococosis en los peces, Rev. Aquatic., 6.
- GHITTINO, C., MUZQUIZ, J.L., 1998, La estreptococosis de la trucha arco iris en Espana. Reunion de Piscicultores. Zaragoza. Rev. Aquatic., 2.
- GHITTINO, C., PREARO, M., 1992, Report of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy, Boll. Soc. It. Patol. Ittica., 8, 4–11.
- GIL, P., VIVAS, J., GALLARDO, C.S., RODRIGUEZ, L.A., 2000, First isolation of *Staphylococcus warneri*, from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northwest Spain, Journal of Fish Diseases, Volume 23, Issue 4, pages 295–298.
- HALLER, O., KOCHS, G., WEBER, F., 2006, The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses, Virology 344: 119–130.

- HARRELL, L.W., ETLINGER, H.M., HODGINS, H.O., 1975, Humoral factors important in the resistance of salmonid fish to bacterial diseases. I. Serum antibody protection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis. *Aquaculture* 6, 211–220.
- HATAI, K., EGUSA, S., NAKAJIMA, M., CHIKAHATA, H., 1975, *Pseudomonas chlororaphis* as a fish pathogen, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 41, 12–15.
- HELLIO, C., PONS, A.M., BEAUPOÏL, C., BOURGOUGNON, N., LE GAL, Y., 2002, Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus, *Int J. Antimicrob Agents* 20: 214–219.
- HOFER, B., 1903, Über die Drehkrankheit der Regenbogenforelle, *Allgemeine FischereiZeitung*, 28, 1:78.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., WILLIAMS, s. T., (ed.), 1994, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9 th ed.
- HSU, H.M., BOWSER, P.R., SCHACHTE JR. J.H., 1991, Development and evaluation of a monoclonal-antibody-based enzymelinked immunosorbent assay for the diagnosis of *Renibacterium salmoninarum* infection, *Journal of Aquatic Animal Health*. 3:168-175.
- HUH, G.J., WAKABAYASHI, H., 1987, Detection of *Flavobacterium* sp., a pathogen of bacterial gill disease, using the indirect fluorescent antibody technique, *Fish Pathol.* 22: 215-220.
- HURVITZ, A., BERCOVIER, H., VAN RIJN, J., 1997, Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against *Streptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol.*, 7:45–53.
- HUSSEIN, M. M. A., HATAI, K., 2006, Multiplex PCR for Detection of *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae* and *S. dysgalactiae* in Cultured Yellowtail, *Aquaculture Science* 54 (3), 269- 274.
- LIJIMA, N., TANIMOTO, N., EMOTO, Y., MORITA, Y., UEMATSU, K., MURAKAMI, T., NAKAI, T., 2003, Purification and characterization of three isoforms of chrysophsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*, *Eur J Biochem.* 270: 675–686.
- INGLIS, V., ROBERTS, R.J., BROMAGE, N.R., 1993, *Bacterial Diseases of Fish*, Institue of Aquaculture, Oxford Blackwell Scientific Publications, London Edinburgh Boston, ISBN 0- 632-03497-1.
- ITAMI, T., KONDO, M., UOZO, M., SUGANUMA, A., ABE, T., NAKAGAWA, A., SUZUKI, N., TAKAHASHI, Y., 1996, Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*, *Journal of Fish Diseases* 19: 185-187.

- IWAMA, G., NAKANISHI, T., 1996, The Fish Immune System Organism Pathogen and Environment, Acedemic Press, San Diego London Boston.
- İSPİR, Ü., ŞEKER, E., SAĞLAM, N., DÖRÜCÜ, M., 2004, Doğu Anadolu Bölgesi'nde bazı Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde görülen *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonunun araştırılması, F.Ü. Fen ve Müh. Bilimleri Dergisi, 16 (4), 718- 724.
- JOHNSON, G.R., WOBESER, G., ROUSE, B.T., 1974, Indirect fluorescent antibody technique for detection of RM bacterium of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), J. Fish. Res. Bd Can., 31: 1957-1959.
- KANG, S., SHIN, G., SHİN, Y., KİM, Y., YANG, H., LEE, E., HUH, N., JU, O., JUNG, T., 2004, Experimantal Evaluation of Pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*), J. Vet. Sci., 5 (4) 387-390.
- KAV, K., 2005, Gökkuşığı Alabalıkları'nın (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) Streptokokkozis (*Lactococcus garvieae*) Hastalığına Karşı Aşı Çalışmaları Selçuk Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji (VET) Anabilim Dalı Doktora Tezi, ÖZET.
- KAV, K., ERGANIS, O., 2007, Konya Bölgesinde Bulunan (*Oncorhynchus mykiss*) Çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi, Vet. B. Derg., 23, 7- 17.
- KAV, K., ERGANIS, O., 2008, Antibiotic Susceptibility Of *Lactococcus garvieae* in Rainbow Trout (*Oncorhyncus mykiss*) Farms, Bull Vet Inst Pulawy 52, 223-226.
- KAWAHARA, E., KUSUDA, R., 1987, Direct fluorescent antibody technique for diagnosis of bacterial disease in eel, Nippon Suisan Gakkaishi 53, 395-399.
- KESKİN, O., SECER, S., İZGUR, M., TÜRKYILMAZ, S., MKAKOSYA, R.S., 2004, *Edwardsiella ictaluri* Infection in Rainbow Trout Turk. J. Vet. Anim. Sci. 28, 649-653.
- KIRKAN S., , GOKSOY, E. O., TEKBIYIK, S., KAYA, O., 2006, Detection of *Yersinia ruckeri* By PCR in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*- Walbaum) Hatchery Farms in the West of Turkey, İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 32 (3), 21-30.
- KIRKAN, S., GOKSOY, E.O., KAYA, O., 2000, The isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trouts in Aydın region, J. Pendik Vet. Microbiol., 2000; 31: 27-30.
- KIRKAN, S., GOKSOY, E.O., KAYA, O., 2003, Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms, J Vet. Med. Infect Dis. Vet Public Health, 50 (7): 339-342.

- KITAO, T., 1982a, The methods for detection of *Streptococcus* sp. causative bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), Fish Pathology 17, 17-26.
- KITAO, T., 1982b, Erythromycin: The application to streptococcal infection in yellowtails, Fish Pathology, 17, 77-85.
- KITAO, T., AOKI, T., IWATA, K., 1979, Epidemiological study on streptococciosis of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) Distribution of *Streptococcus* sp. in sea water and muds around yellowtail farms, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 45, 567-572.
- KIM, Y., LEE, G. K., 1994, Isolation Characterisation and Pathogenicity of a *Streptococcus* in the Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Cultured in Korea, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol, 14 (1), 8-11.
- KLESIUS, P. H., SEALEY, W.M., 1995, Characteristics of serum antibody in enteric septicemia of catfish. Journal of Aquatic Animal Health 7:205- 210.
- KLESIUS, P., EVANS, J., SHOEMAKER, C., YEH, H., GOODWIN, A.E., ADAMS, A., THOMPSON, K., 2006, Detection and Identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody based indirect fluorescent antibody technique, Aquaculture, 258, 180-186.
- KLOOS, W.E., BANNERMAN, T., 1995, *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: May PR, Baron EJ, Tenover FC, Tenover MC (ed). Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. ASM, 282-298.
- KNAPPSKOG, D.H., RODSETH, O.M., SLINDE, E., ENDRESEN, C., 1993, Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from vibriosis, Journal of Fish Diseases, 16, 327-338.
- KODAMA, H., ARIMITSU, H., MUKAMOTO, M., SUGIMOTO, C., 1999, Enhancement of phagocytic and chemokinetic activities of rainbow trout head kidney cells by C-reactive protein, Am. J. Vet. Res. 60: 240-244.
- KONEMANN, E.W., 1992, Color Atlas and Diagnostic Microbiology, ISBN 0-1234455-3, 258-125.
- KORUN, J., TİMUR, G., 2001, Gökkuşuğu Alabalıklarında (*O. mykiss*) Fry Mortalite Sendromu (FMS) Üzerinde Bir Çalışma, İstanbul University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 12, 15-30.
- KRANTZ, G.E., REDDECLX, J.M., HEIST, C.E., 1963, Development of antibodies against *Aeromonas salmonicida* in trout, J. Immunol. 91: 757-760.
- KUBİLAY, A., ALTUN, S., DİDİNEN, B.I., EKİCİ, S., DİLER., 2009, Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* İzalosyonu, Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 15 (5): 709-715.

- KUBILAY, A., ALTUN, S., DILER, Ö., EKICI, S., 2008, Isolation of *Flavobacterium columnare* from Culture Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in Turkey, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science 8: 165-169.
- KUBILAY, A., ALTUN, S., ULUKÖY, G., DILER, Ö., 2005 *Lactococcus garvieae* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi Cilt I, Say: I, 39-48.
- KUBILAY, A., DILER, Ö., 1999, Gökkuşığı alabalıklarından izole edilen *Yersinia ruckeri* suşlarının serotiplerinin Lam Aglutinasyon Testi ile Tespiti, Eğirdir Su Ürünleri Fak. Dergisi, Sayı: 6. ISSN 1300 4891.
- KUBILAY, A., TİMUR, G., 1997, Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Yersinia ruckeri* bakterinine karşı antikor üretiminin aglutinasyon yöntemleriyle tespiti üzerine bir araştırma, IX Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu 17- 19 Eylül.
- KUBILAY, A., TİMUR, G., 2001, *Yersinia ruckeri* Bakterisi ile İmmünize Edilen Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Antikor Üretiminin IFAT ve ELISA Teknikleri ile Saptanması, Turkish Journal of Veterinary & Animal Science., Vol:25, Sayı 4, 437- 445.
- KUM, C., GÖKBULUT, C., AKAR, F., KIRKAN, Ş., SEKKİN, S., 2004, Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* izolasyonu ve etkili antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi, Vet. Hek. Dern. Derg., 75: 47-53.
- KUSUDA, R., KAVA, K., SALATI, F., BANNER, R., 1991, *Enterococcus seriolicida* sp. nov. a Fish Pathogen, International journal of systematic Bacteriology Vol. 41, No. 3 pp. 406-409.
- KUSUDA, R., KAWAI, T., TOYOSHIMA, T., KOMATSU, I., 1976a, A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic of cultured yellowtail, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 42, 1345-1352.
- KUSUDA, R., KAWAI, K., SALATI, F., BANNER, C. R., FRAYER, J. L., 1991, *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a Fish Pathogen, Int. J. Syst. Bacteri., 41, 406-409.
- KUSUDA, R., KOMATSU, I., 1978, A comparative study of fish pathogenic *Streptococcus* isolated from saltwater and freshwater fishes, Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 44, 1073-1078.
- KUSUDA, R., SALATI, F., 1999, *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*, Fish Disease Lab. Faculty of Agriculture Kochi University Nankoku Kochi 783

- KUSUDA, R., TAKEMARU, I., 1987, Efficacy of josamycin against experimental streptococcal infection in cultured yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 1519-1523.
- LAFRENTZ, B.R., LAPATRA, S.E., JONES, G.R., CAIN, K.D., 2003, Passive immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial coldwater disease and rainbow trout fry syndrome, *Journal of Fish Diseases* 26, 377–384.
- LAIDLER, L.A., 1980, Detection and identification of the bacterial kidney disease (BKD) organism by the indirect fluorescent antibody technique, *J. Fish Dis.*, 3, 67- 69.
- LANDAU, M., 1992, *Introduction to Aquaculture*, John Wiley and Sons Inc, New York.
- LEBLANC, D., MITTAL, K. R., OLIVIER, G., LALLIER, R., 1981, Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund Fish. *Appl Environ Microbiol* 42, 56-60.
- LEWIS, D.L., SAVAGE, N.L., 1972, Detection antibodies to *Aeromonas liquefaciens* in fish by an Indirect Fluorescent Antibody Technique, *J. Fish. Res. Bd.* 29: 211-212.
- LIE, O., EVENSEN, A., SØRENSEN, A., FROYSADAL, E., 1989, Study on lysozyme activity in some fish species, *Dis Aquat Org* 6: 1–5.
- LOBB, C.J., CLEM, L.W., 1981, Phylogeny of immunoglobulin structure and function- x. Humoral immunoglobulin of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*, *Dev. Comp. Immunol.* 5: 271-282.
- LORENZEN, E., KARAS, N., 1992, Detection of *Flexibacter psychrophilus* by immunofluorescence in fish suffering from fry mortalite syndrome: a rapid diagnostic method, *Dis. Aquat. Org.*, 13: 231-234.
- MAGNADOTTIR, B., 2006, Innate immunity of fish (overview), *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137- 151.
- MARQUIS, H., LALLIER, R., 1989, Efficacy studies of passive immunization against *Aeromonas salmonicida* in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), *Journal of Fish Diseases* 12, 233–240.
- MCARTHUR, C. P., SENGUPTA, S., 1982, A rapid micro-method for screening eel sera for antibodies against the digenean *Telogaster opisthorchis*, *Macfarlane, J. Fish Dis.*, 5. 67-70.
- MEIER, W., VESTERGAARD-JSRGENSEN, P. E., 1975, A rapid and specific method for the diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia (VHS), *Riv. Ital. Piscic. Ittiopat.*, 1:11-18.

- MEYER, F.P., 1974, Parasites of Freshwater Fishes, II, Protozoa 3. *Ichthyophthirius multifiliis*. U.S. Department of the Interior U.S. Fish and Wildlife Service Fish Disease, Leaflet No. 2.
- MOORE, E., 1922, *Octomitus salmonis*, a new species of intestinal parasite in trout. Trans. Am. Fish Soc., 52:74-97.
- MOUSAVI, S. S., KHARA, H., SAEIDI, A.A., GHIASI, M., ZAHEDI, A., 2010, Determination Of Staphylococcosis And Micrococcosis Outbreak On Elected Rainbow Trout Farms In Mazandaran Province, Journal of Fisheries, 4(1):109-114.
- MUMFORD, S., HEIDEL, J., SMITH, C., MORRISON, J., MACCONNELL, B., BLAZER, V., 2007, Fish Histology and Histopathology, U.S Fish & Wildlife Service National Conservation Training Center.
- MUNDAY, B.L., JACK, D.L., SCHMIDTKE, L., 1993, Pathogenicity of the species *Streptococcus* causing disease in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*), Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 13(1), 25-27
- MUNRO, A.L.S., 1982, The pathogenesis of bacterial diseases of fish, in Roberts, R. J. eds. *Microbial disease of* Academic Press, London.
- MURRAY, C.K., FLETCHER, T.C., 1976, The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues, J Fish Biol 9: 329–334.
- MUUS, B., DAHLSTROM, P., 1971, The Freshwater fish of Britain and Europe. W m. Collins Sons and Co. Ltd., London, 0-00-212056-9.
- MUZQUIZ, J.L., ROYO, F.M., ORTEGO, C., BLAS, I., RUIZ, I. AND ALONSO, J.L., 1999, Pathogenicity of *Streptococcus iniae* Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Dependence on age of diseased fish, Bull. Eur. Fish Pathol., 19 (3): 114-119.
- NAGASHIMA, Y., SENDO, A., SHIMAKURA, K., SHIOMI, K., KOBAYASHI, T., KIMURA, B., FUJII, T., 2001, Antibacterial factors in skin mucus of rabbitfishes, J Fish Biol 58: 1761–1765.
- NATHAN, C.F., 1987, Secretory product of macrophages, J. Clin. Invest. 79: 319–326.
- NIETO, J. M., DEVESA, S., QUIROGA, I., TORANZO, A. E., 1995, Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L., Journal of Fish Diseases 18, 21- 30.
- NOVAK, B.F., 1999, Significance of environmental factors in aetiology of skin diseases of teleost fish, Bull Eur Assoc Fish Pathol 19: 290–292.

- O'DOWD, A.M., ELLIS, A.E., SECOMBES, C.J., 1998, Binding of immune complexes to Atlantic salmon peripheral blood leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 22: 439-448.
- OLESEN, N.J., 1991, Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterin by ELISA, *Journal of Applied Ichthyology* 7, 36-43.
- OOYAMA, T., KERA, A., OKADA, T., INGLIS, V., YOSHIDA, T., 1999, The protective immune response of yellowtail *Seriola quinqueradiata* to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*, *Dis Aquat Organ.*, 30;37(2):121-6.
- OTTINGER, C.A., JOHNSON, S.C., EWART, K.V., BROWN, L.L., ROSS, N.W., 1999, Enhancement of anti-Aeromonas salmonicida activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by mannosebinding lectin, *Comp. Biochem. Physiol.* 123: 53-59.
- ÖZER, S., BULDUKLU, S., DONMEZ, E., 2008 Streptococcosis occurrence at rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultivated in province Mersin-Turkey, *Journal of Fisheries Sciences.com* 2 (3)272-283
- ÖZCEL, M.A., 1978, İmmunoflöresans ve Parazitolojide Uygulanması, Ege Üniversitesi Yayınları, Yayın no 108, İzmir.
- PALACIOS, M. A., ZAMORA, M. J., VASQUEZ, J., ZAMORA, E., DURAN, A., 1993, Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. *Boll. Soc. Patol. Ittica.* 13: 11-16.
- PASNIK, D. J., EVANS, J. J., KLESIUS, P. H., 2006, Passive İmmunization of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*, *Fish& Shellfish Immunology*, 21, 365- 371.
- PAULSEN, S.M., ENGSTAD, R.E, ROBERTSEN, B., 2001, Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 11: 23-37.
- PEREIRA, F., RAVELO, C., TORANZO, A. E., ROMALDE, J. L., 2004, *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 24, 274-279.
- PETRIE-HANSON L, AINSWORTH AJ., 2001, Ontogeny of channel catfish lymphoid organs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81:113-27.
- PLUMB, J. A., SCHACHTE, J. H., GAİNES, J. L., PELTİER, W., CAROL, B., 1974, *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and North-West Florida coast of Gulf of Mexico, *Trans. Am. Fish. Soc.*, 103, 358-361.
- PLUMB, J.A., BOWSER, P.R., 1983, *Microbial Fish Disease Laboratory Manual*. Brown Printing Company, Albana.

- POUTREL, B., RYNIEWICZ, H.Z., 1984, Evaluation of the API 20 Strep System for Species Identification of Streptococci Isolated from Bovine Mastitis, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 19, No. 2, 213-214.
- PRIETA, J., DOMENECH, A. M., FERNANDEZ-GRAYZABAL, J. F., COLLINS, M. D., RODRIGUES, U. M., JONES, D., RODRIGUES, A., DOMINGUEZ, L., 1993, Lactococciosis de la Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Med. Vet.*, 10: (6) 367-373.
- PURSER, J., FORTEATH, N., 2005, Salmonids, In J.S. Lucas & P.C. Southgate (eds.), *Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants*, Blackwell Publishing, Oxford, England.
- RABB, L., CORNICK, J.L.V., DERMOTT, L.A., 1964, A macroscopic-slide agglutination test for the presumptive diagnosis of furunculosis in fish, *Prog Fish Cult* 26:118-120.
- RAISSY, M., ANSARI, M., 2011, Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran fish farms, *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(8), pp. 1473-1476.
- RANTSIOU, K., URSO, R., IACUMIN, L., CANTONI, C., CATTANEO, P., COMI, G., 2005, Culture-dependent and independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:1977–1986.
- RASMUSSEN, R.S., OSTENFELD, T.H., 2000, Effect of Growth Rate on Quality Traits and Feed Utilization of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brook trout (*Salvelinus fontinalis*), *Aquaculture*, 184 (3-4), 327-337.
- RATTANACHAIKUNSON, P., PHUMKHACHORN, P., 2009, Protective Effect of Clove Oil- Fish Diets on Experimental *Lactococcus garvieae* Infection in Tilapia, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 73, 2085- 2089.
- RAVELO, C., MAGARINOS, B., HERRERO, M. C., COSTA, L., TORANZO, A. E., ROMALDE, J. L., 2006, Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococciosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, 251, 153- 158.
- RAVELO, C., MAGARINOS, B., ROMALDE, J.L., TORANZO, A.E., 2001, Convencional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 21:136–44.
- RAVELO, C., MAGARINOS, B., ROMALDE, S. L., TORANZO, A.E., ROMALDE, J.L., 2003, Molecular Fingerprinting of Fish-Pathogenic *Lactococcus garvieae* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41, No. 2, 751-756.

- ROBERSON, B. S., 1990, Bacterial Agglutination, Fish Immunology Technical Communications-1 (FITC), Edited by J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. van Muiswinkel, SOS Pub., USA, 0-9625505-0-7.
- ROMALDE, J.L., TORANZO, A.E., 2002, Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. In: Cunningham C, editör, Molecular diagnosis of salmonid diseases, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 211–33.
- ROSE, A.S., ELLIS, A.E., ADAMS, A., 1989, An assessment of routine *Aeromonas salmonicida* carrier detection by ELISA. Bull. Euro. Assoc. Fish Pathol. 9:65-67.
- ROSS, A. J., RUCKER, R. R., EWING, W. H., 1966, Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Can. J. Microbiol. 12, 763-770.
- ROSS, A.J. , MARTIN, J.E., BRESS, V., 1968, *Vibrio anguillarum* from an epizootic in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in THA USA, Bull. Off. Int. Epiz. 69, 1139-1148.
- SAĞLAM, Y.S., IŞIK, N., ARSLAN, A., ERER, H., 2006, Erzurum Bölgesindeki Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* W. 1792) *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia ruckeri* İzolasyonu ve Patolojik İncelemeler, Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.1 (1-2) 6-10.
- SALATI, F., TASSI, P., BRONZI, P., 1996, Isolation of *Enterococcus* like Bacterium from Diseased Adriatic Sturgeon *Acipenser naccarii*, Farmed Italy, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 16 (3) 96-99.
- SATO, H., NINOMIYA, M., KAWAI, K., KUSUDA, R., 1996, Protection and opsonic activity in the serum of yellowtail *Seriola quinqueradiata* immunized with *Enterococcus seriolicida* formalin-killed cells. Nippon Suisan Gakkaishi 62:939-940.
- SAVVIDIS, G. K., ANATOLIOTIS, C., KANAKI, Z., VAFEAS, G., 2007 Epizootic outbreak of Lactococcosis disease in rainbow trout culture in Greece, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 27 (6)223.
- SCHILL, W.B., BULLOCK, G. L., ANDERSON, D. P., 1989, Serology. In methods for the microbiological examination of fish and shellfish (Austin , B., and Austin, D.A. eds.).
- SCHLEIFER, K.H, KRAUS, J., DVORAK, C., KILPPER-BALZ, R., COLLINS, M.D., FISCHER, W., 1985, Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen nov. Syst Appl Microbiol, 6: 183–95.
- SCHMID, A. S., BRUUN, M. S., DALSGAARD, I., PEDERSON, K., LARSEN, J. L., 2000, Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. Appl. Environ. Microbiol., 66: 4908-4915.

- SCHRODER, M.B., VILLENA, A.J., JORGENSEN, T.O., 1998, Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev Comp Immunol.*, 22:507-17.
- SHARIFIYAZDI, H., AKHLAGHI, M., TABATABAEI, M., MOSTAFAVI ZADEH, S., 2010, Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultured in Iran, *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, Vol. 11, No. 4, Ser. No. 33.
- SHEENA, A., WAITKINS, L.Y.N., BALL, C., CHERRY, A.M., FRASER, J., 1980, Use of the API-ZYM system in rapid identification of a and non-haemolytic streptococci, *Clin. Pathol.* 33: 53-57.
- SHELBY, R.A., KLESİUS, P.H., SHOEMAKER, C.A., EVANS, J.J., 2002, Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera, *Journal of Fish Diseases* 25:1-6.
- SHEPHERD, J., BROMAGE, N., 1988, *Intensive Fish Farming*, First Publishing, Billing and Sons Ltd, Worcester.
- SHIOMITSU, K., KUSUDA, R., OSUGA, H., MUNEKIYO, M., 1980, Studies on chemotherapy of fish disease with erythromycin--II. Its clinical studies against streptococcal infection in cultured yellowtails. *Fish Pathol.* 15(1):17-23.
- SHOMAKER, C. A., SHELBY, R. A., KLESİUS, P., 2003, Development of an Indirecy ELISA to Detect Humoral Response to *Flavobacterium columnare* Infection of Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, *Journal of Applied Aquaculture*, Vol 14 (1-2).
- SILPHADUANG, U., NOGA, E.J., 2001, Peptide antibiotics in mast cells of fish, *Nature* 414: 268–269.
- SOLTANI, M., NIKBAKHT, G., MOUSAVI, H. A. E., AHMADZADEH, N., 2008, Epizootic outbreaks of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in rainbow trout in Iran, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol* 28 (5) 207.
- SORENSEN, U.B.S., LARSEN, J.L., 1986, Serotyping of *Vibrio anguillarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 51, No. 3, p. 593-597.
- STEVENSON, J. P., 1987, *Trout Farming Manual*, 2 nd ed, Fishing News Boks Ltd., England, 0-85238-149-2.
- SUBASINGHE, R.P., BERNOTH, E.M., 2000, Disease control and health management. In: *NACA/FAO 2000. Proc. Conf. Aquaculture in the Third Millennium*. 20-25 February 2000, Bangkok, Thailand.
- TAKEMARU, I., KUSUDA, R., 1988, Chemotherapeutic effect of josamycin against natural streptococcal infection in cultured yellowtail, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 54.

- TANRIKUL, T.T., 2007, Vibriosis as an Epizootic Disease of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, Pakistan Jour. Of Biol. Sciences, 10 (10): 1733-1737.
- TANRIKUL, T.T., GULTEPE, N., 2011, Mix Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) *Lactococcus garvieae* and *Vibrio anguillarum* O1, Jour. of Animal and Vet. Advance 10 (8):1019-1023.
- TEIXEIRA, L.M., MERQUIOR, V.L., VIANNI, M.C., CARVALHO, M.G., FRACALANZZA, S.E., STEIGERWALTZ, A.G., 1996, Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*, Int. J. Syst. Bacteriol., 46: 664-8.
- TIMUR, G., TİMUR, M., 1991, An outbreak of Enteric Red Mouth disease in farmed rainbow trout (*O.mykiss*) in Turkey. Bull. Eur.Ass. Fish Pathol. Vol.11, No5, 182-183.
- TIMUR, G., KORUN, J., 2004, First Outbreak of Vibriosis in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Istanbul University Journal of Aquatic Sciences. 18, 1-9.
- TİMUR, G., KARATAŞ, S., ÇOLAK, S., AKAYLI, T., 2000, Gökkuşığı Alabalık (*O. Mykiss* Wal. 1792) Yavrularında Görülen Furunkulosis Hastalığı Üzerine Bir çalışma, İst. Üniv. Su Ürünleri Dergisi, Özel Sayı.
- TİMUR, G., TİMUR, M., 2003. Balık Hastalıkları, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yayın no: 5, İstanbul, 975-404-699-9.
- TORANZO, A. E., BAYA, A., ROBERSON, B., BARJA, J., GRIMES D., HETRICK, F., 1987, Specificity of Slide Agglutination test for detecting Bacterial Fish Pathogen, Aquaculture, 61, 81-97.
- TORANZO, A.E., CUTRIN, J.M., NUNEZ, S., ROMALDE, J.L., BARJA, J.L., 1995, Antigenic characterization of Enterococcus strains pathogenic for turbot and their relationship with other bacteria, Dis. Aquat. Org., 21, 187-191.
- TORANZO, A.E., DEVESA, S., HEINEN, P., RIAZA, A., NUNEZ, S., BARJA, J.L., 1994, Streptococcosis in cultured turbot caused by an Enterococcus-like bacterium, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 14:19-23.
- TORT, L., BALASCH, J.C., MACKENZIE, S., 2003, Fish Immun System. A Crossroads between innate and adaptive responses, Immunolgia, 277- 286.
- US, D., 2006, Serolojik Tanı Yöntemleri Uygulama ve Değerlendirme, Hacettepe Üniversitesi yayınları, 975-491208-4.

- VELA, A.I, VAZQUEZ, J., GIBELLO, A., BLANCO, N.M., MORENO, M.A., LIEBANA, P., ALBENDEA, C., ALCALA, B., MENDEZ, A., DOMINGUEZ, L., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F., 2000, Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from Lactococcosis Outbreaks and Comparison with Isolates of Other Countries and Sources, Journal of Clinical Microbiology, p. 3791–3795
- VENDRELL, D., BALCAZAR, J.L., RUIZ ZARZUELA, I., BLAS, I., GIRONES, O., MUZQUIZ, J.L., 2006, *Lactococcus garvieae* in fish: A review, Science Direct, Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 29 177–198.
- VENDRELL, D., BALCAZAR, J.L., RUIZ-ZARZUELA, I., DE BLAS, I., GIRONES, O., MUZQUIZ, J.L., 2004, Evaluation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of Ichtiovac-Lg, a vaccine against *Lactococcus garvieae*. In: Proceedings of the sixth international symposium on fish immunology, Nordic Society for Fish Immunology, Turku, Finland.
- VILLANI, F., APONTE, M., BLAIOTTA, G., MAURIELLO, G., PEPE, O., MOSCHETTI, G., 2001, Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk, J Appl Microbiol., 90:430–9.
- VOLANAKIS, J.E., 2001, Human C-reactive protein: expresion, structure, and function. Mol. Immunol. 38: 189–197.
- VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D.E., 1978, Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques, Journal of Clinical Pathology, 31, 507-520.
- WAITKINS, S.A., BALL, L.C., FRASER, C. A., 1980, Use of the API ZYM system in rapid identification of α and non- haemolytic streptococci, J. Clin. Pathol. 33: 53-57.
- WALBANKS, S., MARTÍNEZ-MURCIA, A. J., FRYER, J. L., PHILLIPS, B. A., COLLINS, M. D., 1990, 16 S RNA Sequence Determination for Members of Genus *Carnobacterium* and Related Lactic Acid Bacteria and Description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov, Int. J. Syst. Bacteriol., 40, 224-230.
- WANG, C., SHIE, H.S., CHEN, S.C., HUANG, J. P., HSIEH, I.C., WEN, M.S., LIN, F.C., WU, D., 2007, *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks, Int. J. Clin. Pract., 61: 68–73.
- WATTS, J. L., YANCEY, R. J. 1994, Identification of Veterinary Pathogens by Use of Commercial Identification Systems and New Trends in Antimicrobial Susceptibility Testing of Veterinary Pathogens, Clinical Microbiology reviews, p. 346-356 Vol. 7, No. 3.
- WHITMAN, K. A., 2004, Finfish and Shellfish Bacteriology Manual Techniques and Procedures, A Blackwell Publishing Company, ISBN 0- 8138-1952-0.

- WHYTE, S. K., 2007, The innate immune response of finfish- A review of current knowledge, *Fish& Shellfish Immunology* 23, 1127- 1151.
- WILLIAMS, A. M., FRYER, J. L., COLLINS, M. D., 1990, *Lactococcus piscium* sp. nov. A new *Lactococcus* species from Salmonid Fish, *FEMS Microbiol. Lett.* 68, 109-114.
- WOLF, K., S. SNIESZKO, DUNBAR, G., PYLE, E., 1960, Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 104:105-108.
- YANONG, R. P. E., FRANCIS-FLOYD, R., 2002, *Streptococcal Infections of Fish*, Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- YASUNAGA, N., 1982, Occurrence of *Streptococcus* sp., a pathogen of cultured yellowtail, in muscle of sardine for diets. *Fish Pathol*, 17:195–8.
- ZAPATA, A., DIEZ, B., CEJALVO, T., GUITERREZ-DE FRIAS, C., CORTES, A., 2006, Ontogeny of the immune system of fish, *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 126- 136.
- ZLOTKIN, A., ELDAR, A., GHITTINO, C., BERCOVIER, H., 1998, Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 983- 985.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İstanbul’ da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi İstanbul’ da tamamladım. 1996 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi İnşaat programında öğrenim gördüm ve 1999 yılında mezun oldum. 2002 yılında İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesinde lisans eğitimine başladım. 2004 yılında çift anadal programını ile İ.Ü. Biyoloji bölümüne kayıt oldum ve 2007 yılının Temmuz ayında Su Ürünleri Fakültesinden ve Biyoloji Bölümünden mezun oldum. Eylül 2008’ de İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü’ ne bağlı olarak Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı Hastalıklar Programında yüksek lisans öğrenimime başladım. 2011 yılının Şubat ayında İstanbul Üniversitesi Hastalıklar Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandım. Yabancı dilim İngilizcedir.