



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜLTÜR LEVREKLERİNDE (*Dicentrarchus labrax* L.)
DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN *LACTOCOCCOSIS*'İN
BAZI TEŞHİS METOTLARI İLE TESPİTİ

Sena Zeynep GÖKEN

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Hastalıklar Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Tülay AKAYLI

Eylül, 2016

İSTANBUL

Bu çalışma 20.09.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yetiştiricilik Anabilim Dalı Hastalıklar Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Doç. Dr. Tülay AKAYLI(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Ahmet AKMIRZA
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Erhan SOYLU
Marmara Üniversitesi
Teknik Bilimler MYO



Doç. Dr. Hafize Sibel ÖZESEN ÇOLAK
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun 114O766 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her konuda desteğini ve yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle eğitimimde büyük katkısı olan danışman hocam sayın Doç. Dr. Tülay AKAYLI'ya; bilimsel katkılarından dolayı Prof. Dr. Ahmet AKMİRZA'ya, Doç. Dr. Hafize Sibel ÖZESEN ÇOLAK'a, Prof. Dr. Erhan SOYLU'ya ve Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK'e, tez çalışmamı başarıyla tamamlayabilmemi sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na; çalışmada kullandığımız deney balıklarını temin etmemize yardımcı olan İlknak Su Ürünleri'nde görevli olan tüm personele; deney balıklarının bu çiftlikten fakültemize transferini sağlayan İ. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimi'nde görev alan teknisyen Kemal TURAN ve Mustafa ÖZDEMİR'e; deneysel çalışmamızda ihtiyacımız olan bakteriyi temin ettiğimiz Süleyman Demirel Üniversitesi öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a; Yetiştiricilik Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve Prof. Dr. Gülşen TİMUR'a; çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Çiğdem ÜRKÜ, yüksek lisans öğrencisi Ece SÖNMEZ, Araş. Gör. Dr. Eda YARDIMCI, Araş. Gör. Özgür ÇANAK ve Su Ürünleri Mühendisi Burak SARIOĞLU'na; beni yüksek lisans yapmaya teşvik eden ve tezimin gerçekleşmesinde her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli eşim Onur GÖKEN'e, aileme ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Eylül 2016

Sena Zeynep GÖKEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1 LEVREK BALIĞI' NIN (<i>DİCENTRARCHUS LABRAX</i>) MORFOLOJİK VE BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ	5
2.2 LACTOCOCCOSİS	7
2.2.1 Hastalığın Karakteristik Özellikleri	9
2.2.2 Hastalık Etkeninin Karakteristik Özellikleri.....	10
2.2.3 Patojenite Mekanizması	13
2.2.4 Hastalığın Oluşumu.....	14
2.2.5 Hastalığın Teşhisi.....	15
2.2.5.1 Hematolojik Yöntemler.....	16
2.2.5.2 Serolojik Yöntemler	18
2.2.5.3 Moleküler Yöntemler	19
2.2.6 Hastalığın Kontrolü ve Tedavisi	21
3. MALZEME VE YÖNTEM	23
3.1 DENEMEDE KULLANILAN LEVREK BALIKLARININ TEMİNİ VE ADAPTASYONU	23
3.2 IN-VIVO KOŞULLARDA ENFEKSİYONUN OLUŞTURULMASI	24
3.3 ENFEKTE BALIKLARDAN PATOJEN BAKTERİNİN YENİDEN İZOLASYONU.....	24
3.4 ENFEKTE BALIKLARDAN KAN VE SERUM ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ.....	25
3.5 HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	25

3.6 HEMATOLOJİK İNCELEME	26
3.6.1 Kan Hücrelerinin Sayımı	26
3.6.2 Froti Hazırlanması.....	26
3.6.3 Hematokrit Tayini	27
3.6.4 Sedimentasyon Hızının Tespiti	27
3.6.5 Koagülasyon Süresinin Belirlenmesi	27
3.7 SEROLOJİK İNCELEME	27
3.7.1 Lam Aglütinasyon Testi.....	28
3.7.2 Mikro-well Aglütinasyon Testi.....	28
3.7.3 Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	29
4. BULGULAR	30
4.1 DENEYSEL ENFEKSİYON İLE İLGİLİ BULGULAR	30
4.2 PATOJEN BAKTERİLERİN HASTA BALIKLARDAN YENİDEN İZOLASYONU	33
4.3 HEMATOLOJİK BULGULAR	36
4.4 HİSTOLOJİK BULGULAR	44
4.5 SEROLOJİK BULGULAR	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan kültür balıklarının üretim miktarları (BSGM, 2016).....5
- Şekil 2.2:** Levrek balığının (*Dicentrarchus labrax*, L.) dıştan görüntüsü (FAO)..... 7
- Şekil 4.1:** Deneysel çalışmadaki balıklara ait günlük ölüm oranları (adet).....31
- Şekil 4.2:** Hasta balığa ait eksternal ve internal klinik bulgular. (a) karında hemoraji; (b) operkulumda hemoraji; (c) gözde hemoraji; (d) skolyozis; (e) karaciğerde yağlanma ve nodül benzeri yapılar; (f) splenomegali.32
- Şekil 4.3:** % 1,5 NaCl içeren BHIA besiyerinde *L. garvieae* kolonilerinin görünümü.33
- Şekil 4.5:** Hematokrit skalasında santrifüj yapılmış kan örneğinin görünümü.36
- Şekil 4.6:** Kontrol balıkları (K) ve deney grubundaki (D1, D2) balıklara ait hematokrit değerleri (%).37
- Şekil 4.7:** Mikrohematokrit tüplerde sedimentasyon hızının saptanması.....38
- Şekil 4.8:** Kontrol balıkları (K) ve deney grubundaki (D1, D2) balıkların kanlarına ait sedimentasyon hızı (mm).39
- Şekil 4.9:** Kontrol balıkları (K) ve deney grubundaki (D1, D2) balıkların kanlarına ait koagülasyon süresi (dk).40
- Şekil 4.11:** Deney boyunca enfekte balıkların kanında ölçülen günlük lökosit değerleri (hücre/ml).....42
- Şekil 4.12:** Deneysel enfeksiyona bağlı olan levrek balıklarının kan hücrelerinde görülen morfolojik değişiklikleri. m: monosit hücresi. (a) Kontrol balığı, (b) Deneyin 16. gününde eritrosit hücrelerinde deformasyon (okla gösterilmiştir), (c) Deneyin 29. günündeki balıkların plazmasında görülen kok şekilli bakteriler (okla gösterilmiştir), (d) Monosit hücreleri içindeki kok şekilli bakterilerin görünümü (okla gösterilmiştir).43
- Şekil 4.13:** (a) Kontrol balığının karaciğer dokusunda yağ dejenerasyonu (okla gösterilmiş) (H.E), (b) Enfekte balığın karaciğer dokusunda yağ dejenerasyonu, hiperemi (okla gösterilmiş) ve liqufaktif nekroz odakları (*) (H.E).....45

- Şekil 4.14:** (a) Deneyde kontrol olarak kullanılan levrek balığının kalp dokusunun görünümü (H.E) (b) Hasta levrek balığının kalp dokusunda hemoraji (okla gösterilmiş) ve nekroz (*) (H.E).....45
- Şekil 4.15:** (a) Kontrol balığına ait dalak dokusunun görünümü (H.E) (b) Hasta levrek balığının dalak dokusunda hemoraji (*) ve melanomakrofaj odakları (okla gösterilmiştir) (H.E).....46
- Şekil 4.16:** (a) Deneyde kontrol olarak kullanılan levrek balığının böbrek dokusunun görünümü (H.E) (b) Enfekte levrek balığının arka böbrek dokusundaki haemopoietik dokuda liquefaktif nekroz (*) ve hiperemi (okla gösterilmiş) (H.E).46
- Şekil 4.17:** (a) Kontrol balığının solungaç dokusunun görünümü (H.E) (b) Hasta levrek balığının solungaç dokusunda hiperplazi (*) ve talenjektiazis (okla gösterilmiş) (H.E).47
- Şekil 4.18:** (a) Deneyde kontrol olarak kullanılan levrek balığının göz dokusunun görünümü (H.E) (b) Hasta levrek balığının göz dokusunda hemoraji (okla gösterilmiştir) (H.E).....47
- Şekil 4.19:** Gözle görülebilir pozitif aglütinasyon reaksiyonu.48
- Şekil 4.22:** ELISA plağının görünümü (koyu sarı pozitif reaksiyon) Yerli (F grubu) ve referans (R grubu) *L. garvieae* suşları, K: kontrol grubu.52

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: <i>L. garvieae</i> ve <i>L. piscium</i> bakterilerinin biyokimyasal özellikleri (Buller, 2004; Austin ve Austin, 2012).	12
Tablo 2.2: <i>L. garvieae</i> ' nin biyotiplerinin ayırt edici özellikleri (Eldar ve diğ., 1999; Vela ve diğ., 2000; Buller, 2004; Çağırğan ve diğ., 2004).	13
Tablo 2.3: Bazı tatlısu ve acısu balıklarındaki lökosit sayıları (Bullis, 1993).	17
Tablo 2.4: Farklı deniz balıklarında hematokrit ve hemoglobün değerleri (Larson, 1976).	18
Tablo 4.1: Deneysel çalışmadaki balıklara ait günlük ölüm oranları (adet).	31
Tablo 4.2: Deney balıklarından yeniden izole edilen referans ve yerli <i>L.garvieae</i> suşlarının biyokimyasal özellikleri.	35
Tablo 4.3: Kontrol (K) ve deney grubundaki (D1, D2) balıklara ait hematokrit değerleri.	377
Tablo 4.4: Kontrol ve deney grubunda yer alan balıkların kanlarındaki sedimentasyon hızı.	38
Tablo 4.5: Kontrol ve deney grubunda yer alan balıkların kanlarındaki koagülasyon süresi.	39
Tablo 4.6: Deney boyunca enfekte balıklarında kanında ölçülen günlük eritrosit değerleri (hücre/ml).....	41
Tablo 4.7: Deney boyunca enfekte balıklarında kanında ölçülen günlük lökosit değerleri (hücre/ml).....	42
Tablo 4.8: Mikro-well aglütinasyon plağının kuyucuklarındaki aglütinasyon titrelerinin spektrofotometrik ölçümü.	50
Tablo 4.9: ELISA tekniğinin uygulanma prosedürü.	51
Tablo 4.10: ELISA plağına ait spektrofotometredeki verileri.	53

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
BEA	: Bile Eskulin Agar
BHIA	: Brain Heart Infusion Agar
CFU	: Colony Forming Unit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
IgM	: Immunoglobulin-M
NaCl	: Sodyum Klorür
OPD	: Orto-fenilendiamindihidroklorid
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TSA	: Trypticase (Tryptone) Soy Agar
TSB	: Trypticase Soy Broth
mm	: Milimetre
µm	: Mikrometre
Mab	: Monoclonal Antibody (Antikor)
HRPO	: Horseradish peroksidase
ESO	: Eritrosit-Sedimentasyon oranı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜLTÜR LEVREKLERİNDE (*Dicentrarchus labrax* L.) DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN *LACTOCOCCOSİS*'İN BAZI TEŞHİS METOTLARI İLE TESPİTİ

Sena Zeynep GÖKEN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Tülay AKAYLI

Bu tezde; kültür levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax* L.) *Lactococcus garvieae* ile deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonun patogenezinin belirlenmesinin yanısıra bakteriyolojik, hematolojik, histopatolojik ve serolojik yöntemler kullanılarak hastalığın teşhisi amaçlanmıştır. Ege Bölgesi'ndeki özel bir işletmeden temin edilen 50-70 gr ağırlığındaki 185 adet balık örneği öncelikle, adaptasyon işlemine tabi tutulmuş, sonrasında ise, balıklar 50 gün süren deneysel çalışmada kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılacak LD₅₀ dozu belirlendikten sonra, 10⁸ CFU/ml hücre yoğunluğa sahip yerli ve referans (ATCC 43921) *L. garvieae* suşları farklı deney gruplarındaki balıklara intraperitoneal olarak verilerek enfeksiyon oluşturulmuştur. Deneysel çalışmanın 6. gününden itibaren enfekte balıklarda eksternal olarak göz, karın, anüs çevresinde hemoraji ve skolyoz gözlenirken, internal olarak ise, karaciğerde solgunluk, nodül oluşumu, splenomegali, kalpte büyüme ve hemorajilerin geliştiği dikkati çekmiştir. Hematolojik incelemeler sonucu enfeksiyonun hasta balıkların kan hücrelerinin

morfolojilerinde bozukluğa, kan değerlerinde düşüşün yanı sıra eritrosit-sedimentasyon oranı ve koagülasyon süresinde de düşüğe neden olduğu gözlenmiştir. Histopatolojik incelemede, etkenin enfekte balıkların iç organlarında hemoraji, hiperemi ve nekroz gibi çeşitli patolojik bozukluklara neden olduğu tespit edilmiştir. Farklı serolojik yöntemler kullanılarak hastalığın başlangıcından itibaren teşhisinin yanı sıra serumdaki antikor seviyesi ölçülmüş ve ELISA'nın lam ve mikro-well aglütinasyon yöntemlerine göre daha duyarlı bir yöntem olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak; *L. garvieae*'nin enfekte balıklarının karaciğerinde görülen nodül benzeri yapıların yanı sıra skolyoza sebep olduğu, hematolojik incelemeler sonucu enfeksiyonun hasta balıkların kanlarına ait eritrosit sedimentasyon oranında ve koagülasyon süresinde düşüğe neden olduğu ilk kez bu çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Hastalığın yurdumuzdaki kültür deniz balıklarında görülmesi halinde etkenin oluşturduğu klinik tablonun bilinmesinin yanısıra farklı teşhis yöntemlerinin kullanılması ile erken ve hızlı teşhisinin yapılması mümkün olacaktır.

Eylül 2016, 82 sayfa.

Anahtar kelimeler: Levrek balığı, *Lactococcus garvieae*, deneysel enfeksiyon, hematoloji, seroloji

SUMMARY

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF EXPERIMENTALLY INDUCED *LACTOCOCCOSIS* IN CULTURED SEA BASS (*Dicentrarchus labrax* L.) BY SOME DIAGNOSTIC METHODS

Sena Zeynep GÖKEN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Aquaculture

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Tülay AKAYLI

The aim of the present study is to determine the pathogenesis of experimentally induced infection in cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with *Lactococcus garvieae*, as well as diagnose the disease by using haematologic, histopathologic and serologic methods. 185 European sea bass weighing between 50-70 gr that were supplied from a commercial fish farm located in the Aegean region of Turkey were first adapted to the laboratory conditions and later fish samples were used in the 50-day experimental study.

After the determination of LD₅₀ dose to be used in the study, local and reference (ATCC 43921) *L. garvieae* strains with a density of 10⁸ CFU/ml were injected intraperitoneally to the fish divided into different experimental groups, as a result, an infection was induced. After the 6th day of experimental infection, externally hemorrhages around eyes, ventral area, anus, and scoliosis was observed, in addition, internally sloughing of the liver, nodule development, splenomegaly, expansion in the heart and hemorrhages on the

organs were also observed in the infected fish. In the hematologic analyses, it was determined that the disease caused deflections on the blood cell morphology and besides decreases in the blood parameters in addition erythrocyte-sedimentation rate and coagulation duration. It was observed that the agent caused various pathological disorders such as hemorrhages, hyperemia and necrosis in the internal organs of the infected fish samples in the histopathological examination. Various serological methods made the diagnosis of the disease on the earlier stages possible. Moreover, antibody level in the serum was determined and, importantly, ELISA was suggested as more sensitive method compared to the slide and micro-well agglutination methods.

As a result, it was observed that *L. garvieae* causes scoliosis and the development of nodule-like structures on the liver of the infected fish. After the hematological examination, it was determined that the infection causes a decrease in the erythrocyte-sedimentation rate and coagulation duration for the first time in the present study. Through gaining knowledge on the clinical symptoms of the disease and using various methods, an early and rapid diagnosis of the disease could be possible, in case of occurrence in the marine fish cultured in Turkey.

September 2016, 82 pages.

Keywords: European sea bass, *Lactococcus garvieae*, experimental infection, hematology, serology

1. GİRİŞ

Ülkemizde hızla artan nüfus ve balık avcılığı doğal stokların azalması kültür balıkçılığını halkın besin ihtiyacını karşılamada alternatif bir sektör haline getirmiştir. Yurdumuzda 1970’li yıllarda tatlı sularda gökkuşuğu alabalığı, 1980’li yıllarda da denizlerde yüzer kafeslerde deniz balığı yetiştiriciliği başlamıştır. Daha sonraki yıllarda çipura (*Sparus aurata*) ve levrek balıklarının (*Dicentrarchus labrax*) yetiştiriciliği Ege, Akdeniz ve Karadeniz’de çok hızlı bir şekilde yayılış göstererek üretim miktarları artmıştır. 2014 yılına ait TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) verilerine göre ülkemizde yapılan deniz balıkları yetiştiriciliğinin miktarı 126.894 ton/ yıl’ dır ve levrek balığı yetiştiriciliği 74.653 ton / yıl üretim kapasitesi ile toplam yetiştiriciliğin yarısından fazlasını (%58,8) oluşturmaktadır (BSGM,2016).

Dünyada ve ülkemizde kültür balıklarının yetiştiriciliğindeki ekonomik kayıpların daha çok patojen bakterilerin neden olduğu bakteriyel hastalıklardan kaynaklandığı rapor edilmektedir. Akuakültürde bakteriyel enfeksiyonlara çoğunlukla Gram-negatif özellik gösteren bakteriler neden olmaktadır (Austin ve Austin, 2012). Ancak son yıllarda Gram-pozitif kokların da akuakültür sektöründe ekonomik kayıplara neden olan olduğu bildirilmektedir (Varvarigos, 2001; Timur ve Akaylı, 2003; Austin ve Austin, 2012).

Gram-pozitif koklar tarafından oluşturulan ve septisemi ile seyreden hastalığa streptococcosis adı verilmiştir. Lactococcosis (Enterococcosis) ise tatlı su balıkları ve deniz balıklarında *Lactococcus garvieae*’nin neden olduğu streptokokal bir hastalıktır. Streptococcosis ilk olarak 1950’li yılların sonunda Japonya’daki gökkuşuğu alabalıklarında (*O. mykiss*) teşhis edilmiştir (Hoshina ve diğ., 1958). Daha sonraki yıllarda Japonya’da kültürü yapılan sarıkuyruk balıklarında (*Seriola quinqueradiata*) *L. garvieae*’nin neden olduğu bir epizootik tanımlanmıştır (Salati, 2011). Başlangıçta etken *Enterococcus* sp. olarak adlandırılmasına rağmen daha sonraki yıllarda bu bakteri biyokimyasal özelliklerindeki farklılıklar nedeniyle *L. garvieae* (sinonim: *Enterococcus seriolacida*) olarak tanımlanmıştır (Vendrel ve diğ., 2006).

Lactococcosis dünyanın birçok ülkesine yayılmış, akuatik organizmalarda ekonomik kayıplara neden olan bir hastalıktır. Hastalığa neden olan bakteri Avusturya, Güney Afrika (Carson ve diğ., 1993), İtalya (Ghittino ve Prearo, 1992), Türkiye (Diler ve diğ., 2002), Yunanistan (Savvidis ve diğ., 2007) ve İran' daki (Soltani ve diğ., 2008) kültür gökkuşağı alabalıklarında yüksek oranda ölüme neden olan patojen olarak izole edilmiştir. Bu etken sarı kuyruk balıklarından (Kusuda ve diğ., 1991), tilapia balıklarından (*Oreochromis sp.*) (Evans ve diğ., 2009), Japon yılan balıklarından (*Anguilla japonica*) (Kusuda ve diğ., 1991), dere pisisi balığından (*Paralichthys olivaceous*) (Baeck ve diğ., 2006) , kefal balıklarından (*Mugil cephalus*) (Chen ve diğ., 2002), yayın balıklarından (Ravelo ve diğ., 2003), Adriyatik mersin balıklarından (*Acipenser naccarii*) (Salati ve diğ., 1996), siyah kaya balıklarından (*Sebastes schlegeli*) (Kang, 2004), tatlı su karideslerinden (*Macrobrachium rosenbergii*) (Chen ve diğ., 2001), kızıl deniz lapininden (*Coris aygula*) de (Colorni ve diğ., 2003) izole edilmiştir. Sazan balığının (*Cyprinus carpio*) hastalığa karşı dayanıklı olduğu bildirilmiştir (Eldar ve diğ., 1995). Enfeksiyon daha çok özellikle market büyüklüğündeki kültür balıklarında ölümlere neden olduğu için ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu kayıpların önlenmesi için hastalığın teşhisi ve çıkışı ile ilgili koruyucu önlemlerin alınması önem teşkil etmektedir (Vendrell ve diğ., 2006).

L. garvieae'nin kültür deniz balıklarında oluşturduğu enfeksiyonla ilgili çeşitli yayınlar olmasına rağmen ülkemizde bu hastalıkla ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Bu hastalık ülkemizde ilk kez 2001 yılında Akdeniz Bölgesi'ndeki bir tatlı su türü olan gökkuşağı alabalığı işletmelerinde yüksek oranda ölüme neden olmuş ve bu bölgedeki işletmelerde hızlı bir yayılım göstererek ciddi kayıplara (%80 oranında ölüm) neden olmuştur (Diler ve diğ., 2002). Daha sonraki yıllarda hastalık yurdumuzun farklı bölgelerindeki alabalık işletmelerine de hızlı bir şekilde yayılmıştır. Çağırğan (2004) ülkemizdeki kültür gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *L. garvieae* suşlarını hızlı tanı kitlerinden olan API 20 STREP ve API 50 CH'yı kullanarak fenotipik açıdan incelemiş, lam aglütinasyon tekniği ile kapsül oluşumunu araştırmış ve yaptığı çalışma sonucunda bu izolatların homojen ve biyotip 3 olması ve İspanya'daki izolatlarla yüksek oranda benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. Altun ve diğ. (2005) farklı alabalık işletmelerinden temin edilen lactococcosis şüpheli alabalıkların doku örneklerini histopatolojik açıdan incelemiştir. Kubilay ve diğ. (2005) *L. garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarını

çalışmışlardır. Kav (2005) doktora tezinde alabalıklarda Streptococcus'e karşı aşı uygulamalarının etkinliği çalışmış, Altun ve diğ. (2007) farklı alabalık çiftliklerinden izole ettikleri *L. garvieae* suşlarının antijenik ve immunojenik profillerini moleküler bir teknik olan Western-Blotting ile incelemiştir. Özer ve diğ. (2008) Mersin ilinde yetiştiriciliği yapılan alabalıklarda streptococcosisin varlığını araştırmış ve izole edilen bakterilerin disk difüzyon yöntemini kullanarak antibakteriyel duyarlılık testlerini yapmışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalar arasında Timur ve diğ. (2011) Marmara Bölgesi'ndeki kültür gökkuşuğu alabalıklarında Lactococcosis'in bakteriyolojik ve histopatolojik metodlarla teşhisini yaparken, Avcı ve diğ. (2014) bu tür balıklarda deneysel olarak *L. garvieae* enfeksiyonu oluşturarak komparatif histopatolojik ve immunohistokimyasal bir çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Bu veriler ışığında yapılan çalışmalara bakıldığında yurdumuzdaki araştırmacıların bu bakteri ile ilgili daha çok bir tatlı su balığı türü olan gökkuşuğu alabalığı üzerinde patojenite testi ile ilgili çalışmalar yaptıkları gözlenirken etkenin yurdumuzdaki kültür deniz balıklarında oluşturduğu enfeksiyonla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde; antijen-antikor reaksiyonlarına dayalı serolojik yöntemler uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. 1960'lı yıllardan bu yana kullanılan aglütinasyon ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibi serolojik yöntemler balık patojenlerinin teşhisinde, balık serumlarında spesifik patojenlere karşı oluşan antikorların tayininde, aşılarda geliştirilmesinde ve serotiplendirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Aglütinasyon testleri balıklarda bakteriyel hastalıkların teşhisinde, patojen suşların serolojik olarak karşılaştırılmasında, patojene karşı balıkta antikor aranmasında kullanılan en temel serolojik yöntemdir (Toranzo ve diğ. 1987; Schill ve diğ.,1989). Mikro-well aglütinasyon testi serumların titresini belirlemek için kullanılmaktadır (Kubilay, 1997). Ancak ELISA tekniğine göre hassasiyeti daha azdır. ELISA, antijen-antikor reaksiyonunun tespit edilerek ölçülmesi esasına dayanan çok hassas ve zaman almayan diğer bir serolojik yöntemdir. Günümüzde geliştirilen ve enfeksiyonların teşhisinde çok geniş bir kullanım alanı bulan ELISA tekniği balık hastalıklarının teşhisinde, hastalık etkenlerinin serotiplendirilmesinde ve aşılama çalışmalarında oldukça yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (Del Pozo, 2005).

Bu çalışmada *L. garvieae*'nin deniz balıklarında neden olabileceği enfeksiyonunun klinik, patolojik, hematolojik ve bazı serolojik bulgularını önceden tespit etmek amacıyla kültür levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) deneysel olarak enfeksiyon oluşturulması ve bu enfeksiyonun tespiti için bakteriyolojik, histopatolojik yöntemler ile lam aglütinasyon, mikro-well aglütinasyon ve ELISA gibi serolojik metodların kullanılması amaçlanmıştır.

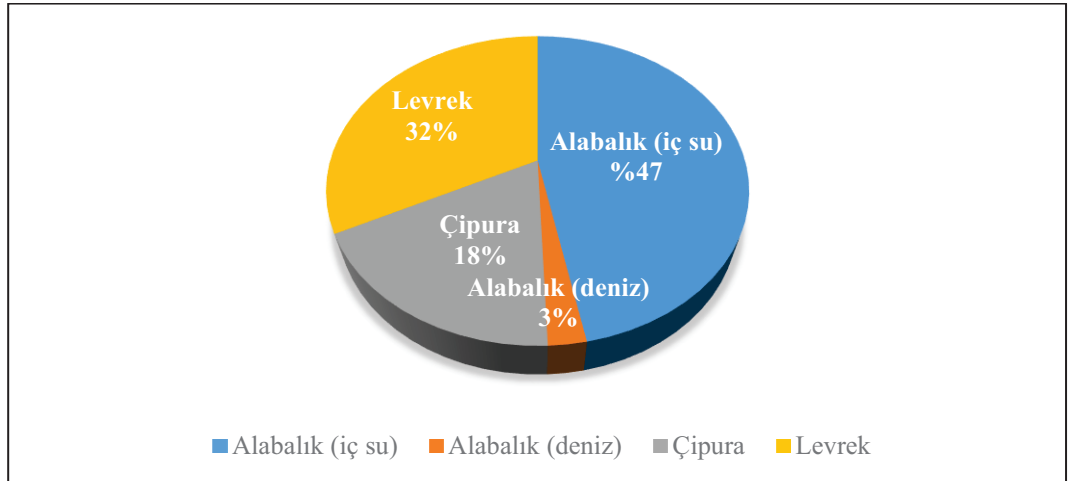
Bu amaç doğrultusunda ileride kültür deniz balıkları için risk teşkil eden bu patojen mikroorganizmanın erken identifikasyonunda gerek klinik tablonun değerlendirilmesi gerekse farklı serolojik yöntemlerin karşılaştırmalı olarak kullanılması ile hastalığın deniz kültür balıklarında görülmesi halinde hızlı identifikasyonunun yapılması mümkün olacaktır. Ayrıca ülkemizdeki özellikle pazar boyundaki kültür alabalıklarında ekonomik kayıplara neden olan bu hastalığın teşhisinin hızlı yapılması için kullanılacak en avantajlı olan serolojik yöntem de belirlenecektir.

Bu tekniğin son zamanlarda yurt dışındaki ticari firmalar tarafından herhangi bir mikroorganizmaya karşı geliştirmiş oldukları immün balık serum örneklerinin saklanması kullanıldığı görülmektedir. Bu tez kapsamında gerçekleştirilecek olan ELISA tekniğinde kullanılacak olan levrek balıklarına karşı geliştirilmiş monoklonal antibody (Mab) içeren serum örneği de liyofilize şekilde yurtdışındaki ticari bir firmadan satın alınmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 LEVREK BALIĞI' NIN (*DICENTRARCHUS LABRAX*) MORFOLOJİK VE BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Türkiye’de su ürünleri yetiştiriciliği 1970’li yılların başında başlamıştır. Başlarda yetiştiricilik faaliyetlerinin çoğu karasal kesimde yapılırken 1980’li yılların başından itibaren denizlerde kafes yetiştiriciliği başlamıştır. Ekstansif, yarı entansif ve entansif olarak yapılan levrek yetiştiriciliği ülkemizde ilk olarak 1980’li yılların ortalarında doğadan toplanan yavruların kafeslerde büyütülmesi şeklinde başlamıştır (Alpbaz, 2005). Ege ve Akdeniz’de ağırlık kazanan çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) yetiştiriciliği çok hızlı bir şekilde yayılmıştır (Memiş, 2010). Levrek balıkları Dünya’da Kuzey Atlantik’ten tüm Akdeniz’e kadar yaygın olan bir türdür (Alpbaz, 2005). TÜİK verilerine göre 2014 yılında 74.653 ton levrek üretimi yapılmıştır (BSGM, 2016). Bu verilere göre Türkiye’de yapılan su ürünleri yetiştiriciliğinde levrek balığı yetiştiriciliğinin %32, çipura yetiştiriciliğinin %18, iç sularda alabalık yetiştiriciliğinin %47, denizlerde yapılan alabalık yetiştiriciliğinin ise %3 oranında bir dilime sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan kültür balıklarının üretim miktarları (BSGM, 2016).

Su sıcaklığı ve tuzluluk değişimlerine karşı toleranslı olan levrek balıkları 5-28 °C sıcaklık ile ‰ 5-50 tuzluluk değerleri arasında yaşayabilirler. 7-8 mg/l çözünmüş oksijen düzeyini tercih ederlerken büyüme için ideal su sıcaklığının 22-24°C olduğu bildirilmiştir (Akbulut ve diğ., 1999). Levrekler ayrı eşeylidirler, erkek ve dişi balıklar birbirine benzemelerine rağmen bazı ayırt edici özellikleri vardır. Dişi balıklarda burun yapısı daha sivrice olup, vücutları daha geniş yapılıdır. Erkekler ise ince-uzun yapılı olup, ağırlıkları dişilere nazaran daha azdır. Ergin bireylerde üreme periyodunda testis ve ovaryumlar birbirlerinden oldukça farklıdır. Vücudun karın bölgesinin arka kısmında yer alan gonadlar dişilerde genital açıklıkla, erkeklerde ise genital bir çıkıntı ile dışarı açılır. Ovaryumlar silindirik şekilde olup, bu dönemde pembemsi veya turuncu renktedirler. Testisler ise üçgenimsi bir yapıya sahip olup, renkleri de beyazdır (Akbulut ve diğ., 1999). Kültür ortamında genel olarak erkek bireyler 2., dişiler 3. Yaşta cinsi olgunluğa ulaşırlar (Alpbaz, 2005).

Levrek balıkları *Dicentrarchus* genusuna ait balıklardır. Bu genusun en önemli özelliği ağız büyük, operkulumun arka kenarı özellikle alt taraf tırtıklı ve operkulum üzerinde 2-3 tane yassı diken bulunmasıdır (Şekil 2. 2). Dorsal yüzgeç 2 adet, kaudal yüzgeci çatal ve yan çizgi kuyruğun ucuna kadar uzanır. Vomer dişler anteriörde ve yarım ay şeklindedir. Olgunluk devresinden önce genç bireylerin üzerinde siyah benek görülür. Bu beneğe yetişkinlerde rastlanmaz (Barnabe, 1990; Uçal ve Benli, 1993; Alpbaz, 2005).

Levrek Balığının Sistematikteki Yeri (Mater ve diğ., 1989)

Phylum: Vertebrata

Subphylum: Pisces

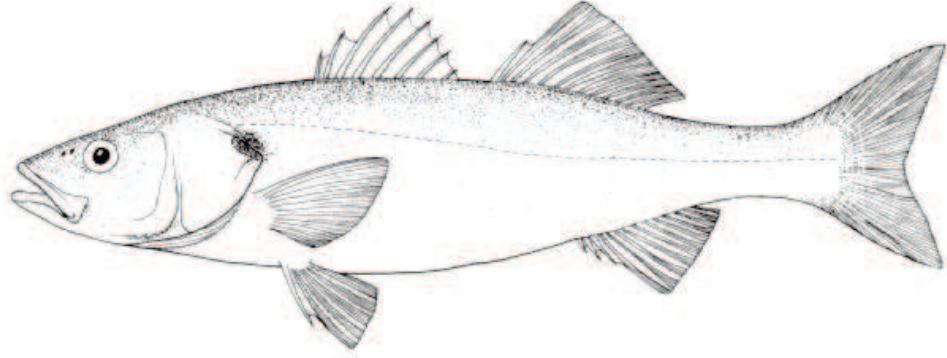
Classis: Osteichthyes

Ordo: Perciformes

Familia: Serranidae

Genus: *Dicentrarchus*

Species: *Dicentrarchus labrax* (Linne 1758)



Şekil 2.2: Levrek balığının (*Dicentrarchus labrax*, L.) dıştan görüntüsü (FAO).

Levrek balıkları (*D. labrax*) ülkemiz denizlerinde var olan ve yüksek kaliteli ete sahip bir balık türüdür. Kumlu, çamurlu sığ biyotoplarda, sıcaklığa ve tuzluluğa karşı gösterdiği tolerans ile nehir ağzlarında ve lagünlerde yaşayan bir littoral bölge balığıdır. Kıyılarda yaşamayı seven ve daha çok diğer küçük balık yavrularını yiyerek gıda ihtiyaçlarını karşılarlar (Alpbaz, 2005). Akdeniz’de gonadlarda gelişme Eylül aylarında başlar ve Aralık-Ocak aylarına kadar devam eder. Genel olarak su sıcaklığının 11-14 °C arası olduğu en soğuk ayları yumurtlama mevsimi olarak tercih ederler (Alpbaz, 2005).

2.2 LACTOCOCCOSIS

Tatlı su ve deniz balıklarında etken bakterinin epizootiklere neden olduğu hastalığa “Lactococcosis” adı verilir. Dünyanın birçok ülkesine yayılmış olan bu hastalık akuatik organizmalarda ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Diler ve diğ., 2002; Avcı ve diğ., 2010; Austin ve Austin, 2012).

Hastalığın etkeni olan *Lactococcus garvieae* Avusturya, Güney Afrika (Carson ve diğ., 1993), İtalya (Ghittino ve Prearo, 1992; Eyngor ve diğ., 2004), Türkiye (Diler ve diğ., 2002), Yunanistan (Savvidis ve diğ., 2007) ve İran (Soltani ve diğ., 2008) gibi ülkelerdeki kültür gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) yüksek oranda ölüme neden olan patojen olarak bildirilmiştir. Ayrıca etkenin tilapia (*Oreochromis sp.*) (Evans ve diğ., 2009), Japon yılan balığı (*Anguilla japonica*) (Kusuda ve diğ., 1991), dere pisisi (*Paralichthys*

olivaceous) (Baeck ve diğ., 2006), yayın (Ravelo ve diğ., 2003) ve Adriyatik mersin balığı (*Acipenser naccarii*) (Salati ve diğ., 1996) gibi tatlı su balıkları yanı sıra tatlı su karidesinde (*Macrobrachium rosenbergii*) (Chen ve diğ., 2001) de patojen olduğu bildirilirken sazan balığının (*Cyprinus carpio*) hastalığa karşı dayanıklı olduğu rapor edilmiştir (Eldar ve diğ., 1995). Bu etken sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*) (Kusuda ve diğ.,1991), kefal (*Mugil cephalus*) (Chen ve diğ., 2002), siyah kaya balığı (*Sebastes schlegeli*) (Kang ve diğ., 2004) ve kızıl deniz lapini (*Coris aygula*) (Colorni ve diğ., 2003) gibi deniz balıklarından da izole edilmiştir.

Diler ve diğ. (2002) Lactococcosis'in ülkemizde ilk kez 2001 yılında Akdeniz Bölgesi'ndeki bir tatlı su türü olan gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) işletmelerinde doğal olarak enfekte olan ve yüksek oranda ölümler ile seyreden epizootik şeklinde hızlı bir yayılım göstererek ciddi kayıplara (%80 oranında ölümler) yol açtığını bildirmişlerdir. Daha sonraki yıllarda hastalık yurdumuzun farklı bölgelerindeki alabalık işletmelerine de hızlı bir şekilde yayılmıştır. Çağırğan (2004) ülkemizdeki kültür gökkuşağı alabalıklarından izole ettiği *L.garvieae* suşlarını fenotipik açıdan incelerken Altun ve diğ. (2005) farklı alabalık işletmelerinden temin edilen Lactococcosis şüpheli alabalıkların histopatolojisini çalışmışlardır. Kubilay ve diğ. (2005) *L. garvieae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarını çalışırken, Kav (2005)doktora tezinde alabalıklarda Streptococcosis'e karşı aşı uygulamalarının etkinliğini araştırmış, Altun ve diğ. (2007) farklı alabalık çiftliklerinden izole ettikleri *L. garvieae* suşlarının antijenik ve immunojenik profillerini moleküler bir teknik olan Western-Blotting ile incelemişlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar arasında Timur ve diğ. (2011) Marmara Bölgesi'ndeki doğal olarak enfekte kültür gökkuşağı alabalıklarında hastalığın teşhisini bakteriyolojik ve histopatolojik metodlarla yapmışlardır. Türe ve diğ. (2012) ise Karadeniz bölgesi'ndeki enfekte kültür gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *L. garvieae* suşlarının genetik çeşitliliğini moleküler tekniklerden olan PFGE (Darbeli Alan Jel Elektrofrezisi) ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile tespit etmişlerdir.

2.2.1 Hastalığın Karakteristik Özellikleri

L. garvieae' nin neden olduğu Lactococcosis birçok balık türünde yüksek oranda ölümlere neden olan, akut ve kronik formda seyreden hemorajik septisemiyle karakterize edilen sistemik bir enfeksiyöz hastalıktır (Eldar ve diğ., 1996; Buller, 2004; Austin ve Austin, 2012). Hastalığın tipik klinik belirtilerinin salmon, sarıkuyruk ve kefal balığında benzerlik gösterdiği bildirilmektedir. Enfekte balıklarda genel olarak görülen klinik bulgular anoreksia, letarji, oryantasyon kaybı, düzensiz yüzme, bilateral ekzoftalmia, renkte koyulaşma, ascites, anal prolapsus yanı sıra gözde, yüzgeç diplerinde ve operkulumda hemorajilerin görülmesidir (Kang ve diğ., 2004; Timur ve diğ., 2011; Avcı ve diğ., 2014). Ayrıca solungaç filamentlerinde kalınlaşma, hemoraji ve mukus miktarında artış bildirilirken karaciğerde büyüme yanı sıra bu organın renginin açıldığı ve sarımsı beyaz renkte görüldüğü bildirilmiştir (Avcı ve diğ., 2010). Ayrıca bu bakteri internal organlarda peteşi ve hemorajilere yol açarak damar endotelyumunda lezyonlara neden olmaktadır (Kang ve diğ., 2004; Avcı ve diğ., 2010; Timur ve diğ., 2011; Avcı ve diğ., 2014).

Histopatolojik incelemelerde *L. garvieae*' nin daha çok enfekte balığın iç organlarını ve gözünü etkilediği daha sonrasında ise lezyonlara sebep olduğu rapor edilmiştir. Lezyonlar çoğunlukla enfekte balığın oküler alan, beyin ve kalbinde gözlemlenirken etkenin göz, beyin, kas ve iç organları (kalp, karaciğer, dalak, böbrek gibi) oluşturan dokularda nekroza ve hemorajilere de neden olduğu bildirilmiştir. Hasta balıkların viseral organlarından alınan doku örnekleri histopatolojik olarak incelendiğinde böbrek dokusunda multifokal liquefactive nekroz ve hemoraji, böbrek tübüllerinin epitel hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz, poliglomerular ödem ve melanomakrofaj odakları, internal hemapoyetik dokuda boşalma, karaciğer parankim hücrelerinde diffüz erime veya multifokal liquefactive nekroz odakları, bağırsak mukoza epitelinde nekroz ve bağırsak lümenine dökülme gözlenmiştir (Timur ve diğ., 2011; Avcı ve diğ., 2014). Avcı ve diğ. (2010) *L. garvieae* ile doğal enfekte gökkuşuğu alabalıklarında yaptıkları incelemelerde histopatolojik olarak en yaygın bulguları kalp ve peritonda gözlemlerken pilorik kese, göz, solungaç ve karaciğerde de çeşitli patolojik bozukluklar rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra farklı araştırmacılar kalpte yangısal hücrelerden ve fibrinden oluşan epicarditisi ve myocardiumda lenfoid hücre infiltrasyonlarını teşhis etmiş, göz dokusu damar lümeninde Gram-pozitif bakterileri saptamış, solungaçlarda kanama talenjektiazis ve hiperplaziyi,

karaciğerde hepatositlerde rejenerasyon ve perivasküler lenfoid hücre infiltrasyonlarını gözlemlemiştir (Del Pozo, 2005; Salati, 2011).

2.2.2 Hastalık Etkeninin Karakteristik Özellikleri

Gram-pozitif bakteriler hücre morfolojilerine göre Gram-pozitif basiller ve Gram-pozitif koklar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Aerobik ve fakültatif özellik gösteren Gram-pozitif kok bakteriler katalaz aktivitesi, hücre morfolojisi ve hücre dizilişlerine göre *Micrococcaceae* ve *Streptococcaceae* olmak üzere iki alt familyaya ayrılmaktadır (Buller, 2004). Bu iki familya üyelerinin ayırt edici en önemli özelliği katalaz testine verdiği reaksiyonlardaki farklılıktır. *Micrococcaceae* familyasına ait bakteriler bu testte pozitif reaksiyon verirken *Streptococcaceae* familyası üyeleri ise negatif reaksiyon vermektedir (Buller, 2004). Hasta balıklardan izole edilen Gram-pozitif, sitokrom-oksidad ve katalaz testi negatif olan, hareketsiz kok bakteriler *Streptococcaceae* familyasına aittir. Yeni tekniklerin gelişmesiyle genotipik farklılıklara bağlı olarak bu familya yeniden sınıflandırılmış ve *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus* ve *Carnobacterium* olmak üzere 4 adet farklı genus içerdiği bildirilmiştir (Vendrell ve diğ., 2006).

L. garvieae' nin sistematigi (De Vos ve diğ., 2009):

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Lactobacillales

Family: Streptococcaceae

Genus: *Streptococcaceae*

Species: *Lactococcus garvieae*

Lactococcosis ile enfekte balıklardan izole edilen patojen bakteri Gram-pozitif, hareketsiz, sitokrom-oksidad ve katalaz testinde negatif özellik göstermesi nedeniyle *Streptococcaceae* familyasına dahil edilmiş ve bu bakteri önceleri *Enterococcus seriolicida* olarak tanımlanmıştır (Prieta ve diğ., 1993). Ancak daha sonraki yıllarda bakterinin fenotipik özellikleri, tüm hücre proteinlerinin SDS-PAGE analizinde (Pot ve diğ., 1996) farklılık göstermesi ve yapılan DNA-DNA hibrit çalışmaları sonucunda

Lactococcus genusunun bir üyesi olan *Lactococcus garvieae* olarak adlandırılmıştır (Eldar ve diğ., 1996). *Lactococcus* genusunun insanlarda ve sıcakkanlı hayvanlarda hastalığa neden olan *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. raffinolactis* olmak üzere 4 türü mevcuttur. Balıklarda ise hastalığa neden olan en önemli türler *L. garvieae* (Salati, 2011; Austin ve Austin, 2012) ve *L. piscium* olarak bildirilmiştir (Williams ve diğ., 1990; Austin ve Austin, 2012).

Balıklarda en çok hastalığa neden olan *L. garvieae* ve *L. piscium* türleri; Gram-pozitif, kok şeklinde, hareketsiz ve kısa zincirler oluşturan bakterilerdir (Buller, 2004; Austin ve Austin, 2012). Bu bakterilerin TSA (Tryptic Soy Agar) ve BHIA (Brain Heart Infusion Agar) gibi besiyerlerinde oda sıcaklığında yaklaşık 2-3 gün süreyle inkübe edildiğinde küçük (yaklaşık 1 mm çapında) ve grimsi beyaz renkte koloniler oluşturduğu belirtilmiştir (Buller, 2004; Austin ve Austin, 2012). *L. garvieae*'nin biyokimyasal özellikleri suşa bağlı olarak değişebilmektedir. Tablo 2.1' de belirtildiği gibi *Lactococcus garvieae*'nin hemoliz kabiliyeti, eskulin besiyerinde üreme göstermesi yanısıra laktoz ve rafinoz gibi şekerleri kullanması nedeniyle *L. piscium*'dan ayrılmaktadır.

Tablo 2.1: *L. garvieae* ve *L. piscium* bakterilerinin biyokimyasal özellikleri (Buller, 2004; Austin ve Austin, 2012).

Biyokimyasal özellikler	<i>L.garvieae</i>	<i>L.piscium</i>
Gram boyama	+	+
Hücre şekli	ovoid	ovoid
Hemoliz	α	-
Katalaz	-	-
VP	+	+
Arjinin	+	+
H ₂ S	-	-
Bile eskulin agar	+	-
Eskulin	+	+
Glukoz	+	+
Galaktoz	+	+
Laktoz	-	+
Maltoz	+	+
Mannitol	+	+
Rafinoz	-	+
Sukroz	+,-	+
Sorbitol	-	-
Trehaloz	+	+
Arabinoz	-	-
Fruktoz	+	+

(+):pozitif reaksiyon (-): negatif reaksiyon

Araştırmacılar önceleri balıklarda enfeksiyona neden olan *L. garvieae* suşlarının fenotipik özelliklerinde görülen farklılıklara bağlı olarak etkenin 3 adet biyotipinin varlığını belirtmiş (Eldar ve diğ., 1999) ancak daha sonraki çalışmalarda bu bakterinin Tablo 2.2’de belirtildiği gibi 13 adet farklı biyotipinin olduğunu rapor etmişlerdir (Vela ve diğ., 2000). Serolojik olarak *L. garvieae*’nin Avrupa kapsüllü serotipi, Japonya kapsüllü serotipi ve kapsül içermeyen Avrupa ve Japonya bölgelerinin serotipi olmak üzere üç farklı serotipe ayrılmaktadır (Vendrell ve diğ., 2006).

Tablo 2.2: *L. garvieae*' nin biyotiplerinin ayırt edici özellikleri (Eldar ve diğ., 1999; Vela ve diğ., 2000; Buller, 2004; Çağırğan ve diğ., 2004).

Biyokimyasal Özellikler	Biyotip 1, 2, 12	Biyotip 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13	Biyotip 8, 9
Gram	+	+	+
Hareket	-	-	-
Hemoliz	α	α	α
Oksidaz	-	-	-
Arjinin	+	+	+
VP	+	+	+
Eskulin	+	+	+
Laktoz	+	+	+
Maltoz	+	+	+
Mannitol	+	+	-
Sorbitol	-	-	-
Sukroz	+	-	-
Trehaloz	+	+	+
Sıcaklık	10-45	10-45	10-45
NaCl'de üreme	0-6.5	0-6.5	0-6.5

(+):pozitif reaksiyon (-): negarif reaksiyon

2.2.3 Patojenite Mekanizması

Patojenite, bir mikroorganizmanın genetik özelliğine bağlı olarak konakçı canlıya zarar vermesi sonucu bu canlıda potansiyel olarak hastalık oluşturma yeteneğidir (Austin ve Austin, 2012). *L. garvieae*'nin patojenitesiyle ilgili birçok çalışmada yaygın olarak serotip KG- olarak sınıflandırılan kapsüllü suşların serotip KG+ olarak sınıflandırılan kapsülsüz suşlara göre daha virulent olduğu teyit edilmiştir (Barnes ve Ellis, 2004; Kang ve diğ., 2004). Farklı su sıcaklıklarında yürütülen gökkuşağı alabalığındaki deneysel çalışmaların birinde 14 °C' deki bir grup balıkta ölüm görülmezken, 18 °C' deki balık grubunda % 85' in üzerinde ölüm görüldüğü rapor edilmiştir (Avcı ve diğ., 2014). Kefallerde intramuskuler enfeksiyonda aşılama 2 gün sonra ilk semptomlar ile %100 ölüm oluşurken (Chen ve diğ., 2002), sarı kuyruk balıklarında intraperitoneal yolla oluşturulan deneysel enfeksiyonda aşılama sonrası 2-3 günde hastalık belirtileri görülmüştür (Vendrell ve diğ., 2006). Gökkuşağı alabalığında ise intraperitoneal olarak oluşturulan deneysel enfeksiyonda ilk semptomlar ile ölümler aşılama 3 gün sonra görülmüştür (Vendrell ve diğ., 2006). *L. garvieae* ile ilgili yapılan patojenite testlerine göre Lactococcosis' in daha çok 80 gramın altındaki balıklarda klinik semptomlara ve

ölümlere neden olduğu, hastalığın 50 gramlık balıklarda akut seyrettiği ve 100 gram ağırlığındaki daha büyük balıklara göre daha yüksek oranda ölüme neden olduğu rapor edilmiştir (Vendrell ve diğ., 2006). Yurdumuzdaki araştırmacılar olan Avcı ve diğ. (2014) kültürü yapılan gökkuşuğu alabalıklarında deneysel olarak *L. garvieae* enfeksiyonunu oluşturarak histopatolojik ve immunohistokimyasal bir çalışma gerçekleştirmiş, Ürkü (2011) de yaptığı çalışmasında bakterinin neden olduğu enfeksiyonu bakteriyolojik, serolojik ve histopatolojik olarak incelemiştir. Bugüne kadar yapılan tüm bu çalışmalarda kültür alabalıkları üzerinde gerçekleştiği görülmekte olup yurdumuzdaki kültür deniz balıklarında oluşturduğu enfeksiyonla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Halbuki yurdumuzdaki hasta kültür çipura (*S. aurata*) (Akaylı ve diğ., 2009) ve sinarit balıklarından (*Dentex dentex*) yapılan bakteriyolojik ekimler sonucunda da *Streptococcus* türleri izole ve identifiye edilmiştir (Akaylı ve diğ., 2015). Bu nedenle hastalığın yurdumuzdaki kültür deniz balıklarında görülme ihtimali yüksektir.

Hastalığın epidemiyolojik ve klinik olarak teşhisi lezyonların ve karakteristik semptomların gözlenmesine bağlıdır. Bir kıtaya ait su ürünleri yetiştirilen çiftliklerde benzer semptomlara neden olan bazı enfeksiyon proseslerini gözlemek mümkün olabilir. Bu yüzden etken bakteriyi identifiye edebilmek için farklı laboratuvar metodlarıyla (bakteriyolojik, hematolojik, serolojik ve histopatolojik yöntemler gibi) teşhis her zaman önemlidir. Epidemiyolojik teşhis su kalitesinin düşmesi ve su sıcaklığının artması gibi hastalık olasılığını arttıran çevresel parametrelere bağlıdır. Lactococcosis genellikle %10-80 oranında ölüme neden olabilen ve çok sayıda balığı etkileyebilen akut bir bakteriyel hastalıktır. Balıklarda klinik olarak letarji, anoreksia, melanozis, eratik yüzme, tek ya da çift taraflı ekzoftalmus, oküler ve perianal zonda ve yüzgeçlerde hemoraji (kanama) ve anal prolapsus gibi klinik semptomlar görülür (Vendrell, 2006).

2.2.4 Hastalığın Oluşumu

Lactococcosis daha çok market büyüklüğündeki kültür balıklarında yüksek oranda ölümlere neden olmasından dolayı hastalık çıkışının bilinmesine bağlı olarak, hastalığın teşhisi ve çıkışı ile ilgili önlemlerin zamanında alınmasına bağlı olarak hastalıktan kaynaklanan ekonomik kayıpların azaltılabileceği bildirilmiştir (Vendrell ve diğ., 2006). Hastalığın görülmesi sıcaklık ve su kalitesi gibi çevresel faktörlerden etkilenir,

enfeksiyonun daha çok yüksek sıcaklıkta görüldüğü bildirilmiştir. Hastalığın akut formunun 14-15 °C su sıcaklığında ortaya çıktığı rapor edilmesine (Prieta ve diğ., 1993) rağmen sıcaklık 18 °C'nin üzerinde olduğunda da görüldüğü rapor edilmiştir (Avcı ve diğ., 2014). Balık çiftliklerinde zayıf sanitasyon koşullarından kaynaklanan kötü su kalitesi ve stres koşulları hastalığın gelişimini etkilemektedir. Su kalitesi düşük olduğunda hastalık daha belirgin hale gelmektedir. Oksijen eksikliği bakterinin virülensini ve yayılmasını arttırmaktadır. Ayrıca amonyum konsantrasyonunun yüksek olması da ölüm oranının artmasına neden olmaktadır. Hastalığın inkübasyon periyodu çok kısadır ve ölüm oranının yüksek olması (%50'nin üzeri) nedeniyle ciddi ekonomik kayıplara yol açtığı rapor edilmektedir (Vendrell ve diğ., 2006).

L. garvieae ineklerde subklinik meme enfeksiyonlarından, su bufalolarında subklinik mastitislerden, çiğ inek sütünden, kedi ve köpek bademcik iltihaplarından da identifiye edilmiştir (Pot ve diğ., 1996). Bu bakteri nadiren de olsa insanlarda düşük virülenste görülen bir patojendir. Birkaç vakada insanlardan izole edildiği rapor edilmiştir. *L. garvieae* potansiyel bir zoonoz ajan olarak değerlendirilebilmektedir. Amerika'daki üriner kanal, kan, deri ve pnömonik süreçlerde ve Kanada'daki bakteriyel endokarditisli hastalardan identifiye edilmiştir. İleri bir tarihte Fransa'da bağışıklık sistemi baskılanmış bir hastadan da izole edilmiştir. Enfekte balıkların iç organlarının yem materyali olarak kullanılması ve yetersiz ısı işlem uygulaması sonucunda hastalık sağlıklı balıklara geçmektedir. Hastalık etkeni dondurulmuş balıkta 6 aya kadar kalabilmektedir. Bu mikroorganizmaların bazıları balık çiftliklerindeki çamur, sediment ve su ortamından izole edilmektedir. Hastalığın yayılması başlıca horizontal mekanizmayla gerçekleşmektedir. Aynı gölde yaşayan balıklar arasında hastalığın direkt yayılması oldukça önemlidir. *L. garvieae*'nin balıklarda neden olduğu enfeksiyon kaynağı yine de tam olarak tespit edilememiştir (Vendrell ve diğ., 2006).

2.2.5 Hastalığın Teşhisi

Lactococcosis'in teşhisinde bakteriyel teşhis metodları dışında diğer bakteriyel hastalıkların teşhisinde kullanılan hematolojik (Del Pozo, 2005; Avsever ve diğ., 2014), serolojik (Çağırğan ve diğ., 2004; Kang ve diğ., 2004; Del Pozo, 2005; Baeck ve diğ., 2006; Ürkü, 2011) ve moleküler (Zlotkin ve diğ., 1998; Chen ve diğ., 2002; Colorni ve diğ., 2003; Baeck ve diğ., 2006) teşhis yöntemleri kullanılmaktadır. Hastalığın

epidemiyolojik ve klinik olarak teşhisi lezyonların ve karakteristik semptomların gözlenmesine bağlıdır. Bir kıtaya ait su ürünleri yetiştirilen çiftliklerde benzer semptomlara neden olan bazı enfeksiyon proseslerini gözlemek mümkün olabilir. Bu yüzden etken bakteriyi tanımlamak için laboratuvar metodlarıyla teşhis her zaman önemlidir. Epidemiyolojik teşhis su kalitesinin düşmesi ve su sıcaklığının artması gibi hastalık olasılığını arttıran çevresel parametrelere bağlıdır. Lactococcosis genellikle %10-80 oranında ölümlere neden olabilen ve çok sayıda balığı etkileyebilen akut bir bakteriyel hastalıktır. Balıklarda klinik olarak letarji, anoreksia, melanozis, eratik yüzme, tek ya da çift taraflı ekzoftalmus, oküler ve perianal zonda ve yüzgeçlerde hemoraji (kanama) ve anal prolapsus gibi klinik semptomlar görülür (Kusuda ve diğ.,1991, Chen ve diğ., 2002, Kang ve diğ., 2004, Vendrell ve diğ., 2006, Avcı ve diğ., 2010, Tanrıkul ve Gültepe, 2011, Timur ve diğ., 2011, Didinen ve diğ., 2014).

2.2.5.1 Hematolojik Yöntemler

Hematoloji; kanın eritrosit, lökosit ve trombosit gibi kan hücrelerinin yapısını ve kan bozukluklarını inceleyen bir bilim dalıdır. Genellikle hematolojik çalışmalarda kan frotilerinin incelenmesi yanı sıra eritrosit ve lökosit sayılarının tespiti, hemoglobin miktarı, hematokrit değeri tespiti, serum elektroforozesi ve diğer biyokimyasal analizler yapılmaktadır. Balıkların kan parametreleri su kalitesi ve enfeksiyöz hastalıklar olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir (Roberts, 1978; Altun ve diğ., 1999).

Balıkların hematolojik parametreleri balık yetiştiriciliğinde balıkların fiziksel durumlarının belirlenmesinde, stres ve hastalıkların kontrolünde her geçen gün daha yaygın olarak kullanılan indikatörlerdir. Balıklarda hematolojik parametreler çevre şartlarındaki değişikliklere kısa sürede cevap verdiği için dolaylı toksikolojik çalışmalarda yaygınlaşarak faydalanılmaktadır. Bu parametreler organizmanın klinik statüsü hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Roberts, 1978; Atamanalp ve diğ., 2003; Del Pozo, 2005). Eritrosit-sedimentasyon oranındaki (ESO) artış veya azalış balıkta fizyolojik bir fonksiyon bozukluğu olduğunu gösterir (Jagtap ve Mali, 2012). ESO kırmızı kan hücreleri sayısının varyasyonları ile ilişkilidir (Jagtap ve Mali, 2012). Del Pozo (2005) çalışmasında *L. garvieae* ile enfekte hasta gökkuşuğu alabalıklarında eritroblast sayısının arttığını, bazı bireylerde eritrositlerin şiddetli bir şekilde azaldığını gözlemlerken bu durumun solungaçların rengindeki solgunlukla ilişkili olduğunu

belirtmiştir. Aynı araştırmacı incelediği bazı enfekte alabalıkların kandan hazırlanan yayma preparatlarında da Gram-pozitif streptokokların olduğunu ortaya çıkararak bu bakterilerin çok sayıda diplokokokki şeklinde çok kısa zincir formunda olduğunu ve eritrositlerin yüzeylerine tutunma eğiliminde olduğunu rapor etmiştir. Yurdumuzda ise Avsever ve diğ. (2014) *L. garvieae* ile ilgili yaptıkları çalışmalarında enfekte balık gruplarında kontrol balık gruplarına göre kan parametlerinin (beyaz ve kırmızı kan hücreleri) daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir.

Tablo 2.3: Bazı tatlısu ve acısu balıklarındaki lökosit sayıları (Bullis, 1993).

Türler	Toplam BKH* Sayısı (x10 ³)	Lenfositler (%)	Monositler (%)	Eozinofiller (%)	Bazofiller (%)
<i>Anguilla rostrata</i>	-	38	0	46	0
<i>Esox vermiculatus</i>	-	81	2	9	4
<i>Esox lucius</i>	1,12	-	-	-	-
<i>Lagodon rhomboides</i>	-	59	2	21	2
<i>Sciaenops ocellatus</i>	-	40	2	40	10
<i>Cynoscion arenairus</i>	-	63	0	23	4
<i>Cynoscion nebulosus</i>	-	65	2	12	6
<i>Mullus barbatus</i>	-	76	0	4	6
<i>Mugil curema</i>	-	75	0	19	0

*Beyaz kan hücreleri

Tablo 2.4: Farklı deniz balıklarında hematokrit ve hemoglobin değerleri (Larson, 1976).

Türler	Hematokrit (%)	Hemoglobin (gr/100 ml)
<i>Cyclastomi</i>		
<i>Myxine glutinosa</i>	19.1	4.1
<i>Holocephali</i>		
<i>Chimaera monstrosa</i>	15.7	2.7
<i>Elasmobranchii</i>		
<i>Squalus acanthias</i>	15.3	2.9
<i>Raja radiata</i>	16.7	3.8
<i>Etmopterus spinax</i>	18.9	3.0
<i>Raja batis</i>	19.0	2.9
<i>Teleostei</i>		
<i>Cyclopterus lumpus</i>	19.3	3.3
<i>Merluccius merluccius</i>	24.1	5.2
<i>Microstomus kitt</i>	30.2	5.2
<i>Gadus morhua</i>	32.0	7.4
<i>Pleuronectes platessa</i>	33.3	5.1
<i>Gadus merlangus</i>	41.2	6.6
<i>Trachurus trachurus</i>	49.9	12.5
<i>Clupea harengus</i>	51.3	14.0
<i>Scomber scombrus</i>	52.5	12.7

2.2.5.2 Serolojik Yöntemler

Seroloji; serum bilimi olarak da isimlendirilmekte ve tıpta belirli bir mikroorganizmaya (virüs, bakteri, parazit), yabancı proteinlere (hatalı kan transfüzyonu) veya vücudun kendi proteinlerine (oto-immun hastalıklar) karşı üretilmiş antikorların varlığını veya spesifik antijen proteinlerinin varlığını saptayan bir metodoloji bilimi olarak tanımlanır. Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde antijen-antikor reaksiyonlarına dayalı çeşitli serolojik yöntemler uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. 1960'lı yıllardan bu yana kullanılan çeşitli aglütinasyon tipleri ve ELISA gibi serolojik yöntemler balık patojenlerinin teşhisinde, balık serumlarında spesifik patojenlere karşı oluşan antikorların tayininde, aşılarda geliştirilmesinde ve serotiplendirme çalışmalarında tercih edilmektedir (Toranzo ve diğ., 1987; Del Pozo, 2005). Aglütinasyon testleri lam aglütinasyon, tüp aglütinasyon, mikro-well aglütinasyon ve presipitasyon jel difüzyon testi olmak üzere 4

çeşittir. Lam aglütinasyon testi birçok bakteride olduğu gibi *L. garvieae* ile ilgili yapılan serolojik çalışmalarda da kullanılmıştır. Çağırğan (2004) yurdumuzdaki hasta gökkuşağı alabalıklarından izole edilen bu bakteriye ait izolatların lam aglütinasyon tekniği ile kapsül oluşumunu araştırmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda izolatların homojen bir yapı gösterdiğini ve İspanya'daki izolatlarla yüksek oranda benzerlik gösterdiği için biyotip 3 olduğunu bildirmiştir. Del Pozo (2005) ve Ürkü (2011) çalışmalarında yine aynı tür balıkta *L. garvieae*'nin teşhisinde bu aglütinasyon çeşidini kullanırken deniz balığı türlerinden olan siyah kaya balığı (Kang ve diğ., 2004) ve dere pisisi (Baeck ve diğ., 2006) ile ilgili yapılan çalışmalarda da bu yöntem tercih edilmiştir. Kubilay ve diğ. (2008) ise mikro-well aglütinasyon testini kullanarak hasta alabalıkların serumlarında bu bakteriye karşı oluşan antikor titresini belirlemişlerdir. Aglütinasyon tekniklerinden daha duyarlı bir yöntem olan ELISA, antijen-antikor reaksiyonunun tespit edilerek ölçülmesi esasına dayanan çok hassas ve zaman almayan diğer bir serolojik methodur. Günümüzde bakteriyel enfeksiyonların teşhisinde kullanılan ELISA tekniği balık hastalıklarının teşhisinde, hastalık etkenlerinin serotiplendirilmesinde ve aşılama çalışmalarında oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Shelby ve diğ. (2002a) *Streptococcus iniae*'yi tilapya balıklarına intraperitoneal olarak enjekte ederek pasif immünizasyon oluşturmaya çalışmış ve serumda etkene karşı oluşan antikor seviyesini ELISA tekniğini kullanarak tespit etmişlerdir. Shelby ve diğ. (2002b) ise yaptıkları farklı araştırmalarda levrek ve tilapya balıklarında adı geçen bakteriye karşı oluşan humoral yanıtın gelişimini belirlemek için ELISA ve aglütinasyon yöntemlerini tercih etmişlerdir. Del Pozo (2005) ve Ürkü (2011) ise enfekte alabalıklarda *L. garvieae*'ye karşı serumda oluşan spesifik antikorların varlığını tespit etmek için bu tekniği kullanmışlardır.

2.2.5.3 Moleküler Yöntemler

L. garvieae'nin identifikasyonunu doğrulamak amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniğisıklıkla kullanılmaktadır (Aoki ve diğ., 2000; Ravelo ve diğ., 2003; Colorni ve diğ., 2003; Savvidis ve diğ., 2007; Didinen ve diğ., 2014). Zlotkin ve diğ. (1998) spesifik primerlere (pLG-1: 5'-CATAACAATGAGAATCGC-3', pLG-1: 5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3') dayalı PZR tekniğini farklı *L. garvieae* izolatlarının identifikasyonunda kullanmışlardır. Enfekte balıklardan elde edilen 1 µl plazma

kullanılan bu çalışmada 35 adet *L. garvieae* suşunun 1,100 bp amplifikasyon ürünü verdiği bildirilmiştir.

Chen ve diğ. (2002) 1999 ile 2000 yılları arasında Tayvan'daki kefal (*Mugil cephalus*) çiftliklerinde hastalık çıkışına bağlı yüksek oranda ölümlerin görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu çalışmalarıyla bu hastalığa neden patojenin epidemiyolojik, patolojik, histopatolojik ve mikrobiyolojik incelemelerinin yanısıra moleküler açıdan da araştırmasını yapmışlardır. Bu amaçla çiftliklerden temin edilen enfekte balıklardan elde edilen saflaştırılmış bakterilerden elde ettikleri DNA örnekleri ile PZR tekniğini kullanarak bakterinin konfirmasyonunu sağlamışlardır. Bu araştırmacılar tarafından seçilen primerlerle (pLG-1 ve pLG-2, SA1B10-1-F ve SSA1B10-1-R) yapılan çalışma sonunda 14 adet *L. garvieae* suşundan 1,100 ile 709 bp amplifikasyon bandı elde edilmiştir.

Colorni ve diğ. (2003) enfekte kızıl deniz lapininde (*Coris aygula*) yaptıkları bu çalışmada hasta balıklardan elde edilen bakterinin konfirmasyonunda PZR metodunu kullanmışlardır. pLG-1: 5'-CATAACAATGAGAATCGC-3' ve pLG-2: 5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3' primerlerinin kullanıldığı metodun sonunda hem İsrail izolatu hem de pozitif kontrolde 1,100 bp ampfilikasyon ürünü elde ederken negatif kontrolde herhangi bir ürün elde etmemişlerdir.

Baeck ve diğ. (2006) hasta dil balıklarından (*Paralichthys olivaceus*) aldıkları örnekler sonucunda 22 adet bakteri izole etmişler, bakterilerin identifikasyonuna yönelik çalışmalar ile 3 adet bakterinin *Streptococcus parauberis* 18 adet bakterinin de *L. garvieae* olduğunu tespit etmişlerdir. Bu bakterilerin doğruluğunu belirlemek amacıyla PZR metodunu kullanan araştırmacılar *Streptococcus parauberis*' ten 700 bp, *L. garvieae*' den ise 1,100 bp amplifikasyon ürünü elde etmişlerdir.

Vendrell ve diğ., (2007) gökkuşağı alabalıkları üzerinde *L. garvieae* karşı geliştirilmiş bir inaktive aşının etkisi ve güvenilirliğini belirlemek amacıyla yapmış oldukları deneysel çalışmada aşılınmamış gruptan elde ettikleri *L. garvieae*'nin konfirmasyonunu yapmışlardır.

2.2.6 Hastalığın Kontrolü ve Tedavisi

Colorni ve diğ. (2003) *L. garvieae* ile doğal olarak enfekte kızıl lapin balıklarında etken bakterinin Clindamycin'e karşı antimikrobiyal duyarlılığı olduğunu belirlemişlerdir. Baeck ve diğ., (2006) enfekte dil balıklarından izole ettikleri *L. garvieae* bakterisinin antibiyotiklere karşı duyarlılığını saptamak amacıyla yapmış oldukları antibiyogram çalışması sonucu izolatlarının trimethoprim, nitrofurantoin ve sulfamethoxazole/trimethoprim antibiyotiklerine karşı duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir.

Yurdumuzdaki araştırmacılar Kubilay ve diğ. (2005) 9 farklı *L. garvieae* suşlarının Mueller-Hinton agarda disk diffüzyon tekniği ile ATB VET (Biomerieux 14 289) strip sistemi kullanılarak antimikrobiyal duyarlılıklarının yanı sıra Epsilometre testi ile de Eritromycin antibiyotiğinin MİK (Minimal inhibitör konsantrasyonu) değerleri incelediklerinde bakterinin disk diffüzyon testi ve ATB VET sistemine göre Amoxicillin+clavulanic acid, Ampicillin, Enrofloxacin, Vancomycin, Tetracycline, Doxycycline, Chloramphenicol, Erytromycine, Nitrofurantoin, Cephalotin, Amoxicillin, Cefoperazon, Spectinomycin, Pristinamycin, Cotrimoxazol, antibiyotiklerine duyarlı olduğu ancak Kanamycin, Cefuroxime, Lincomycin, Penicillin, Ofloxacin, Norfloxacin, Ciprofloxacin Ceftriaxone, Clindamycine, Vancomycin, Oxacillin, Streptomycin, Trimethoprim+Sulfamethoxazole, Gentamicin, Apramycin, Tylosin, Colistin, Sulfamethizol, Flumequin ve Oxolinic asit gibi antibiyotiklere karşı dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. *L. garvieae* suşlarında eritromisin antibiyotiğinin MİK değerleri 0,032-0,125 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu değerlere göre; suşların en çok eritromisine duyarlı olduğu görülmüştür.

L. garvieae' ye karşı aşı üretimi ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında Ravelo ve diğ. (2003) sucul bakterilerin aksine farklı adjuvant içeren bu bakteriye karşı ticari olarak satın aldıkları Montanide-ISA-763-A ve Aquamun adlı aşılardan etkisini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda aşılardan 3 ay sonra Aquamun adlı aşı ile aşılardan gökkuşuğu alabalıklarının hayatta kalma oranının (RPS) %40'tan %92' ye çıktığını rapor etmişlerdir. Vendrell ve diğ. (2007) alabalıklar üzerinde yaptıkları çalışmada *L. garvieae* bakterisine karşı geliştirdikleri inaktive aşının etkisini ve güvenilirliğini incelemişlerdir. Deneysel olarak yürüttükleri bu çalışmada iki farklı deney grubu yanı sıra bir adet kontrol grubu

oluşturmuşlardır. Birinci deneme grubundaki balıklara aşının 0.2 ml'lik dozu intraperitoneal yolla verilmiş ve aşılardan 50 gün sonra hem kontrol hem de deney grubundaki balıkların hayatta kalma oranının %100 olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer deneme grubundaki balıklara aşının 0.1 ml'lik dozu verilirken kontrol grubuna 0.1 ml hacminde PBS (Phosphate Buffer Saline) intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Aşılardan 29 gün sonra bu gruptaki balıklara 0.1 ml hacminde ve 3×10^6 CFU ml⁻¹ hücre yoğunluğuna sahip *L. garvieae* bakterisi enjekte edilmiştir. Toplam 50 gün süren deneysel çalışma sonucunda ikinci deneme grubundaki balıkların hayatta kalma oranı % 94 iken kontrol grubunda ise bu oranın % 4 gibi düşük bir değer gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında Kubilay ve diğ. (2008) alabalıklar üzerinde *L. garvieae*' ye karşı ürettiği aşının 5 farklı kombinasyonunun etkisini araştırmışlardır. Çalışmada formalinle inaktive edilmiş aşı, Freud's adjuvantlı aşı, β -glukanlı aşı, yalnızca β -glukan ve PBS verilen kontrol grubu olmak üzere farklı aşı grupları oluşturmuşlardır. Deney balıklarında aşının etkisini 30., 75. ve 125. gün sonunda formalinle inaktive edilmiş aşının verildiği gruptaki balıklarda hayatta kalma oranı % 55-89 iken Freud's adjuvantını içeren aşı ile aşılanan balıklarda bu oranın % 85-100 olduğunu belirtmişlerdir. Altun ve diğ. (2010) de gökkuşuğu alabalıkları üzerinde sodium aljinat (SA) ve poli laktid-ko-glikolid (PLGA) polimerlerini içeren aşının etkisini intraperitoneal ve oral yöntem kullanarak incelemişlerdir. Oral yolla uygulanan ve sodium aljinat içeren aşı ile aşılanan balıklarda 61. günün sonunda hayatta kalma oranının %80'e ulaştığını gözlemlemişlerdir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 DENEMEDE KULLANILAN LEVREK BALIKLARININ TEMİNİ VE ADAPTASYONU

Yürütülen bu deneysel enfeksiyon çalışmasında kullanılan ortalama ağırlığı 50-70 gram olan 185 adet kültür levrek balığı Ege Bölgesi' ndeki özel bir işletmeye ait çiftlikten temin edilmiştir. Denemenin ilk aşamasında gerçekleştirilen ve LD₅₀ dozunu belirlemek için kullanılan, her birine 5 adet balık örneği konulan 6 adet akvaryumun hacmi yaklaşık 80 litre iken deneysel enfeksiyon çalışmasının yürütüldüğü 3 adet fiberglas tankın büyüklüğü daha yüksek (300 lt) tutulmuştur. Bu fiberglas tankların 1 adet kontrol ve 2 adet deneme tankı olarak ayarlanırken herbir tank içine 50' şer adet balık örneği yerleştirilmiştir. Tanklardaki suya hava motoru ile devamlı olarak oksijen verilmiş ve suyun sıcaklığı 18-20 °C' ye ayarlanmıştır. Deneme boyunca kullanılan suyun çözünmüş oksijen, sıcaklık, tuzluluk ve pH değerleride takip edilmiştir. Deney balıkları yaklaşık 50 gün süren çalışma süresince pelet yem ile beslenmiştir.

Balıklar 1 ay süreyle adaptasyona tabi tutulmuştur. Bu süreç sonunda rastgele seçilen levrek balıklarına herhangi bir patojen taşıyıp taşımadıklarını belirlemek amacıyla bakteriyolojik ve parazitolojik muayene yapılmıştır. Rastgele seçilen 2 adet balığın otopsileri yapılarak karaciğer, böbrek ve dalak gibi iç organlarından % 1,5 NaCl içeren TSA ve BHIA besiyerlerine bakteriyolojik ekimler yapılmıştır. Paraziter muayene için eksternal olarak balığın solungaç ve derisinden hazırlanan preparatlar ile internal olarak iç organlarından yaş preparat örnekleri hazırlanmış ve bu örnekler ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

3.2 IN-VIVO KOŞULLARDA ENFEKSİYONUN OLUŞTURULMASI

Bu tez çalışmasında bir adet yerli *L. garvieae* izolatu yanısıra bir adet yurt dışından temin edilen referans bakteri (ATCC-43921) suşları kullanılmıştır. Adı geçen bu iki bakteri Süleyman Demirel Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi'nde öğretim üyesi olarak görev yapmakta olan Prof. Dr. Öznur Diler tarafından hediye edilmiştir.

Liyofilize olarak temin edilen bu bakteriler (yerli ve referans bakteri) TSA besiyerine ekildikten sonra canlandırılması gerçekleştirilmiştir. Üretilen *L. garvieae* suşları Todd-Hewitt içeren tüplere ekilerek 24-25°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 4500 rpm' de 15 dakika santrifüj edilerek iki kez PBS ile yıkandıktan sonra sulandırılmıştır. Bakteri yoğunluğunu belirlemek için PBS içine ilave edilen bakteri solüsyonundan 100 µl alınarak sterilmikroplağın bir kuyucuğuna koyulmuştur. Kuyucukta yer alan bakterinin yoğunluğu spektrofotometrede 540 nm' de 1.0 olacak şekilde 10^9 hücre/ml optik yoğunluğa ayarlanmıştır (Kang ve diğ., 2004). Ardından hazırlanan inokulum bu çalışmada kullanılacak enfeksiyon dozları olan 10^6 , 10^7 ve 10^8 hücre/ml yoğunlukta elde etmek için PBS ile sulandırılmıştır. 2- fenoksietanol (0.5 ppm) ile anesteziye tabi tutulmuş 5'er adet levrek balığına hazırlanmış olan bu farklı yoğunluktaki bakteri inokulumları intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve bakterinin LD₅₀ dozu belirlenmiştir. Daha sonra bakterinin uygun olan bu LD₅₀ dozu 0.1 ml hacimde deneme grubundaki balıklara intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir (Kang ve diğ., 2004). Kontrol grubundaki 50 adet balığa ise aynı hacimde steril PBS enjekte edilmiştir. Bu işlemin ardından deney balıklarında hastalığın seyri incelenmiş ve enfekte balıkların klinik durumları yanı sıra günlük ölüm oranları da kayıt altına alınmıştır.

3.3 ENFEKTE BALIKLARDAN PATOJEN BAKTERİNİN YENİDEN İZOLASYONU

Enfekte balıklardaki eksternal değişiklikler gözlemlenerek, ölmek üzere olan veya yeni ölmüş balıkların otopsileri yapılarak internal olarak *L. garvieae*' nin balıklarda neden olduğu otopsi bulguları not edilmiştir. Deneysel enfeksiyon süresince hastalığın klinik belirtilerini gösteren levrek balıklarının iç organlarından (karaciğer, böbrek, dalak ve kalp gibi) TSA ve BHIA gibi besiyerlerine yapılan ekim sonucu üreyen bakteri rutin biyokimyasal yöntemler (Del Pozo, 2005; Austin ve Austin, 2012) yanı sıra hızlı tanı kiti

olan API 20 STREP ve API ZYM kullanılarak identifiye edilerek bakterinin rezolasyonu yapılmıştır.

3.4 ENFEKTE BALIKLARDAN KAN VE SERUM ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ

Deneysel olarak enfekte edilen kültür levreklerinde *L. garvieae*'ye karşı oluşan spesifik antikorların varlığının araştırılmasında kullanılan hematolojik ve serolojik testler Fakültemizdeki Hastalıklar Anabilim Dalı' na ait olan Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Serolojik tekniklerden olan aglütinasyon ve ELISA testlerinde kullanılmak üzere 2-fenoksietanol ile bayıltılan enfekte ve kontrol grubundaki balıkların kaudal venasından steril enjektör yardımıyla 2 ml hacimde kan örnekleri alınmıştır. Hematolojik çalışmalar için alınan kan örnekleri ile ilgili çalışmalara aynı gün içinde başlanırken serolojik çalışmalar için alınan kan örnekleri bir gece 4 °C' de bekletilmiş ve ertesi gün 2500 devirde 20 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan serum kısmı kullanılmıştır. Serolojik testler için gerekli miktarda serum örneği kullanıldıktan sonra geriye kalan örnekler proje desteğiyle temin edilen liyofilizatör cihazı ile liyofilize edilerek saklanmıştır.

3.5 HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Histopatolojik incelemede kullanılmak üzere enfekte balıkların karaciğer, böbrek, kalp ve dalak gibi iç organlarından alınan doku örnekleri %10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edilmiştir. Tespit edilen doku örnekleri Fakültemiz'deki Hastalıklar Anabilim Dalı'na ait olan Histoloji Laboratuvarı'nda rutin olarak kullanmış olduğumuz doku işleme basamaklarından geçirildikten sonra parafin bloklara gömülmüş ve bu doku bloklarından mikrotom yardımı ile 4-5 µm kalınlığında histolojik kesitler alınmış ve preparatlar Hematoksilen-Eosin boyama yöntemiyle boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında x10, x20, x40 ve x100 büyütmede incelenmiştir (Roberts, 2012).

3.6 HEMATOLOJİK İNCELEME

Bu tez çalışmasında *L. garvieae* ile enfekte edilen deney balıklarının kanlarında oluşan değişiklikler farklı hematolojik yöntemler kullanılarak kapsamlı olarak incelenmiştir. Bu amaçla kandaki eritrosit ve lökosit hücrelerinin sayımı, yayma preparatı hazırlanması, hematokrit tayini, koagülasyon süresinin belirlenmesi ve sedimentasyon hızının tespiti gibi farklı hematolojik parametrelere bakılmıştır. Hematolojik çalışmalar için kullanılacak olan sağlıklı ve enfekte edilen balıklara ait kan örnekleri heparinli tüplere alınmıştır.

3.6.1 Kan Hücrelerinin Sayımı

Eritrosit sayımı için kan eritrosit pipetinin 0.5 işaretine kadar çekilmiştir. Pipetin ucu temiz bir bezle silindikten sonra Young solüsyonu 101 işaretine kadar çekilmiş ve böylece eritrosit pipetinde kan 1:200 oranında sulandırılmıştır. Eritrosit pipetindeki kan sıvısı Thoma lamının kanalına verilerek sayma işlemi gerçekleştirilmiştir. Lökosit hücresi sayımı için lökosit pipetinde kan 1.0 işaretine kadar çekilmiştir. Pipetin ucu silinerek Turk solüsyonu 11 işaretine kadar çekilmiştir. Daha sonra pipetin lastik emici tüpü çıkartılarak baş ve işaret parmakları arasında tutulan pipet sallanarak içeriği 30 saniye karıştırılmış ve sıvı pipetin ucundan serbest bırakılarak hemocytometer kanalına akması sağlanmıştır (Blaxhall ve Daisley, 1973). Bu sayede kan 1:9 oranında sulanmıştır. Bundan sonra ışık mikroskopunda 10 µm, 20 µm, 40 µm ve 100 µm büyütmede görülen kan hücrelerinin sayımı yapılmış ve kan parametrelerindeki değişimler değerlendirilmiştir (Bullock, 1989).

3.6.2 Froti Hazırlanması

Yayma preparatı hazırlamak için bir damla kan örneği lam üzerine damlatılmış ve bir lamel yardımı ile yayılarak çok ince bir film tabakası oluşturulmuştur. Preparat havada kurutulup metanol ile tespit edildikten sonra May Grunwald-Giemsa metodu ile boyanarak lamelle kapatılmıştır. Işık mikroskobu altında (x10 büyütmede) kan hücrelerinin morfolojileri yanı sıra hastalığa bağlı oluşan değişiklikler de incelenmiştir (Theml ve diğ., 2004).

3.6.3 Hematokrit Tayini

Hematokrit tayininde mikrohematokrit metodu uygulanmıştır (Blaxhall ve Daisley, 1973). Deneme ve kontrol grubundaki henüz ölmüş ve ölmek üzere olan balıkların kaudal vena ve kalplerinden alınan kan örnekleri (0,1-0,8 ml' lik hacimde) heparinli tüplere alınmıştır. Kan mikrohematokrit tüplerine alındıktan sonra tüpün bir ucu cam macunu ile kapatılmıştır. Hematokrit santrifüj cihazına yerleştirilen kapillar tüpler 10,500 devirde 5 dakika santrifüj edilmiş ve hematokrit skalası üzerindeki değerler okunarak toplam kanın %' si hematokrit değeri olarak kaydedilmiştir.

3.6.4 Sedimentasyon Hızının Tespiti

Sedimentasyon hızının saptanmasında ise Mikro-Wintrobe yöntemi uygulanmıştır (Blaxhall ve Daisley, 1973). Bu amaçla mikrohematokrit tüpüne 50 mm oranında çekilen antikoagüle kan, 1 saat dikey pozisyonda tutulmuş ve bu sürenin sonunda plazmadan ayrılan kan hücrelerinin üzerinde bulunan kan serumunun yüksekliği mm cinsinden ölçülmüştür.

3.6.5 Koagülasyon Süresinin Belirlenmesi

Enfekte balıklardan alınan kanın koagülasyon süresini belirlemek amacıyla lam koagülasyon metodu kullanılmıştır (Ciesla, 2011). Bu yöntemde temiz bir lam üzerine bir damla kan damlatılmış ve 30 saniyelik aralıklarla kan örneği temiz bir iğne ile karıştırılmıştır. İğne ile karıştırma esnasında fibrillerin gözle görülür hale gelip pıhtının tamamen oluştuğu süre kaydedilmiştir.

3.7 SEROLOJİK İNCELEME

Tez kapsamında enfekte balıkların serum örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen serolojik yöntemlerden olan lam aglütinasyon, mikro-well aglütinasyon ve ELISA testlerinde kullanılmak üzere yurtdışındaki ticari bir firmadan liyofilize olarak satılan “Anti-European sea bass (*D. labrax*) IgM Mab” temin edilmiştir.

Serolojik çalışma için kullanılacak olan bakterilerden öncelikle iki farklı şekilde somatik O-antijeni hazırlanmıştır. Bu amaçla %1,5 NaCl içeren BHIA besiyerinde 24 °C' de 24-48 saat inkübe edilen *L. garvieae* suşları 2 ml PBS içersinde toplanmış, 2 defa 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 lam aglütinasyon testinde ve mikro-well aglütinasyon testlerinde “O” somatik antijeni olarak kullanılmıştır (Toranzo ve diğ, 1987; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007). Ayrıca her iki bakteri için optik yoğunluğu 540 nm' de 1 olarak hazırlanmış olan diğer bir antijen grubu sonikatör yardımı ile 3 defa 30 saniye tutmak suretiyle parçalanmış ve ELISA tesitinde antijen olarak kullanılmıştır (MacPhee ve diğ., 1995).

3.7.1 Lam Aglütinasyon Testi

Hazırlanan “O” somatik antijeni lam aglütinasyon testinde test antijeni olarak kullanılmıştır. Test antijenleri ve elde edilen antiserum eşit hacimlerde temiz bir lam üzerine damlatılarak test sonuçları 2-3 dakika içerisinde değerlendirilmiştir (Toranzo ve diğ., 1987).

3.7.2 Mikro-well Aglütinasyon Testi

Mikro-well aglütinasyon testi için “O” antijeni ile kaplanan 96 kuyucuklu mikropiğin her bir kuyucuğuna enfekte balıklardan elde edilen ve farklı dilüsyonları hazırlanan serum örneklerinden 100' er µl' lik hacimde ilave edilmiştir. Plak iki saat 37 °C' de bekletildikten sonra 4 °C' de tüm gece boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Bu süre sonunda çukurların tabanında bulanık kenarlı çökeltilerin gözlenmesi pozitif aglütinasyonu gösterirken, keskin kenarlı çökeltilerin gözlenmesi ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Kubilay ve diğ., 2008).

Kontrol ve deney grubundaki balıklardan farklı haftalarda alınan kanlardaki serumlar 1. haftadan sonra incelenmeye başlanmıştır. A, B, C ve D satırlarında antijen olarak referans bakteri gömülmüştür. İkinci basamakta yer alan serumlar 1. sütundan itibaren 1/10 dilüsyon oranında başlatılmış olup çift katlı dilüsyonlar yapılarak devam edilmiştir. E satırı kontrol grubu balığın kanını içermektedir. F ve G satırında antijen olarak yerli *L. garvieae* bakteri yer almaktadır. Bu grupta da serum dilüsyonları 1/10 oranında başlayarak çift katlı olarak devam etmiştir.

3.7.3 Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Bu çalışmadaki enfekte levrek balıklarının *L. garvieae* antijenlerine karşı serumlarında oluşan antikor seviyesinin belirlenebilmesi için ELISA tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle sonikatör yardımı ile elde edilen test antijenleri ELISA plağının kuyucuklarına otomatik pipetle 100 µl konularak 1 gece 4 °C'de bekletilmiş ve daha sonra farklı yoğunlukları hazırlanan enfekte balıklara ait serum örnekleri 100 µl'lik hacimde antijenle kaplanan kuyucuklara ilave edilmiştir. Ardından ticari olarak yurt dışından temin edilen anti-sea bass Mab 100 µl hacimde ilave edilip 22 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında ticari olarak yine bir firmadan satın alınan anti-mouse IgG peroksidaz konjugatı herbir kuyucuğa 100'er µl ilave edilmiş ve plak 22 °C de 1 saatlik bekleme süresine tabi tutulmuştur. Bu sürenin ardından her bir kuyucuğa konjugata uygun o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) substratı ilave edilmiş ve reaksiyon H₂SO₄ ile durdurulmuştur (Del Pozo, 2005). Kuyucuklara ait optik yoğunluk değerleri Bio-tek Instruments marka spektrofotometre kullanılarak 450_{nm}'de okunmuştur (Eynigor ve diğ., 2004; Pasnik ve diğ., 2006).

Hasta balıkların serumlarındaki antikorların varlığını göstermek için gerçekleştirilen ELISA testi için iki farklı antijenle (yerli ve referans *L. garvieae* suşları) kaplı plağın kuyucuklarına öncelikle farklı dilüsyondaki (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:500) serum örneklerinden 100' er µl hacimde eklendikten sonra gerekli yıkama basamakları yapılmıştır. Sonrasında levreğe karşı geliştirilmiş Mab ilavesinden sonra peroksidazla işaretli anti-fare Ig konjugatı kuyucuklara ilave edilmiştir. Sonuçlar spektrofotometrede 630_{nm}'de okunmuştur.

4. BULGULAR

4.1 DENEYSEL ENFEKSİYON İLE İLGİLİ BULGULAR

Bu çalışmada bir adet yerli *L. garvieae* suşu ve bir adet ATCC-43921 kodlu *L. garvieae* referans suşu ile gerçekleştirilen ve 4 hafta süren deneysel enfeksiyon çalışması için öncelikle bakterilerin LD₅₀ dozları belirlenmiş sonrasında deneysel enfeksiyonun oluşturulması ile ilgili çalışmalara başlanılmıştır. LD₅₀ dozunun belirlenmesi için bu bakterilerin üç farklı dozu (10⁶, 10⁷, 10⁸ hücre/ml) ile enfekte edilen levrek balıklarında ilk üç hafta sonunda gözlenen ölümler doğrultusunda her iki bakterinin de 10⁸ hücre/ml'lik uygulama dozunun deney balıklarında akut ölümlere sebep olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte diğer bakteri yoğunluklarına (10⁶, 10⁷) maruz bırakılan balıklarda ise ölümlerin daha yavaş olması nedeniyle hastalığın kronik bir seyir gösterdiği dikkati çekmiştir.

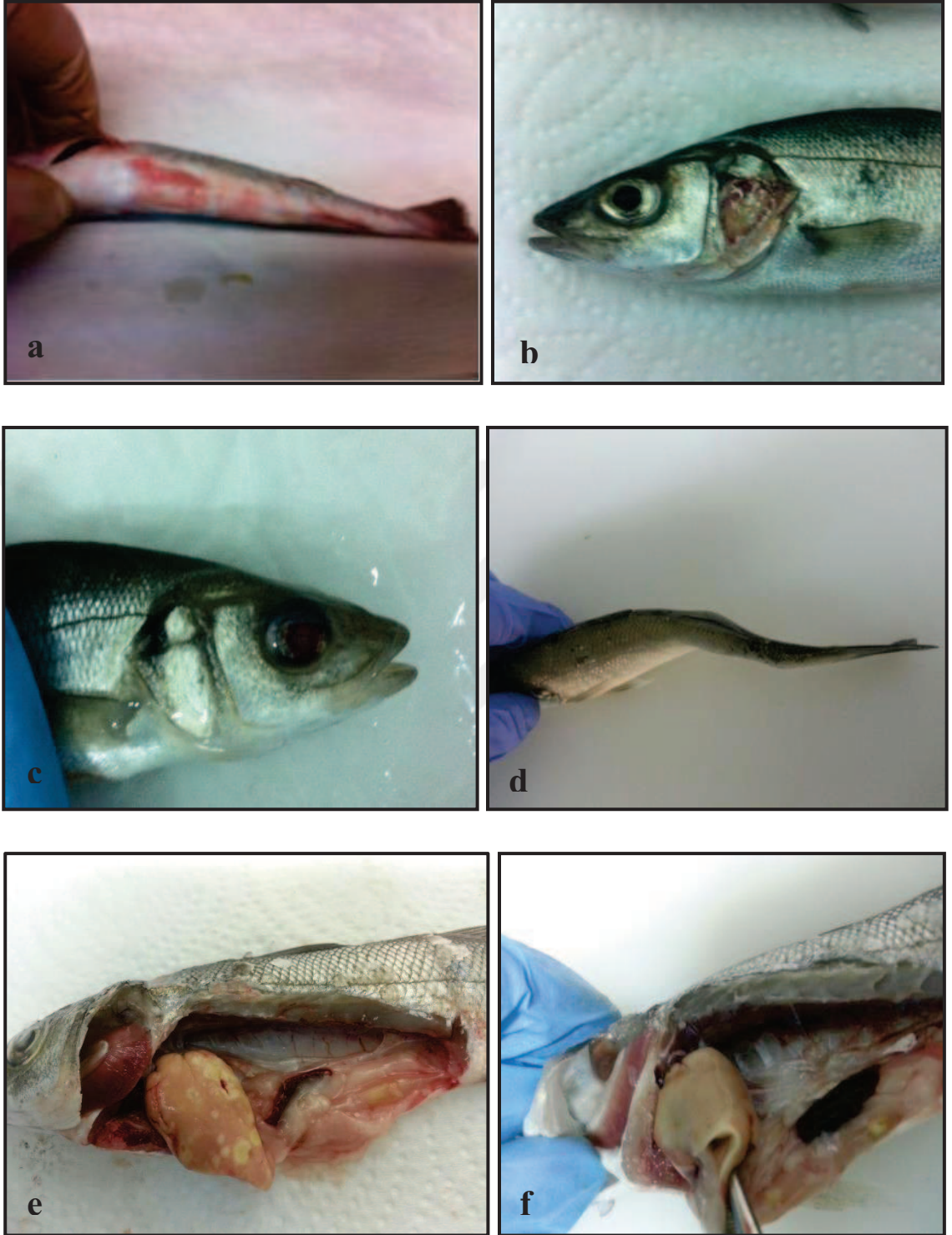
LD₅₀ dozunun belirlenmesinden sonra 2 farklı deney grubundaki 50'şer adet balığa yerli ve referans *L. garvieae* suşları intraperitoneal yolla enjekte edilirken kontrol grubundaki 50 adet balığa ise bakteri enjekte edilmemiştir. İntraperitoneal enjeksiyonunun 6. gününde yerli suş ile enfekte edilen levrek balıklarında (D1) yem alımında azalma ve hareketlerde yavaşlamayla birlikte ölümlerin de başladığı dikkati çekmiştir. Referans suş ile enfekte edilen balıklarda (D2) ise ölümler enfeksiyonun 8. gününde görülmeye başlamış ve her iki deney grubunda oluşturulan deneysel enfeksiyona bağlı olarak ölümler devam etmiştir. Çalışma sonunda referans *L. garvieae* suşu ile enfekte edilen deney grubunda toplam 8 adet balık hayatta kalırken, yerli *L. garvieae* suşu ile enfekte edilen deney grubunda ise toplam 4 adet balık hayatta kalmıştır. Kontrol grubundaki balıklarda ise 3 adet balıkta ölüm gözlenmiştir (Tablo 4.1; Şekil 4.1).

Tablo 4.1: Deneysel çalışmadaki balıklara ait günlük ölüm oranları (adet).

Balık Ölümleri (adet)			
Gün	K	D1	D2
Başlangıçta	50	50	50
6. gün	50	45	44
18. gün	50	29	30
26. gün	50	17	21
31. gün	49	11	16
36. gün	49	9	13
44. gün	48	6	9
48. gün	47	4	8

**Şekil 4.1:** Deneysel çalışmadaki balıklara ait günlük ölüm oranları (adet).

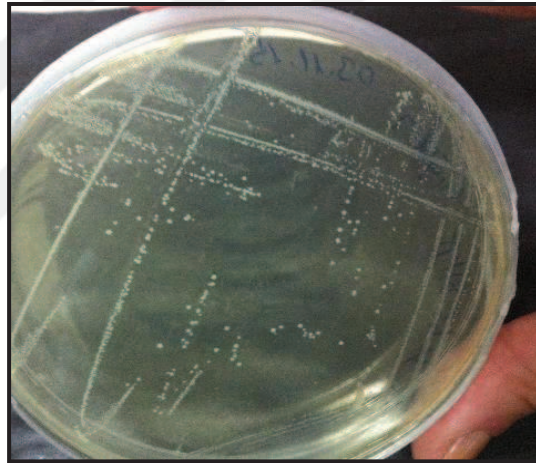
Deneysel çalışmanın ilerleyen günlerinde ölmek üzere olan balıklarda eksternal olarak karın bölgesi (Şekil 4.2a), operkulum (Şekil 4.2b) ve gözde (Şekil 4.2c) hemorajilerin oluştuğu, sırt bölgesinde deride koyulaşma yanısıra skolyoz gözlenmiştir (Şekil 4.2d). Otopsi yapılan her iki gruptaki balıklarda karaciğerde yağ dejenerasyonu, nodül benzeri yapılar ve hemoraji (Şekil 4.2e), splenomegali ve ön böbrekte erime (Şekil 4.2f) gibi klinik bulgular tespit edilmiştir.



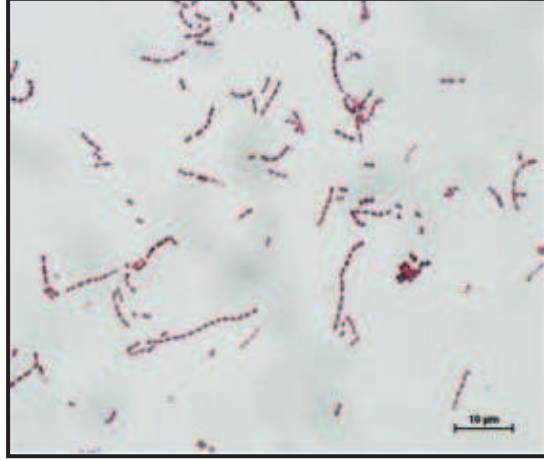
Şekil 4.2: Hasta balığa ait eksternal ve internal klinik bulgular. (a) karında hemoraji; (b) operkulumda hemoraji; (c) gözde hemoraji; (d) skolyozis; (e) karaciğerde yağlanma ve nodül benzeri yapılar; (f) splenomegali.

4.2 PATOJEN BAKTERİLERİN HASTA BALIKLARDAN YENİDEN İZOLASYONU

Deneysel enfeksiyonun oluşturulmasının ardından gelişen balık ölümlerinin başlaması ile birlikte enfekte balıkların karaciğer, böbrek ve dalak gibi iç organlarından % 1,5 NaCl içeren TSA ve BHIA besiyerlerine yapılan ekimler sonucunda üreyen bakteriler 1 mm çapında beyaz renkli yuvarlak koloniler meydana getirmiştir (Şekil 4.3). Bu çalışmada kullanılan ve enfekte edilen balıklardan yeniden izole edilen bakteri Gram-pozitif boyanma özelliği göstermesi, zincir oluşturması (Şekil 4.4), hareketsiz olması, sitokrom oksidaz testinde negatif reaksiyon vermesi ve % 5 koyun kanı içeren agarda alfa hemolitik aktivite göstermesi ve diğer biyokimyasal test sonuçlarına göre *L. garvieae* olarak izole ve tanımlanmıştır (Tablo 4.2).



Şekil 4.3: % 1,5 NaCl içeren BHIA besiyerinde *L. garvieae* kolonilerinin görünümü.



Şekil 4.4: Gram pozitif boyanma özelliği gösteren ve zincir oluşturan *L. garvieae*' ye ait bakteri hücrelerin görünümü (X1000).

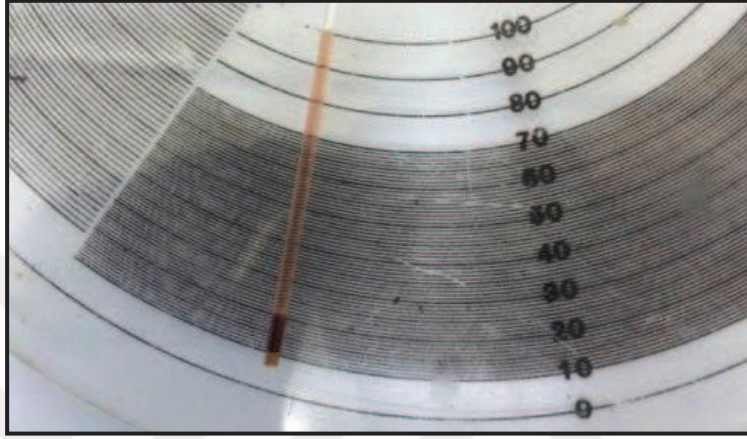
Tablo 4.2: Deney balıklarından yeniden izole edilen referans ve yerli *L.garvieae* suşlarının biyokimyasal özellikleri.

Biyokimyasal Özellikler	<i>L. garvieae</i> (ATCC 43921)	<i>L. garvieae</i> (Yerli izolat)	Biyokimyasal Özellikler	<i>L. garvieae</i> (ATCC 43921)	<i>L.garvieae</i> (Yerli izolat)
Koloni büyüklüğü	<1 mm	<1 mm	Asit Oluşumu		
Koloni morfolojisi	düzgün	düzgün	Sukroz	-	-
Pigment üretimi	-	-	Glukoz	+	+
Gram boyama	+	+	Fruktoz	+	+
Hareket	-	-	Galaktoz	+	+
O/F	F	F	Maltoz	+	+
Oksidaz	-	-	Sakkaroz	+	+
Katalaz	-	-	Arabinoz	-	-
VP	+	+	Riboz	+	-
Sitrat kullanımı	-	-	Mannitol	+	+
İndol üretimi	-	-	Sorbitol	-	-
Metil red	+	+	Laktoz	+	-
Nitrat üretimi	-	-	Trehaloz	+	+
O/129 (10 µg)	duyarlı	duyarlı	Rafinoz	-	-
H ₂ S	-	-	Hidroliz		
MacConkey agar	-	-	Arjinin	+	+
Bile eskulin agar	+	+	Ornitin	-	-
Nutrient agar	+	+	Lizin	-	-
Tryptictic soy agar	+	+	Eskulin	+	+
Brain heart infusion agar	+	+	Nişasta	-	-
Hemoliz	α	α	Jelatin	-	-
pH 9.6	+	+			
Büyüme					
%1 NaCl	+	+			
%2.5 NaCl	+	+			
%6.5 NaCl	+	+			
%8 NaCl	-	-			

(+):pozitif reaksiyon , (-): negatif reaksiyon, (F): fermentatif

4.3 HEMATOLOJİK BULGULAR

Bu çalışmada incelenen levrek balıklarına ait kan değerlerindeki hematokrit miktarının tespiti için mikrohematokrit tüplerine alınan kan örnekleri öncelikle santrifüj edilmiş ve incelenen bu örneklerdeki kan hücrelerinin toplam kan hacmine oranı hematokrit skalası kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5).

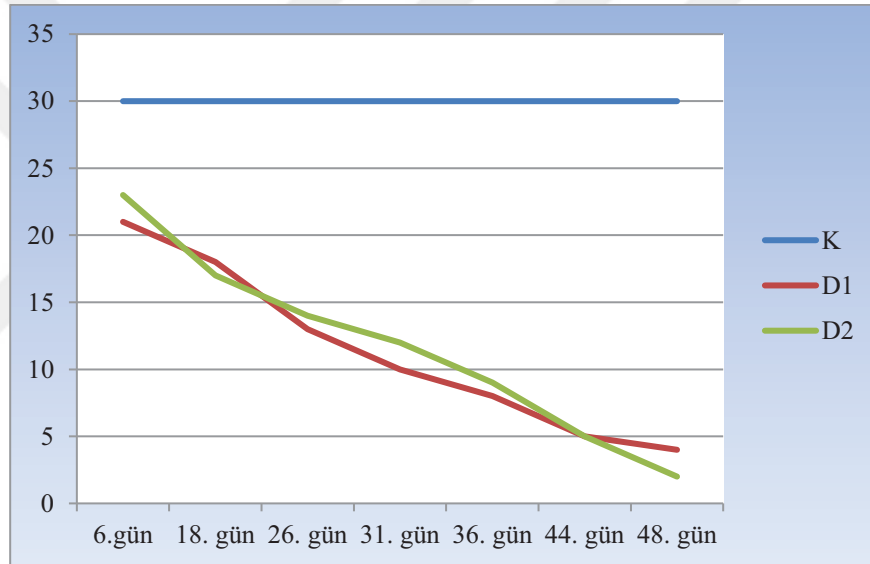


Şekil 4.4: Hematokrit skalasında santrifüj yapılmış kan örneğinin görünümü.

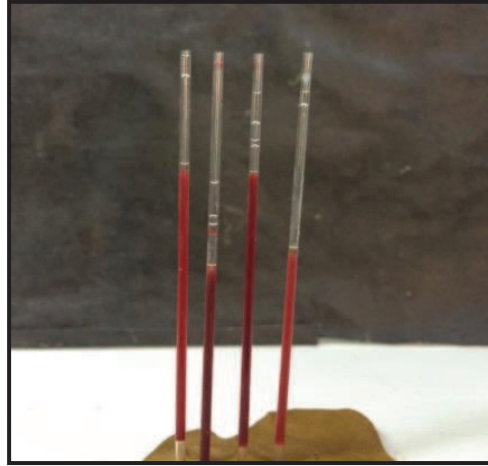
Kontrol grubunda (K) yer alan balıklardan alınan kan örnekleri incelendiğinde ilk haftadan itibaren deney sonuna kadar (48. gün) geçen süre boyunca yapılan hematokrit miktarının sabit kaldığı (% 30) görülmüştür. Ancak yerli *L. garvieae* suşu ile enfekte edilen D1 grubundaki balıklarda hematokrit değerinin başlangıçta % 21 iken çalışma sonunda bu değer % 4'e düştüğü dikkati çekmiştir. Referans *L. garvieae* suşu ile enfekte edilen D2 grubundaki balıklarda ise hematokrit değerinin deneyin ilk günlerinde % 23 iken deney sonuna doğru bu değer % 2'ye düştüğü dikkati çekmiştir. Günlere bağlı olarak değişen hematokrit değerleri Tablo 4.3 ve Şekil 4.6' da gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Kontrol (K) ve deney grubundaki (D1, D2) balıklara ait hematokrit değerleri.

Hematokrit Miktarı			
Gün	K	D1	D2
6. gün	30	21	23
18. gün	30	18	17
26. gün	30	13	14
31. gün	30	10	12
36. gün	30	8	9
44. gün	30	5	5
48. gün	30	4	2

**Şekil 4.5:** Kontrol balıkları (K) ve deney grubundaki (D1, D2) balıklara ait hematokrit değerleri (%).

Bu çalışmadaki kontrol ve deney grubundaki balıkların kanlarına ait sedimentasyon hızının saptanmasında da mikrohematokrit tüpleri kullanılmış ancak kan örnekleri santrifüj edilmemiş sadece tüpler dik konumda 1 saat bekleme süresinin sonunda tüpün üst tarafında oluşan renksiz serum kısmının ne kadarlık zaman diliminde oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

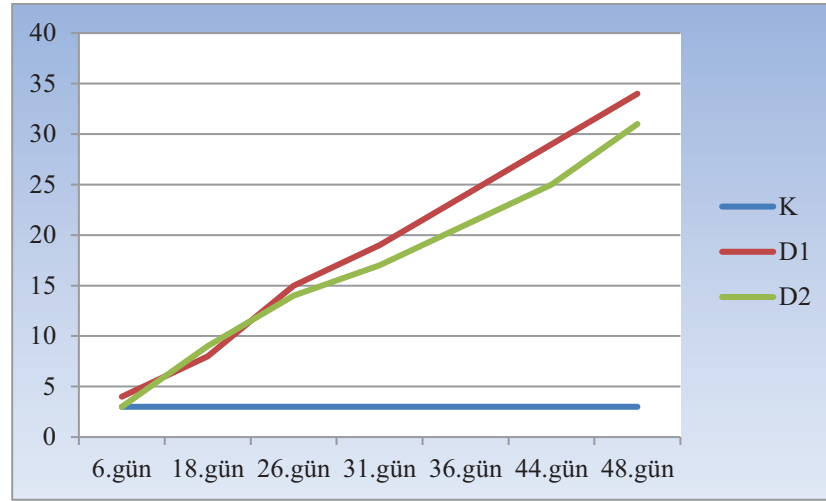


Şekil 4.6: Mikrohematokrit tüplerde sedimentasyon hızının saptanması.

Kontrol grubundaki (K) balıklardan alınan kan örneklerinde ilk haftadan itibaren deney sonuna kadar yapılan sedimentasyon hızı tespitinde bu değer 3 mm olduğu tespit edilmiştir. D1 grubundaki balıklarda başta 4 mm olarak ölçülen değer deney sonunda 34 mm olarak ölçülürken D2 grubundaki balıklarda ise bu değer 3 mm'den 31 mm'ye yükseldiği dikkati çekmiştir (Tablo 4.4). Şekil 4.8' de günlere bağlı olarak sedimentasyon hızındaki değişiklik gösterilmiştir.

Tablo 4.4: Kontrol ve deney grubunda yer alan balıkların kanlarındaki sedimentasyon hızı.

Sedimentasyon Hızı			
Gün	K	D1	D2
6. gün	3 mm	4 mm	3 mm
18. gün	3 mm	8 mm	9 mm
26. gün	3 mm	15 mm	14 mm
31. gün	3 mm	19 mm	17 mm
36. gün	3 mm	24 mm	21 mm
44. gün	3 mm	29 mm	25 mm
48. gün	3 mm	34 mm	31 mm

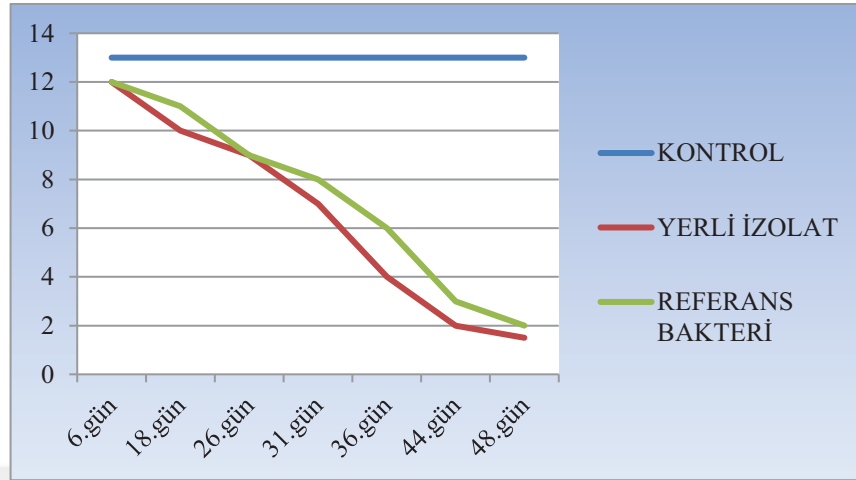


Şekil 4.7: Kontrol balıkları (K) ve deney grubundaki (D1, D2) balıkların kanlarına ait sedimentasyon hızı (mm).

Enfekte balıklardan alınan kanlarla ilgili olarak yapılan bir diğer hematolojik incelemede koagülasyon süresinin belirlenmesidir. Lam koagülasyon metodu kullanılarak deney balıklarındaki pıhtı oluşumunun görülmeye başladığı sürenin tespiti ile yapılmıştır. Kontrol grubundaki balıklarda koagülasyon süresi tüm deney boyunca 13 dakika iken diğer gruplarda bu süre deneyin başlangıcında 12 dakika, deney sonunda D1 grubunda 1,5 dakika ve D2 grubunda 2 dakika olarak kaydedilmiştir (Tablo 4.5; Şekil 4.9). Bakteriye bağlı olarak incelediğimiz balıkların koagülasyon süresinde farklılıklar gözlenmiştir.

Tablo 4.5: Kontrol ve deney grubunda yer alan balıkların kanlarındaki koagülasyon süresi.

Gün	Koagülasyon Süresi		
	K	D1	D2
6. gün	13 dk	12 dk	12 dk
18. gün	13 dk	10 dk	11 dk
26. gün	13 dk	9 dk	9 dk
31. gün	13 dk	7 dk	8 dk
36. gün	13 dk	4 dk	6 dk
44. gün	13 dk	2 dk	3 dk
48. gün	13 dk	1,5 dk	2 dk



Şekil 4.8: Kontrol balıkları (K) ve deney grubundaki (D1, D2) balıkların kanlarına ait koagülasyon süresi (dk).

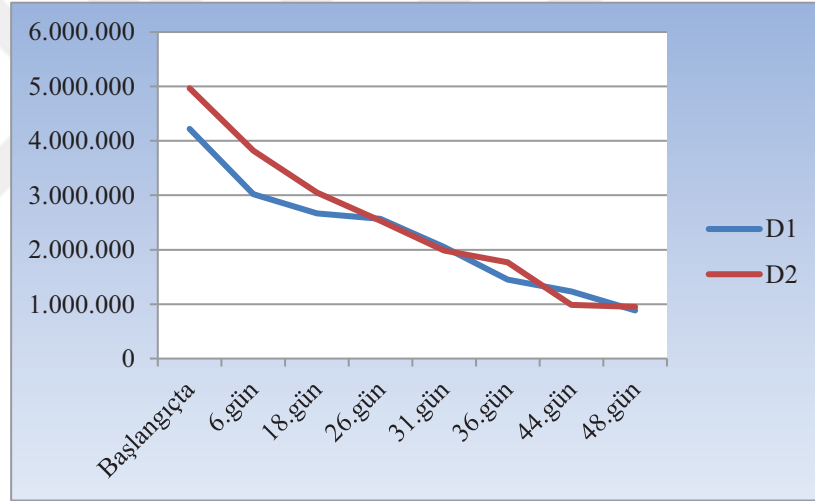
Bu çalışmada incelenen kontrol ve deney grubundaki balıklardan deneyin başlangıcından itibaren belirli aralıklarla kan örnekleri alınmış ve bu örneklerdeki eritrosit ve lökosit sayılarındaki değişiklikler araştırılmıştır.

Kontrol balıklarında eritrositlerin sayısı 3.200.000 - 5.185.000 /ml aralığında iken referans bakteri ile enfekte balıklarda bu değer başlangıçta 4.967.000 /ml'yi gösterdiği deney sonunda ise 950.000 /ml' ye düştüğü gözlenirken yerli bakteri suşu ile enfekte balıklarda eritrosit sayısının 4.220.000 /ml' den 884.000/ml' ye düştüğü dikkati çekmiştir (Tablo 4.6; Şekil 4.10).

Lökosit hücrelerinin sayısı ise kontrol balıklarında 834–1670 /ml aralığında iken referans bakteri ile enfekte deney balıklarında başlangıçta bu değer 830 /ml iken deney sonunda bu değer 5.830 /ml'ye çıktığı gözlenirken, yerli bakteri suşu ile enfekte balıklarda ise lökosit hücre sayısının 830 /ml'den 8.350 /ml'ye çıktığı tespit edilmiştir (Tablo 4.7; Şekil 4.11).

Tablo 4.6: Deney boyunca enfekte balıklarında kanında ölçülen günlük eritrosit değerleri (hücre/ml).

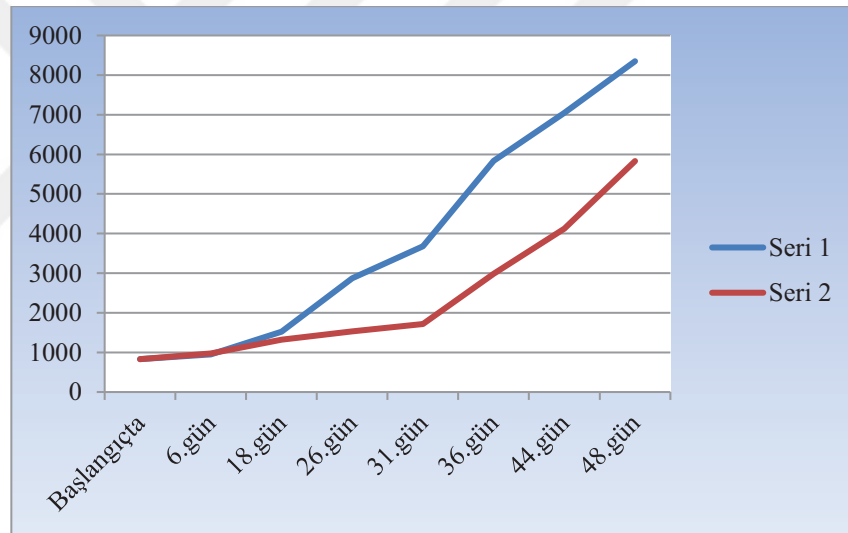
Eritrosit Sayısı (hücre/ml)		
Gün	D1	D2
Başlangıçta	4.220.000	4.967.000
6. gün	3.017.000	3.817.000
18. gün	2.667.000	3.050.000
26. gün	2.567.000	2.534.000
31. gün	2.050.000	1.984.000
36. gün	1.450.000	1.767.000
44. gün	1.234.000	984.000
48. gün	884.000	950.000



Şekil 4.10: Deney boyunca enfekte balıkların kanında ölçülen günlük eritrosit değerleri (hücre/ml).

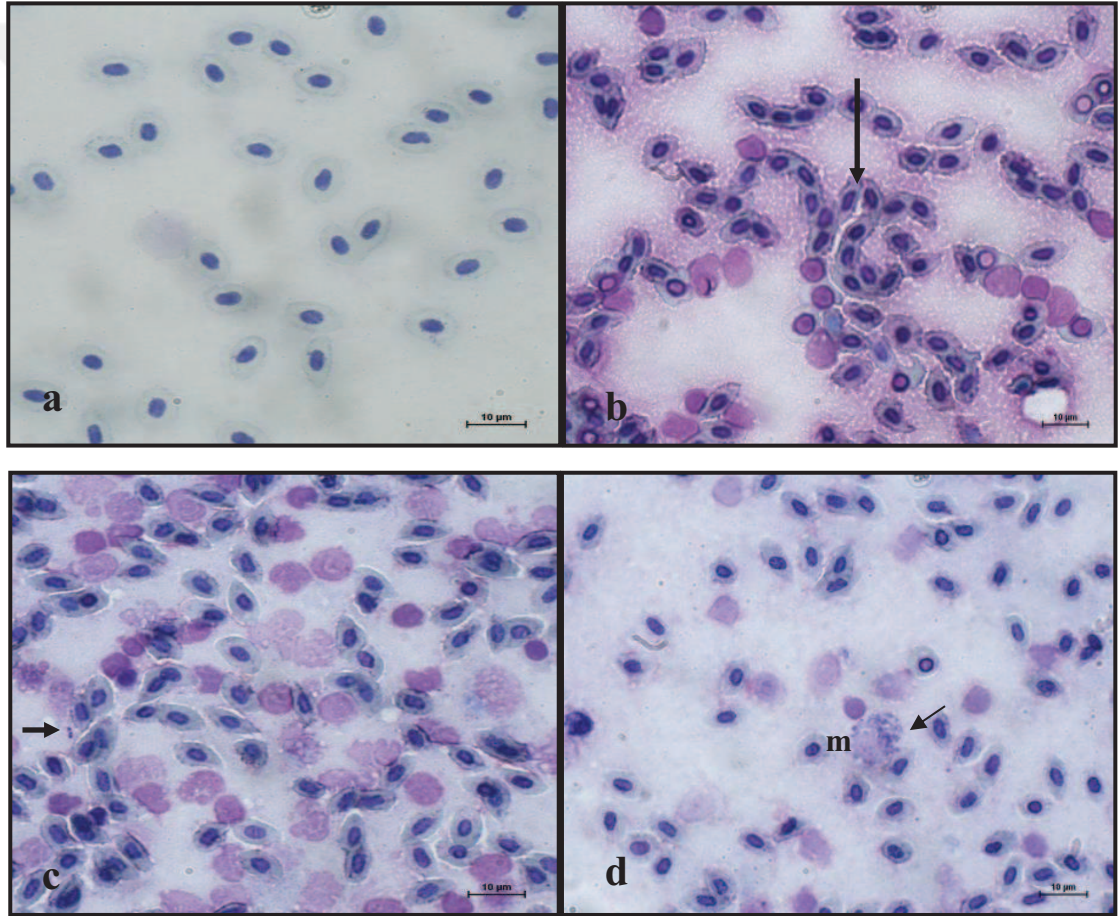
Tablo 4.7: Deney boyunca enfekte balıkların kanında ölçülen günlük lökosit değerleri (hücre/ml).

Lökosit Sayısı (hücre/ml)		
Gün	D1	D2
Başlangıçta	830	830
6. gün	950	972
18. gün	1.520	1.317
26. gün	2.869	1.534
31. gün	3.681	1.716
36. gün	5.836	2.983
44. gün	7.050	4.120
48. gün	8.350	5.830

**Şekil 4.9:** Deney boyunca enfekte balıkların kanında ölçülen günlük lökosit değerleri (hücre/ml).

Kan hücrelerindeki morfolojik değişiklikleri ve hastalığa bağlı olarak oluşabilecek dejenerasyonları tespit etmek için kontrol ve deney grubu balıklarından alınan kan örneklerinden yayma preparatları hazırlanmış ve preparatlar May Grunwald-Giemsa metodu ile boyanarak lamelle kapatılıp ışık mikroskobu altında incelendiğinde kontrol grubunda yer alan balıkların kan hücrelerinin morfolojik olarak düzgün bir yapı gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.12a). Ancak D1 ve D2 gruplarındaki balıklarda deneyin ilk haftasından itibaren eritrositlerde morfolojik bozukluklar görülmeye başlamıştır. Deneyin 16. gününde alınan yerli *L. garvieae* suşu ile enfekte edilen balığın kanında

deformasyona uğramış eritrosit hücreleri dikkati çekmiştir (Şekil 4.12b). Deneyin 29. gününde yerli *L. garvieae* suşu ile enfekte edilen balığın kanında Gram-pozitif bakteriler görülürken (Şekil 4.12c) bu gruptaki balıkların kanlarında bakterileri fagosite etmiş monosit hücrelerine de rastlanmıştır (Şekil 4.12d). Elde edilen bu bulgular doğrultusunda deneysel enfeksiyonda kullanılan bakterinin kanın sitoplazma kısmı yanı sıra eritrositlerin içinde de lokalize olduğu gözlenmiştir. Üçüncü haftadan itibaren lenfositlerin sayısında artışla birlikte son haftalara ait yayma preparatları incelendiğinde monositlerin görülmeye başladığı, ilerleyen günlerde bu hücrelerin sayılarında artış yanı sıra bakterileri fagosite etme yeteneğinde bir artış olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.10: Deneysel enfeksiyona bağlı olan levrek balıklarının kan hücrelerinde görülen morfolojik değişiklikleri. m: monosit hücresi. (a) Kontrol balığı, (b) Deneyin 16. gününde eritrosit hücrelerinde deformasyon (okla gösterilmiştir), (c) Deneyin 29. günündeki balıkların plazmasında görülen kok şekilli bakteriler (okla gösterilmiştir), (d) Monosit hücreleri içindeki kok şekilli bakterilerin görünümü (okla gösterilmiştir).

Sonuç olarak; deneysel olarak enfekte ettiğimiz levrek balıklarının kan parametreleri ile ilgili olarak yürütmüş olduğumuz bu deneysel enfeksiyon çalışmasından elde edilen bulgular ışığında enfeksiyona bağlı olarak balıklardaki kan parametrelerinin kontrol grubuna göre düşüş gösterdiği gözlenmiştir. Kan hücrelerinin sayısındaki bu değişiklikler sepsisemi ile seyreden balıklara ait kan örneklerindeki bulgularla benzerlik göstermiştir.

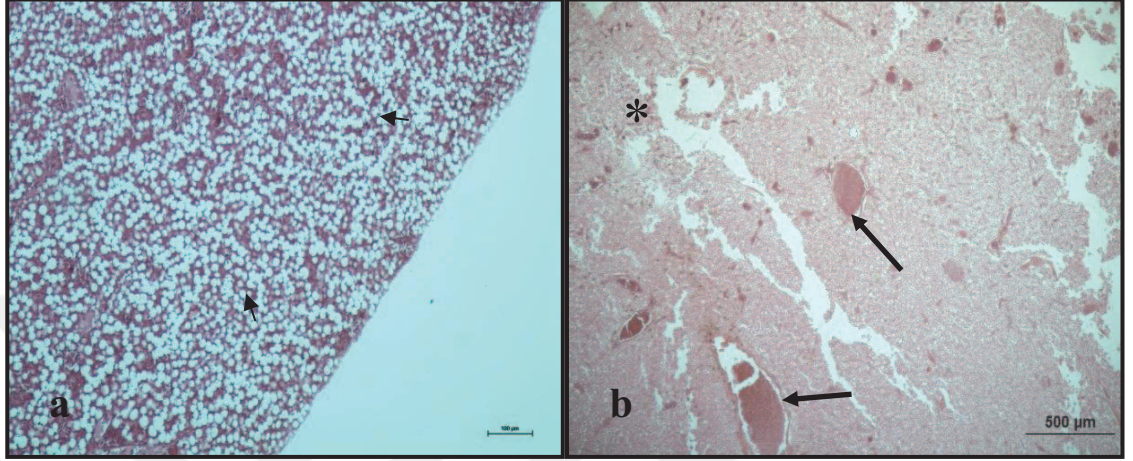
4.4 HİSTOLOJİK BULGULAR

Bu çalışmadaki kontrol balıklarında deney boyunca herhangi bir histopatolojik bulgu görülmezken her iki suş ile enfekte balıklarda histopatolojik olarak klinik tabloda özellikle ölümlerin arttığı 2. haftadan itibaren yerli *L. garvieae* suşunun enfekte balıklara ait dokularda referans *L. garvieae* suşundan daha fazla patolojik bozukluğa neden olduğu gözlenmiştir.

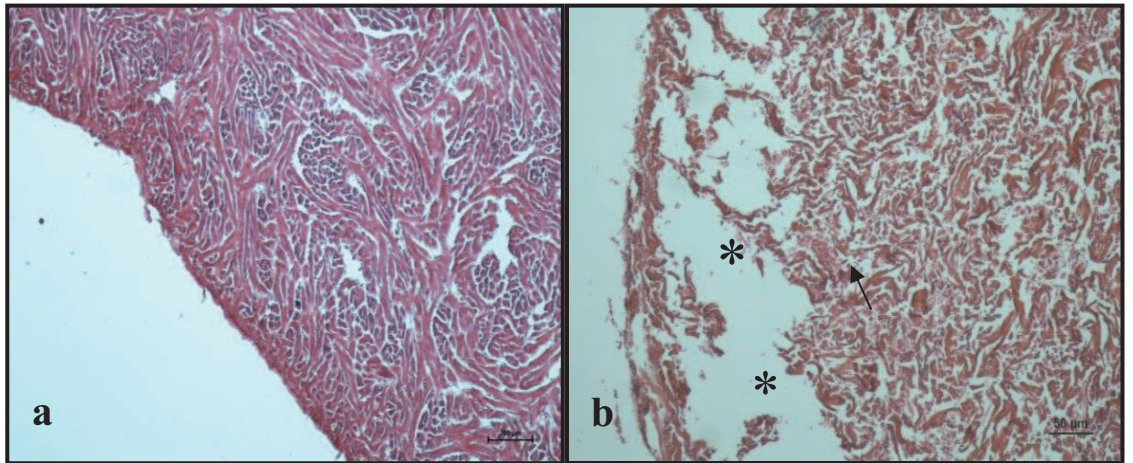
Bu çalışmada incelenen kontrol ve her iki suş ile enfekte balıkların karaciğer dokularına ait histolojik kesitlerde yemden kaynaklandığı düşünülen yağ dejenerasyonu (Şekil 4.13a,b) dikkati çekerken, enfekte balıkların karaciğer dokusunda hastalığa bağlı olarak hiperemi ve hemoraji yanı sıra ve liquefaktif nekrozun geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.13b). Her iki bakteri suşu ile enfekte levrek balıkların kalp kası hücrelerinde sağlıklı balıklardan farklı olarak hemoraji ve nekroz yanı sıra perikardiyumda incelme sonucu doku bütünlüğünün bozulduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14a,b).

Kontrol balıklarına ait dalak ve böbrek dokularına ait kesitlerde herhangi bir patolojik bozukluğa rastlanılmazken enfekte balıkların dalak dokusundaki kan damarlarında hiperemi, hemoraji ve multifokal liquefaktif nekroz yanı sıra melanomakrofaj odaklarının görüldüğü de dikkati çekmiştir (Şekil 4.15a,b). Hasta balıkların böbrek dokusu incelendiğinde böbreğin haemopoietik doku hücrelerinde liquefactive nekroz sonucu gelişen boşalma ve hiperemi (Şekil 4.16a,b) yanısıra böbrek tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz gözlenmiştir.

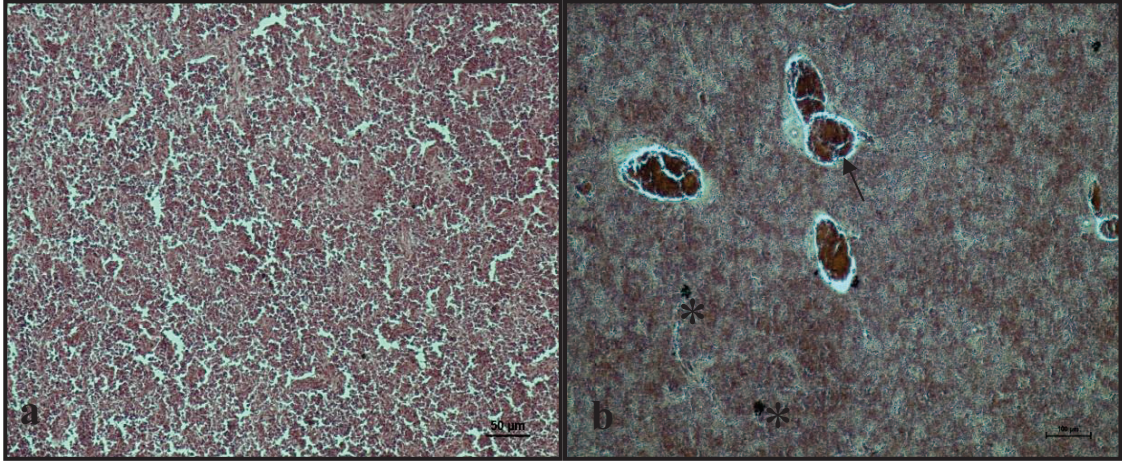
Bu tip patolojik bulgular dışında sağlıklı balıklardan farklı olarak hasta balıkların sekonder solungaç lamellalarında talenjektiazis, dökülme ve hiperplazi (Şekil 4.17a,b) gözlenirken göz dokusuna ait histolojik kesitlerde hiperemi ve hemoraji geliştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.18a,b).



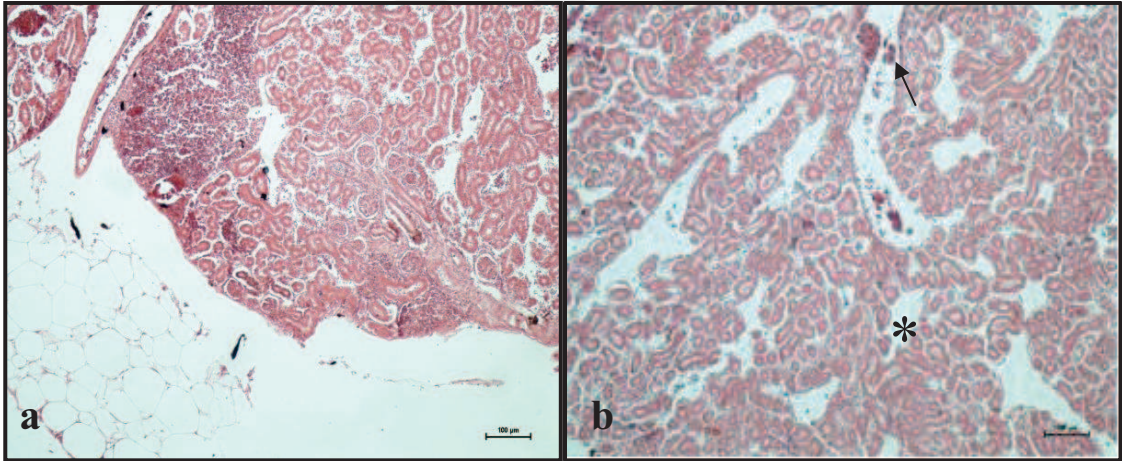
Şekil 4.11: (a) Kontrol balığının karaciğer dokusunda yağ dejenerasyonu (okla gösterilmiş) (H.E), (b) Enfekte balığın karaciğer dokusunda yağ dejenerasyonu, hiperemi (okla gösterilmiş) ve liküfaktif nekroz odakları (*) (H.E).



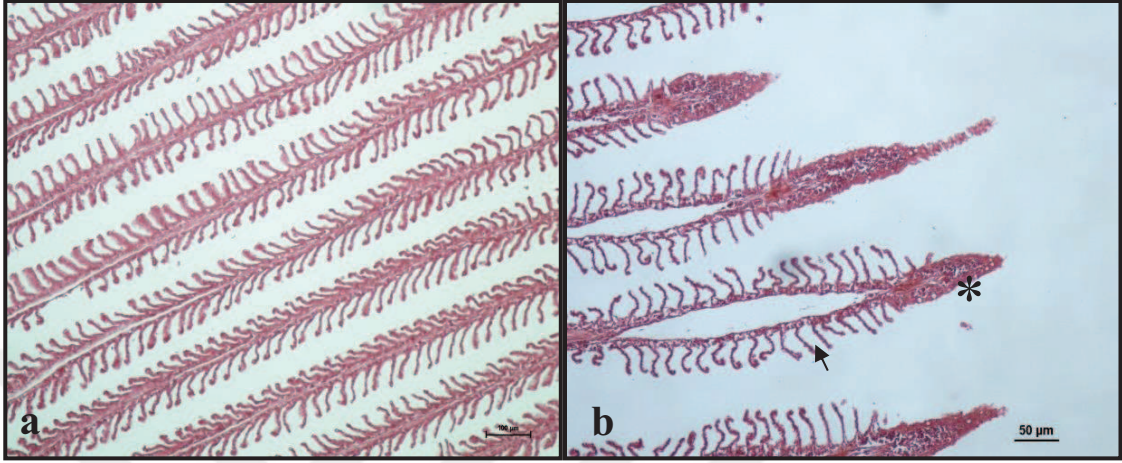
Şekil 4.12: (a) Deneyde kontrol olarak kullanılan levrek balığının kalp dokusunun görünümü (H.E) (b) Hasta levrek balığının kalp dokusunda hemoraji (okla gösterilmiş) ve nekroz (*) (H.E).



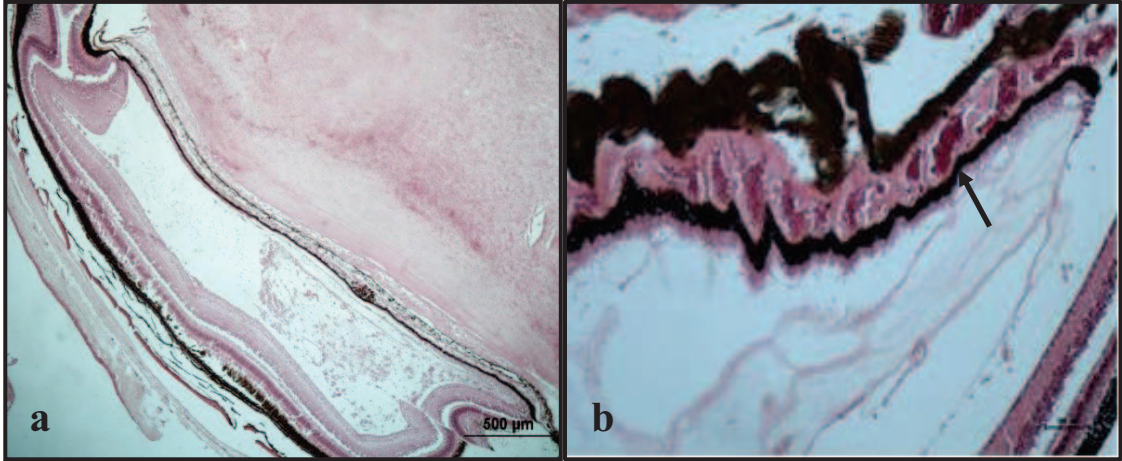
Şekil 4.13: (a) Kontrol balığının dalak dokusunun görünümü (H.E) (b) Hasta levrek balığının dalak dokusunda hemoraji (*) ve melanomakrofaj odakları (okla gösterilmiştir) (H.E).



Şekil 4.14: (a) Deneyde kontrol olarak kullanılan levrek balığının böbrek dokusunun görünümü (H.E) (b) Enfekte levrek balığının arka böbrek dokusundaki haemopoietik dokuda liquefaktif nekroz (*) ve hiperemi (okla gösterilmiş) (H.E).



Şekil 4.15: (a) Kontrol balığının solungaç dokusunun görünümü (H.E) (b) Hasta levrek balığının solungaç dokusunda hiperplazi (*) ve talenjektiazis (okla gösterilmiş) (H.E).



Şekil 4.16: (a) Deneyde kontrol olarak kullanılan levrek balığının göz dokusunun görünümü (H.E) (b) Hasta levrek balığının göz dokusunda hemoraji (okla gösterilmiştir) (H.E).

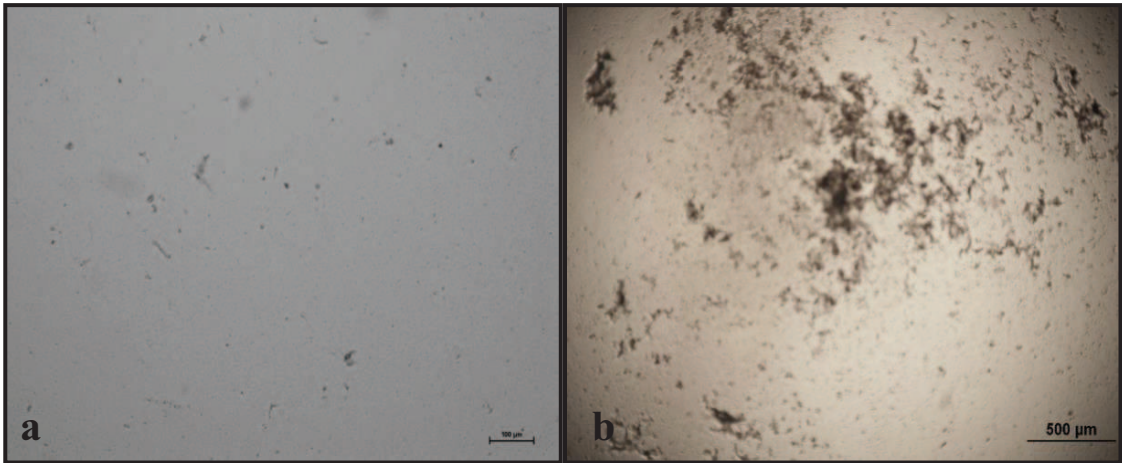
4.5 SEROLOJİK BULGULAR

Bu çalışmada enfekte edilen balıkların kanlarından hazırlanan ve patojen bakterilere karşı serum örneklerinde oluşan antikorun varlığı lam aglütinasyon, mikro-well aglütinasyon ve ELISA gibi serolojik testler kullanılarak tespit edilmiştir.

Çalışmada iki tip antijen örneği kullanılmış ve sonikasyon işlemine tabi tutularak hazırlanan antijenlerin 100 °C 'de hazırlanan antijene göre lam aglütinasyon tekniğinde belirgin şekilde daha etkin sonuç verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.19). Kontrol grubundan elde edilen serum örneklerinde ise ışıklı mikroskopta görüldüğü gibi beyaz çökelek oluşmaması nedeniyle negatif reaksiyon olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.20).

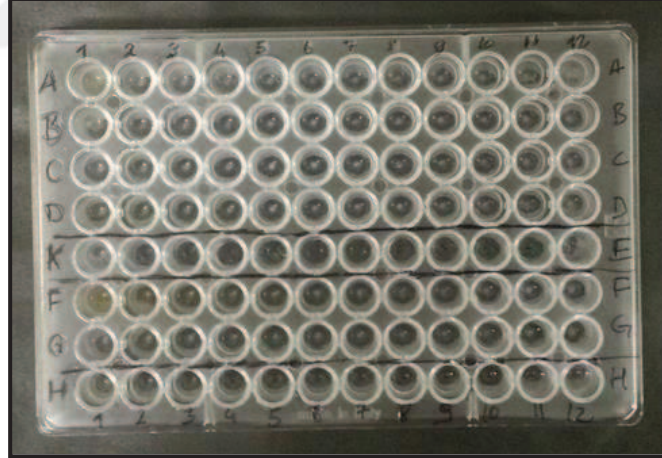


Şekil 4.17: Gözle görülebilir pozitif aglütinasyon reaksiyonu.



Şekil 4.20: Lam aglütinasyon testinin ışıklı mikroskop altındaki görüntüsü (a) negatif reaksiyon, (b) pozitif reaksiyon.

Mikro-well aglütinasyon testi için 'O' antijeni ile kaplanan mikroplağın her bir kuyucuğuna enfekte balıklardan elde edilen ve farklı dilüsyonları hazırlanan serum örneklerinden 100' er µl' lik hacimde ilave edilmiştir. Plak iki saat 37 °C' de bekletildikten sonra 4 °C' de tüm gece boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Bu süre sonunda çukurların tabanında bulanık kenarlı çökeltilerin gözlenmesi pozitif aglütinasyonu gösterirken, keskin kenarlı çökeltilerin gözlenmesi ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve deney grubundaki balıklardan farklı haftalarda alınan serum örnekleri ile yürütülen mikro-well aglütinasyon testi sonucuna göre antijen olarak referans bakterinin kullanıldığı A, B, C ve D satırlarına ait kuyucukların tabanında Şekil.4.15'de görüldüğü gibi bulanık kenarlı çökeltilerin gözlendiği dikkati çekerken kontrol grubu olarak kullanılan E satırında ise herhangi çökeltinin oluşmadığı ve kontrol grubunun negatif sonuç verdiği dikkati çekmiştir. Antijen olarak yerli *L. garvieae*' nin kullanıldığı F ve G satırlarında da aynı şekilde antijen-antikor birleşmesinden kaynaklanan beyaz çökeltilerin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: Kontrol (K sırası) ve deney grubu balıklara ait serumlar (A, B, C, D, F, G sıraları) kullanılarak uygulanan mikro-well aglütinasyon plağı.

Mikro-well aglütinasyon çalışması sonunda en iyi çökeltme titresinin çalışmanın 44-48. günlerini kapsayan tarihlerde, Şekil 4.21'te de belirtildiği gibi tabanında antijen olarak yerli izolatın bulunduğu ve 1/20 oranında seyreltilmiş serum dilüsyonu ilavesi sonucunda F2 kuyucuğunda oluşan aglütinasyon titresinin spektrofotometrik ölçüm sonucunda en yüksek yani 1.67 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8’te belirtildiği gibi tabanında antijen olarak referans bakteri bulunan ve 1/160 oranında serum dilüsyonu ilave edilen D5 kuyucuğunda ölçülen aglütinasyon titresinin en yüksek yani 1.41 olduğu ölçülmüştür.

Tablo 4.8: Mikro-well aglütinasyon plağının kuyucuklarındaki aglütinasyon titrelerinin spektrofotometrik ölçümü.

		Mikro-well Aglütinasyon Titreleleri											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Referans Bakteri	A	1.045	1.404	1.379	1.304	1.290	1.208	1.198	1.194	1.155	1.208	1.159	1.114
	B	1.065	1.167	1.251	1.320	1.254	1.395	1.297	1.323	1.285	1.293	1.178	1.131
	C	1.300	1.196	1.295	1.309	1.323	1.342	1.347	1.274	1.300	1.240	1.243	1.245
	D	1.335	1.235	1.299	1.264	1.410	1.335	1.371	1.347	1.335	1.315	1.259	1.321
Yerli İzolat	K	1.165	0.053	0.056	0.679	0.243	0.542	0.739	0.255	0.165	0.350	0.212	0.553
	E	1.165	0.053	0.056	0.679	0.243	0.542	0.739	0.255	0.165	0.350	0.212	0.553
	F	1.668	1.670	1.514	1.384	1.400	1.312	1.245	1.248	1.205	1.284	1.418	1.170
	G	1.145	1.147	1.239	1.256	1.174	1.271	1.326	1.240	1.260	1.273	1.241	1.143
	H	0.183	0.100	0.101	0.295	0.204	0.073	0.339	0.229	0.317	0.279	0.084	0.086

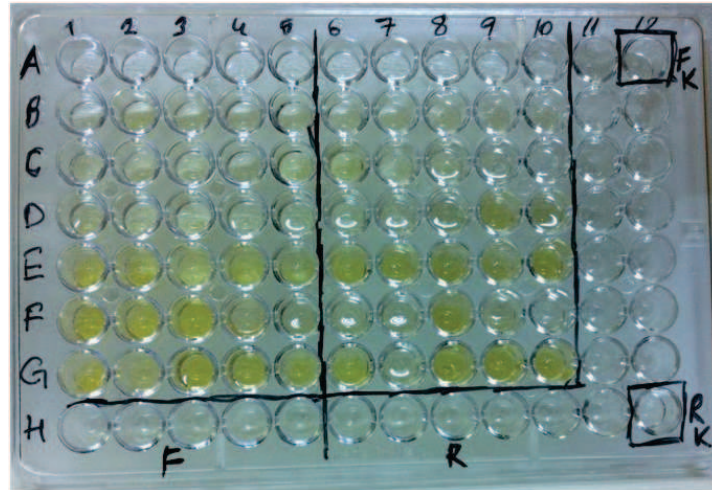
Bu çalışmadaki hasta balıklardan elde edilen serum örneklerindeki antikor seviyelerinin belirlenmesi için yürütülen ELISA tekniğinde 1–5 numaralı sütunlardaki kuyucukların herbirine yerli *L.garvieae* antijeni gömülürken, 6–10 numaralı kuyucuklara ise referans bakteriden hazırlanan antijen örnekleri ilave edilmiştir. Tablo 4.9’ te belirtildiği gibi kullanılan serum, Mab ve enzim olarak Horseradish peroksidase (HRPO) ilavesinde de farklı dilüsyon oranları tercih edilmiştir.

Tablo 4.9: ELISA tekniğinin uygulanma prosedürü.

ELISA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:50 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:500 HRP		K
B	1:50 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP		
C	1:50 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:500 HRP		
D	1:50 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:50 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP		
E	1:100 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:500 HRP		
F	1:100 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:20 Mab 1:1000 HRP		
G	1:100 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:500 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:500 HRP		
H	1:100 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP	1:100 serum 1:33 Mab 1:1000 HRP		K
	Y					R						

Y: Yerli izolat, R: Referans bakteri, K: Kontrol

Şekil 4.22 'da görüldüğü gibi A satırındaki her bir kuyucuğa denemenin başlangıç aşamasındaki balıklardan elde edilen serum örnekleri ilave edildiği için antijen - antikor reaksiyonun çok zayıf geliştiği gözlenmiştir. Ancak deneysel enfeksiyonun sonlarında G sırasında olduğu (40. günde) gibi sarı renkte artış olmasına bağlı olarak reaksiyondaki artış olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.182: ELISA plağının görünümü (koyu sarı pozitif reaksiyon) Yerli (F grubu) ve referans (R grubu) *L. garvieae* suşları, K: kontrol grubu.

ELISA okuyucusunda elde edile veriler doğrultusunda plak üzerinde görülen en yüksek reaksiyon değerinin her iki bakteri için yaklaşık olarak 0,4 olduğu ve bu değer için kullanılan serum dilüsyon oranının 1:100 olduğu kuyucuklarda (F3, G8) görüldüğü tespit edilmiştir (Tablo 4.10). F3 kuyucuğundaki değer denemenin 41. günündeki balıklara ait serum örneği ile gerçekleştirilirken antijen olarak yerli bakteri kullanılmış, Mab 1:20 dilüsyon oranında ve konjugat da 1:1000 oranında ilave edilmiştir. G8 kuyucuğunun tabana ise antijen olarak referans bakteri gömülmüş, serum örneği olarak denemenin 48. günündeki enfekte balığa ait serum örneği kullanılmış, 1:33 dilüsyon oranında Mab ve 1:500 oranında konjugat ilavesi yapılmıştır.

Tablo 4.10: ELISA plağına ait spektrofotometredeki verileri.

ELISA Plağı Aglütinasyon Titreleleri												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.055	0.056	0.070	0.051	0.048	0.042	0.040	0.038	0.040	0.069		0.046
B	0.087	0.141	0.096	0.085	0.082	0.082	0.086	0.248	0.065	0.072		
C	0.095	0.077	0.094	0.070	0.136	0.143	0.083	0.115	0.056	0.039		
D	0.150	0.144	0.152	0.089	0.104	0.100	0.087	0.122	0.213	0.151		
E	0.328	0.274	0.215	0.259	0.205	0.257	0.273	0.255	0.224	0.362		
F	0.366	0.323	0.391	0.197	0.119	0.102	0.094	0.331	0.148	0.059		
G	0.332	0.213	0.388	0.289	0.276	0.298	0.102	0.407	0.366	0.312		
H	0.061	0.052	0.054	0.054	0.050	0.052	0.053	0.053	0.053	0.056		0.038
	Y					R					K	

Y: Yerli izolat, R: Referans bakteri, K: Kontrol

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Deniz balıkları yetiştiriciliği dünyada ve yurdumuzda istikrarlı yükseliş gösteren endüstri kolu haline gelmiştir ancak bakteriyel balık hastalıkları bu gelişmeyi olumsuz yönde etkilemektedir (Salati, 2011; Roberts, 2012). *Lactococcus garvieae*'nin neden olduğu lactococcosis enfeksiyonu hemorojik septisemi ile karakterize sistemik bir enfeksiyondur (Salati, 2011; Austin ve Austin 2012). Hastalık daha çok başta alabalık olmak üzere tatlı su balıklarında görülürken (Vela ve diğ., 2000; Bark ve McGregor, 2001; Evans ve diğ., 2009; Sharifiyazdi ve diğ., 2010) sarıkuyruk balığı, Kızıldeniz lapini, siyah kaya balığı gibi çeşitli deniz balığı türlerinde de görülmektedir (Kusuda ve diğ., 1991; Varvarigos, 2001; Chen ve diğ., 2002; Colorni, ve diğ., 2003; Baeck ve diğ., 2006). Yurdumuzda *L. garvieae* ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında araştırmaların tamamının kültür alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) üzerinde gerçekleştiği (Avcı ve diğ., 2010; Tanrıkul ve Gültepe, 2011, Timur ve diğ., 2011; Avsever ve diğ., 2014; Didinen ve diğ., 2014) görülmekte olup kültür deniz balıklarında oluşturduğu enfeksiyonla ilgili Türe ve diğ. (2014) yaptığı çalışma dışında herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile kültür deniz levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) ilk kez deneysel olarak *Lactococcus garvieae* ile hastalık oluşturulmuş ve farklı yöntemler (bakteriyolojik, hematolojik ve serolojik teknikler) kullanılarak hastalığın teşhisi yapılmıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen klinik bulgular *L. garvieae* ile doğal yolla enfekte (Colorni ve diğ., 2003; Sharifiyazdi ve diğ., 2010; Didinen ve diğ., 2014) ve deneysel yolla enfekte edilen balıklarda görülen klinik bulgularla benzerlik göstermiştir (Del Pozo, 2005; Avcı ve diğ., 2014; Ürkü, 2011). Deneysel çalışmada *L. garvieae* ile enfekte levrek balıklarında gözlenen gözlerde ekzoftalmus, anoreksia, renkte koyulaşma, letarji, korneada opaklık, oküler zonda ve operkulumda hemoraji, şişkin abdomen, anal bölgede kızarıklık ve karında hemoraji gibi klinik bulgular diğer araştırmacıların (Kusuda ve diğ.,1991, Chen ve diğ., 2002, Kang ve diğ., 2004, Vendrell ve diğ., 2006, Avcı ve diğ., 2010, Tanrıkul ve Gültepe, 2011, Timur ve diğ., 2011, Didinen ve diğ., 2014) yaptıkları çalışmalardan elde edilen klinik bulgularla benzerlik gösterirken; enfekte balıkların pektoral ve kaudal yüzgeçlerinde konjesyon (Kusuda ve diğ.,1991), solungaç

filamentlerinde (Avcı ve diğ., 2010) ve ağızda hemoraji (Tanrıkul ve Gültepe, 2011) yanısıra göz kaybı (Timur ve diğ., 2011) gibi bulgular yapmış olduğumuz deneysel çalışmada da gözlenmemiştir. Ayrıca deneme balıklarında diğer araştırmacılar farklı olarak kafa bölgesinde özellikle beynin üzerindeki kemikte erime yanısıra deney sonlarına doğru bazı balıklarda skolyoz oluşumu gibi bulgularının geliştiği de görülmüştür. Bu çalışma ile ilk kez bu bakteri ile enfekte edilmiş balıklarda skolyoz bulgusuna rastlanırken Pasnik ve diğ. (2006)'nin yaptıkları çalışmada *Streptococcus* sp. ile enfekte Nil tilapyaalarında (*Oreochromis niloticus*) da benzer şekilde hastalığa bağlı olarak skolyoz geliştiğini belirtilmişlerdir. Otopsileri yapılan deneme balıklarında görülen peritonda asidik sıvı birikimi, karaciğerde yağ dejenerasyonu ve hemoraji, splenomegali, kalpte büyüme ve ön böbrekte erime gibi klinik bulgular diğer araştırmacıların elde ettikleri verilerle benzerlik göstermektedir (Kusuda ve diğ., 1991, Chen ve diğ., 2002, Avcı ve diğ., 2010, Tanrıkul ve Gültepe, 2011, Timur ve diğ., 2011). Ancak Vendrell ve diğ., (2006)'nin enfekte ettikleri balıklarda gözlemedikleri bağırsak ve yüzme kesesinde hemoraji yanı sıra kalpte perikarditisin oluşumu ile Kang ve diğ., (2004)'nin beyinde meningoensafalitin görülmesi gibi otopsi bulgularına bu çalışmadaki deney balıklarında rastlanılmamıştır. Deneyin son günlerine doğru enfekte balıkların karaciğerinde gözlenen nodül benzeri yapılara ilk kez bu çalışmada rastlanılmıştır.

Lactococcosis ile ilgili olarak yapılan deneysel enfeksiyon çalışmalarında yüksek oranda ölüme neden olan bakteri yoğunluğunun tespitinde daha çok 3 farklı doz (10^5 , 10^6 ve 10^7 CFU/ml) tercih edilirken siyah kaya balıklarında 10^7 CFU/ml (Kang ve diğ., 2004), tilapya balıklarında 1.5×10^5 CFU/ml (Evans ve diğ., 2009), gökkuşacağı alabalığında 10^6 CFU/ml (Ürkü, 2011; Avcı ve diğ., 2014; Türe ve diğ., 2014) ve zebra balığında 2×10^7 CFU/ml (Aguado-Urda ve diğ., 2014) bakteri yoğunluğu tercih edilmiştir. Bu bakterinin alabalıklardaki deneysel enfeksiyonu ile ilgili yurdumuzdaki yapılan çalışmalara bakıldığında farklı araştırmacılar alabalıklardaki etkin dozun 10^6 (Ürkü, 2011; Avcı ve diğ., 2014; Türe ve diğ., 2014) ve 10^7 hücre/ml (Kang ve diğ., 2004) olduğunu belirtirken levrek balıklarında ise bakterinin 10^6 hücre/ml dozunu denemişler ve bu dozda levrek balıklarında herhangi bir ölüme rastlamadıklarını rapor etmişlerdir (Türe ve diğ., 2014). Yapılan bu deneysel enfeksiyon çalışmasında 10^6 ve 10^7 CFU/ml bakteri yoğunluğunun enfekte levrek balıklarında düşük oranda ölüme neden olduğu tespit edilirken kullanmış olduğumuz 10^8 CFU/ml'lik bakteri dozunun Chen ve diğ., (2002)'nin 10^7 - 10^8 CFU/ml

yoğunlukta bakteri ile kefal balıklarında oluşturdukları deneysel enfeksiyon çalışmasında görülen yüksek ölüm oranı ile benzerlik göstermiştir.

Bu çalışmada *L. garvieae* ile enfekte balıklardan yeniden izole edilen yerli ve referans *L. garvieae* (ATCC 43921) bakterilerinin biyokimyasal özellikleri incelenmiş ve bu iki bakteri çok küçük beyaz düzgün koloni tipi, hareketsiz, Gram pozitif boyanma özelliği, katalaz ve sitokrom oksidaz negatif, fermentatif, α hemolitik gibi özellikleri nedeni ile diğer araştırmacıların belirtmiş olduğu gibi *L. garvieae* olarak izole ve identifiye edilmiştir (Kusuda ve diğ., 1991; Kubilay ve diğ. 2005; Ürkü, 2011; Altun ve diğ., 2013; Didinen ve diğ., 2014). Yapmış olduğumuz testler sonucunda yerli bakterinin kapsül varlığı ve laktozdan asit üretmesi gibi özellikleri nedeni ile *L.garvieae*' nin biyotip 3 grubunda olduğunu göstermiştir (Vela ve diğ., 2000; Çağırğan 2004).

Bu çalışmadaki enfekte balıklardan alınan kan örneklerinde kontrol grubuna göre ESO deneyin başlangıç aşamasında 3-4 mm/ml iken deney sonuna doğru bu değer 34 mm/ml'ye yükseldiği tespit edilmiş ve bu çalışma ile diğer araştırmacıların kirlilik ve sıcaklık değişiminin balıkların kan değerleri üzerindeki etkisini belirlemek için yaptıkları araştırmalarda elde ettikleri verilerle benzerliğin olduğu gözlenmiştir (Atamanalp ve diğ., 2003; Jagtap ve Mali 2012). Yapmış olduğumuz deneysel çalışma ile Kobayashi ve diğ., (2004)'nin doğal olarak *L. garvieae* ile enfekte kültür Kore kaya balıklarında (*Sebastes schlegeli*) yaptıkları araştırma sonucu aldıkları verilerdeki gibi hematokrit değerinin hastalığa bağlı olarak başlangıçta % 20-23 aralığında olduğu deneyin sonuna doğru bu değer % 2-4 oranında azalma gösterdiği dikkati çekmiştir. Trombositlerle ilişkili olan koagülasyon süresi başlangıçta 13 dk iken hastalığın oluşması sonucunda artış göstererek koagülasyon süresinin 1-2 dk'ya düştüğü dikkati çekmiştir. Nitekim bizim çalışmamızda son günlerde koagülasyon sürelerinde azalış gözlenmiştir.

Bu çalışmada incelenen hasta levrek balıklarının eritrosit hücrelerinin sayısı başlangıçta 3.000.000-5.000.000 / ml iken deney sonuna doğru 900.000 / ml'ye düştüğü tespit edilirken lökosit sayısının arttığı gözlenmiştir. Del Pozo (2005) ve Avsever ve diğ., (2014)' nin yapmış oldukları hematolojik incelemelerde *L. garvieae* ile enfekte balıklardan aldıkları örneklerde kan hücrelerinde elde ettiğimiz gibi eritrositlerde sayıca azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun yanısıra Avsever ve diğ. (2014) enfekte balıkların beyaz kan hücrelerinde azalma olduğunu belirtirken bizim yapmış olduğumuz

çalışmada ise farklı olarak beyaz kan hücrelerinin sayısında artış olduğu dikkati çekmiştir. Aynı araştırmacıların enfekte gökkuşağı alabalıklarındaki eritrositlerin yapılarında bozulmanın yanısıra kan hücre sitoplazmalarında kok şekilli bakterilerin bulunması gibi bulgular bu araştırmadaki hasta levrek balıklarında da gözlenmiştir (Del Pozo, 2005; Avsever ve diğ., 2014).

Bu çalışmada incelenen deney balıklarına ait histolojik kesitlerde gözlenen karaciğer dokusunda hiperemi ve liquefaktif nekroz odaklar, kalp dokusunda hemoraji ve nekroz, dalak dokusunda hemoraji ve melanomakrofaj odakları, arka böbrek dokusundaki haemopoietik dokuda liquefaktif nekroz ve hiperemi, solungaç dokusunda hiperplazi ve telanjektiazis ve göz dokusunda hemoraji ve nekroz gibi bulgular bu konuda çalışan diğer araştırmacıların verileri ile benzerlik göstermiştir (Del Pozo, 2005; Avcı ve diğ., 2010, 2014; Timur ve diğ., 2011; Ürkü, 2011; Didinen ve diğ., 2014). Bu bulgular hemorojik septisemi ile seyreden hastalıklarda görülen patolojik bulgularla da benzerlik göstermektedir (Timur ve Timur, 2011; Roberts, 2012).

Bu çalışmada kullanmış olduğumuz lam aglütinasyon, mikro-well aglütinasyon ve ELISA gibi serolojik teknikler ile enfekte balık serumlarındaki antikorların tespiti belirlenerek hastalığın hızlı teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kang ve diğ., 2004; Del Pozo, 2005; Ürkü, 2011; Austin ve Austin, 2012). *L. garvieae* ile ilgili yapılan farklı lam aglütinasyon deneylerinde kapsüllü (KG-) suşlarının kapsülsüz (KG+) suşlara göre hastalık yapma özelliğinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Ooyoma ve diğ., 2002; Kang ve diğ. 2004). Bu çalışmada kullanmış olduğumuz yerli izolatın Ürkü (2011)'nün doktora tezinde belirtmiş olduğu gibi kapsüllü (KG-) *L.garvieae* suşu olması nedeniyle hastalık yapma yeteneğinin yüksek olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır (Ooyama ve diğ., 2002, Kang ve diğ., 2004; Vendrell ve diğ., 2006).

Bu çalışmadaki enfekte balıkların etkene karşı serumlarında (farklı dilüsyonların) oluşan antikor titresinin belirlenmesinde kullanılan mikro-well aglütinasyon tekniğinde lam aglütinasyona kıyasla daha etkili bir yöntem olduğu dikkati çekmiştir (Roberson, 1993; Timur ve Timur, 2003). Yürütmüş olduğumuz bu deneysel enfeksiyon çalışmasında olduğu gibi yurdumuzdaki çalışmalara bakıldığında Kubilay ve diğ. (2008) bu tekniği *L. garvieae*'ye karşı gökkuşağı alabalıklarında geliştirmiş olduğu aşı çalışması sırasında antikor seviyesinin belirlenmesinde başarı ile kullanmıştır. Deneme balıklarımıza ait

serum örneklerinde 40. günden itibaren yüksek aglütinasyon reaksiyonu gözlenirken aynı araştırmacının yapmış olduğu çalışmada ise bu reaksiyonda 30. günden itibaren artış olduğu bildirilmektedir.

ELISA tekniği Nil tilapularında (Pasnik ve diğ. 2006) ve hibrit çizgili levrek balıklarında (*Morone chrysops* & *M. saxatilis*) (Shelby ve diğ. 2002a, 2002b, 2004) *Streptococcus* spp.'den kaynaklanan hastalığa karşı oluşan immün parametrelerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılırken, gökkuşacağı alabalıklarında *L. garvieae* ile yürütülen deneysel enfeksiyon çalışmalarında olduğu gibi bu çalışmadaki enfekte levrek balıklarında da başarılı olarak kullanılmıştır (Del Pozo 2005; Ürkü 2011). Elde edilen bu sonuçlar ELISA testinin diğer serolojik tekniklere göre daha hassas ve bakteriye karşı oluşan humoral yanıtın gelişiminin belirlenmesinde daha duyarlı bir yöntem olduğunu bir kez daha göstermiştir (Shelby ve diğ. 2002 a,b;2004; Del Pozo, 2005; Pasnik ve diğ. 2006; Ürkü 2011).

Sonuç olarak; bu yüksek lisans tezi ile *L. garvieae* ile ilgili yurdumuzdaki daha önceki çalışmalardan farklı olarak ilk kez bir deniz balığı türünde deneysel olarak enfeksiyon oluşturulmuştur. 10^8 CFU/ml bakteri dozunun deney balıklarında akut ölümlere neden olduğu gözlenirken diğer dozların (10^6 ve 10^7 CFU/ml) verildiği balıklarda hastalığın daha kronik seyrettiği dikkati çekmiştir. Bu bakteri ile ilgili olarak yurt dışı ve yurt içindeki diğer araştırmacıların doğal veya deneysel enfeksiyon çalışmalarında kullandıkları hematolojik yöntemlere bakıldığında ancak hematokrit değerinin belirlenmesi ve kan hücrelerinin sayımı gibi birkaç teknik kullanılmıştır. Yürütmüş olduğumuz bu çalışmada ise bu teknikler yanısıra ESO ve koagülasyon hızının belirlenmesi gibi farklı yöntemler kullanılarak hastalığın enfekte levrek balıklarının kan parametreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hematolojik incelemeler sonucunda enfeksiyonun hasta balıkların kanlarına ait ESO ve koagülasyon süresinde de düşüşe neden olduğu ilk kez bu çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Farklı serolojik yöntemler kullanılarak da enfekte levrek balıklarında hastalığın teşhisi yanısıra serumdaki antikor seviyesi tespit edilmiş ve en duyarlı serolojik yöntemin ELISA olduğu görülmüştür. Bu tezden elde edilen detaylı veriler doğrultusunda Lactococcosis'in yurdumuzdaki kültür deniz balıklarında görülmesi halinde hastalığın balıkta oluşturduğu klinik tablonun bilinmesi yanısıra farklı

teşhis yöntemleriyle teşhisinin hızlı yapılmasına bağlı olarak hastalığın tedavisi ve kontrolü için erken müdahale şansı doğacaktır.



KAYNAKLAR

- Aguado-Urda, M., Rodriguez-Bertos, A., Heras, A.I., Blanco, M.M., Acosta, F., Cid, R., Fernandez-Garayzabal, J.F., Gibello, A., 2014, Experimental *Lactococcus garvieae* Infection In Zebrafish And First Evidence of Its Ability To Invade Non-Phagocytic Cells, *Veterinary Microbiology*, 171, 248-254.
- Akayli, T., Özesen Çolak, S., Yardımcı, E., 2009, Bacterial Pathogens Of Gilt-Head Sea Bream, *Indian Veterinary Journal*, 86, 1294-1295.
- Akaylı, T., Erkan, M., Yardımcı, R.E., Çanak, Ö., Ürkü, Ç., 2015., Interaction of Gut Flora and Bacterial Pathogens of Cultured Common Dentex (*Dentex dentex*), *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, IJA_67.2015.1136, 7.
- Akbulut, B., Şahin, T., Aksungur, M., Aksungur, N., Erteken, A., 1999, *Karadeniz'de Levrek Yetiştiriciliği*, TAGEM/IY/96/12/1/003.
- Alpbaz, A., 2005, *Su Ürünleri Yetiştiriciliği (1. Baskı)*, İzmir: Alp yayınları, ISBN: 975-97056-1-3.
- Altun, S., Diler, Ö., 1999, *Yersinia ruckeri* ile İnfekte Edilmiş Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Hematolojik İncelemeler, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 23, 301-309.
- Altun, S., Diler, A., Diler, Ö., Başak, K., Isıklı, B., 2005, Histopathology of Streptococcosis In Rainbow Trout, *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 25(3), 131-135.
- Altun, S., Adiloğlu, A., Kubilay, A., Diler, Ö., Demirbaş, 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., Kubilay, A., Ekici, S., Didinen, B.I., Diler, Ö., 2010, Oral Vaccination Against Lactococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using Sodium Alginate and Poly (lactide-co-glycolide) Carrier, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 211-217.
- Altun, S., Onuk, E.E., Çiftçi, A., Büyükekiz, A.G., Duman, M., 2013, Phenotypic, Genotypic Characterisation and Antimicrobial Susceptibility Determination of *Lactococcus garvieae* Strains, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(3), 375-381.
- Aoki, T., Park, C.I., Yamashita, H., Hirono, I., 2000, Species-specific Polymerase Chain Reaction Primers For *Lactococcus garvieae*, *Journal of Fish Diseases*, 23, 1-6.

- Atamanalp, M., Bayır, A., Sirkecioğlu, A.N., Cengiz, M., 2003, Bir Dezenfektanın (Malahit Yeşili) Subletal Dozlarının Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Kan Parametreleri Üzerine Etkileri, *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23(3), 177-187.
- 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., Austin, D. A., 2012, *Lactococcus garvieae* (= *Enterococcus seriolicida*), Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish Fifth Edition. In: Austin, B., Austin (Eds.), D. A. London: Syringer, ISBN 978-94-007-4883-5, 38-42.
- Avcı, H., Aydoğan, A., Tanrikul, T.T., Birincioğlu, S., 2010, Pathological and Microbiological Investigations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) Naturally Infected With *Lactococcus garvieae*, *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University*, 16, 313-318.
- Avcı, H., Birincioğlu, S.S., Tanrikul, T.T., Epikmen, E.T., Metin, N., Avsever, M.L., 2014, Experimental *Lactococcus garvieae* Infection In Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792: A Comparative Histopathological And Immunohistochemical Study, *Journal of Fish Diseases*, 37(5), 481-495.
- Avsever, M., Tanrikul, T. T., Gürsoy, D., Metin, S., Akşit, H., Tunalıgil, S., 2014, Investigation of Certain Blood Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Naturally Infected With *Lactococcus garvieae*, *Journal of Fisheries Sciences.com*, 8(2), 114-120.
- Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K., Park, S.C., 2006, Isolation and Characterization of *Streptococcus* sp. From Diseased Flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island, *Journal of Veterinary Science*, 7(1), 53–58.
- Bark, S., McGregor, D., 2001, The First Occurrence of Lactococcosis In Farmed Trout In England. Trout News. Editörler: Lincoln, D., Glasscock, D. Suffolk: The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), 9-11.
- Barnabe, G., 1990, Fish Rearing, part 4: Rearing Bass and Gilthead Bream. Aquaculture, Ellis Horwood, ISBN: 0-13-044199-6.
- Barnes, A. C., Ellis, E. A., 2004, Role of Capsule In Serotypic Differences And Complement Fixation By *Lactococcus garvieae*, *Fish & Shellfish Immunology*, 16, 207–214.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973, Routine Haematological Methods for Use with Fish Blood, *Journal of Fish Biology*, 5, 771-781.
- BSGM (Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü), *Su Ürünleri İstatistikleri*, <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf>, [Ziyaret Tarihi: 28.03.2016].

- Buller, N. B., 2004, *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals A Practical Identification Manual (1. Baskı)*, CABI, London, ISBN 0 85199 738 4.
- Bullis, R.A., 1993, *Clinical Pathology of Temperate Freshwater And Estuarine Fisheries*, Fish Medicine, In: Stoskopf, K.M., Saunders, W.B. (Eds.), Company, London And Toronto.
- Bullock, A. M., 1989, *Laboratory Methods*. In: Fish Pathology Second Edition, Roberts, R. J. (Ed.), Bailliere Tindall, London.
- Carson, J., Gudkovs, 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.
- Chen, S., Lin, Y., Liaw, L., Wang, P., 2001, *Lactococcus garvieae* Infection In The Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* Confirmed By Polymerase Chain Reaction And 16S rDNA Sequencing, *Diseases of Aquatic Organisms*, 45, 45–52.
- Chen, S.C., Liaw, L.L., Su, H.Y., Ko, S.C., Wu, C.Y., Chung, 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, *Journal of Fish Diseases*, 25, 727–732.
- Ciesla, B., 2011, *Hematology in Practice (Second Edition)*, Davisplus, Philadelphia.
- 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.
- Çağırğan, H., 2004, Biotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated From Turkey, *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21(3-4), 267 – 269.
- Del Pozo, J., 2005, Studies On Monoclonal Antibodies Characterization And Immunohistochemical Detection of *Lactococcus garvieae*, Aquaculture e-Theses, Institute of Aquaculture University of Stirling.
- De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., 2009, The Firmicutes, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three*, (Ed.) Aidan C. Parte, Springer Dordrecht Heidelberg, London New York, ISBN: 978-0-387-95041-9.
- Didinen, B.I., Yardımcı, B., Onuk, E.E., Metin, S., Yıldırım, P., 2014, Naturally *Lactococcus garvieae* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): New Histopathological Observations, Phenotypic and Molecular Identification, *Revue de Médecine Vétérinaire*, 165(1-2), 12-19.
- Diler, Ö., Altun, S., Adiloğlu, A., Kubilay, A., Isıklı, B., 2002, First Occurance of Streptococcosis Affecting Farmed Rainbow Trout In Turkey, *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 22(1), 21-26.

- 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., Asanta, L., Bvozzetz, E., Gorla, M., 1996, *Enterococcus seriolicida* Is A Junior Synonym of *L. garvieae*, A Causative Agent of Septicemia And Meningoencephalitis In Fish, *Current Microbiology*, 32, 85–88.
- Eldar, A., Gorla, 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*, 65(3), 1005-1008.
- 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* (Spix & Agassiz), *Journal of Fish Diseases*, 32, 943–951.
- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D., Chilmonczyk, S., Eldar, A., 2004, Clonality And Diversity of The Fish Pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean Countries, *Applied And Environmental Microbiology*, 70(9), 5132–5137.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Species Fact Sheets, http://www.fao.org/fi/common/format/popUpImage.jsp?xp_imageid=720065&xp_showpos=1, [Ziyaret Tarihi: 23.09.2016].
- Ghittino, C., Prearo, M., 1992, Report of Streptococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy, *Bollettino Societa Italiana di Patologia Ittica*, 8, 4–11.
- Hoshina, T., Sano, T., Morimoto, J., 1958, A Streptococcus Pathogenic To Fish, *Journal of The Tokyo University of Fisheries*, 44, 57-68.
- Jagtap, A.R., Mali, R.P., 2012, Alterations in the Erythrocyte Sedimentation Rate of Fresh Water Fish, *Channa punctatus* On Exposure To Temperature Stree From Godavari River, Nanded, *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 3(12), 870-873.
- Kang, S., Shin, G., Shin, Y., Palaksha, K.J., Kim, Y., Yang, H., Lee, E., Lee, E., Huh, N., Ju, O., Jung, T., 2004, Experimental Evaluation of Pathogenicity of *Lactococcus garvieae* In Black Rockfish (*Sebastes schlegeli*), *Journal of Veterinary Science*, 5(4), 387–390.
- Kav, K., 2005, Gökkuşığı Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) Streptokokkozis (*Lactococcus garvieae*) Hastalığına Karşı Aşı Çalışmaları, Doktora, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji (VET) Anabilim Dalı.

- Kobayashi, T., Ishitaka, Y., Imai, M., Kawaguchi, Y., 2004, Pathological Studies on *Lactococcus garvieae* Infection of Cultured Rockfish *schlegeli*, *Aquaculture Science*, 52 (4), 359-364.
- Kubilay, A., 1997, Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Patojen Bakteri *Yersinia ruckeri*' ye Karşı Antikor Üretimi ve Tespiti Üzerinde Bir Çalışma, Doktora, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G., Diler, Ö., 2005, *Lactococcus garvieae* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi, *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 1(1), 39-48.
- Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G., Ekici, S., Diler, Ö., 2008, Immunization of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Against *Lactococcus garvieae* Using Vaccine Mixtures, *The Israeli Journal of Aquaculture (Bamidgeh)*, 60(4), 268-273.
- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R., Fryer, J.L., 1991, *Enterococcus seriolicida* sp. Nov. A Fish Pathogen, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 406-409.
- Larson, A., Johansson, M., Fange, R., 1976, Comparative Study of Some Haematological And Biochemical Blood Parameters in Fishes from the Skagerrak, *Journal of Fish Biology*, 9, 425-440.
- MacPhee, D.D., Ostland, V.E., Lumsden, J.S., Ferguson, H.W., 1995, Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to estimate the quantity of *Flavobacterium branchiophilum* on the gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 21: 13-23.
- Mater, S., Uçal, O., Kaya, M., 1989, Türkiye Deniz Balıkları Atlası, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, 123, 94.
- Memiş, D., 2010, *Deniz Balıkları Yetiştiriciliği*, Filiz Kitabevi, İstanbul, ISBN: 978-975-368-328-9.
- Ooyama, T., Hirokawa, Y., Minami, T., Yasuda, H., Nakai, T., Endo, M., Ruangpan, L., Yoshida, T., 2002, Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 51, 169-177.
- Özer, S., Bulduklu, S., Dönmez, E., 2008, Streptococcus Occurrence At Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Cultivated in Province Mersin-Turkey, *Journal of Fisheries Sciences.com*, 2(3), 272-283.
- Pasnik, D.J., Evans, J.J., Klesius, P.H., 2006, Passive Immunization of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Provides Significant Protection Against *Streptococcus agalactiae*, *Fish & Shellfish Immunology*, 21, 365- 371.

- Pot, B., Devriese, L.A., Ursi, D., Vandamme, P., Haesebrouck, F., Kersters, K., 1996, Phenotypic Identification and Differentiation of Lactococcus Strains Isolated from Animals, *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 213–222.
- Prieta, J., Domenech, A. M., Fernandez Grayzabal, J. F., Collins, M. D., Rodrigues, U. M., Jones, D., Rodriguez, A., Dominguez, L., 1993, Lactococciosis de la Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*), *Medical and Veterinary*, 10 (6), 367-373.
- 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*, 41(2), 751-756.
- Roberts, R.J., 1978, *Fish Pathology*, Bailliere-Tindall, London.
- Roberts, R.J., 2012, *Fish Pathology Fourth Edition* (4. Baskı), Wiley-Blackwell, Scotland.
- Roberson, B.S., 1993, Bacterial Agglutination, *Techniques in Fish Immunology*, 2nd Edition, In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., van Muiswinkel, W.B. (Eds), SOS Publications, USA.
- Salati, F., Tassi, P., Bronzi, P., 1996, Isolation of Enterococcus-like Bacterium From Diseased Adriatic Sturgeon *Acipenser naccarii*, Farmed Italy, *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 16(3), 96-99.
- Salati, F., 2011, *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus* spp. (*S. iniae*, *S. agalactiae* and *S. dysgalactiae*), *Fish Diseases and Disorders*, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd Edition. In: Woo, P. T. K, Bruno, D. W. (Eds), Chapter 10, CABI, London, ISBN-13: 978 1 84593 554 2, 375-396.
- Savvidis, G.K., Anatoliotis, C., Kanaki, Z., Vafeas, G., 2007, Epizootic Outbreak of Lactococcosis Disease In Rainbow Trout Culture in Greece, *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 27(6), 223.
- Schill, W.B., Bullock, G.L., Anderson, D.P., 1989, Serology, *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*, In: Austin, B., Austin, D.A. (Eds.), Ellis Horwood, Chichester, 98-140.
- Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Tabatabaei, M., Mostafavi Zadeh, S.M., 2010, Isolation and Characterization of Lactococcus garvieae From Diseased Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Cultured In Iran, *Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University*, 11(4), 342-350.
- Shelby, R.A., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A., Evans, J.J., 2002(a), Passive Immunization of Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), With Anti- *Streptococcus iniae* Whole Sera, *Journal of Fish Diseases*, 25, 1-6.
- Shelby, R.A., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., 2002(b), Detection of Humoral Response To *Streptococcus iniae* Infection of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, by a

- Monoclonal Antibody-Based ELISA, *Journal of Applied Aquaculture*, 12(3), 23-31.
- Shelby, R.A., Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., 2004, Development of an ELISA to measure the humoral immune response of hybrid striped bass *Morone chrysops* and *M. saxatilis* to *Streptococcus iniae*, *Aquaculture Research*, 35, 997-1001.
- Soltani, M., Nikbakht, G., Mousavi, H.A.E., Ahmadzadeh, N., 2008, Epizootic Outbreaks of Lactococcosis Caused By *Lactococcus garvieae* In Rainbow Trout In Iran, *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 28(5), 207.
- Tanrikul, T.T., Gültepe, N., 2011, Mix Infections In Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): *Lactococcus garvieae* And *Vibrio anguillarum* O1, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(8), 1019-1023.
- Theml, H., Diem, H., Haferlach, T., 2004, *Color of Atlas Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis 2nd Revised Edition*, Thieme, Stuttgart, New York, ISBN: 3-13-673102-6 (Stuttgart), ISBN: 1-58890-193-9 (New York).
- Timur, G., Akaylı, T., 2003, First Study of Staphylococcosis In Farmed Rainbow Trout, *International Symposium of Fisheries and Zoology (in memory of Ord. Prof. Dr. Curt KOSSWIG in His 100th Birth Anniversary)* Istanbul University Fisheries and Zoology Faculty, 67-79.
- Timur, G., Timur, M., 2003, *Balık Hastalıkları (1. Baskı)*, İstanbul Üniversitesi Rektörlük Yayınları, İstanbul.
- Timur, G., Yardımcı, R.E., Ürkü, Ç., Çanak, Ö., 2011, Marmara Bölgesi Kültür Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, L.) Lactococcosis'in Bakteriyojik ve Histopatolojik Metodlarla Teşhisi, *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 26, 63-81.
- 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.
- Türe, M., Işdan, H., Savaş, H., Kutlu, I., 2014, PFGE Metodu Kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin Genetik Çeşitliliğinin ve Yayılımının Belirlenmesi, *TAGEM/HS/10/09/02/179.61*.
- Uçal, O., Benli, H.A., 1993, *Levrek Balığı ve Yetiştiriciliği*, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bodrum, Seri A, Yayın No:9.
- Ürkü, Ç., 2011, Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, W.) Deneysel Olarak Oluşturulan Lactococcosis' in Bakteriyojik ve Serolojik Metodlarla Teşhisi, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Varvarigos, P., 2001, Gram positive coccobacteria (Micrococcaceae, Streptococcaceae) causing systemic disease in intensively farmed fish, Brief review,

http://www.vetcare.gr/ARTPRES/Gram_positive_cocci.htm, [Ziyaret Tarihi: 29.03.2016].

- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.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*, 38(10), 3791-3795.
- Vendrell, D., Balcázar, J., Zarzuela, I., Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J., 2006, *Lactococcus garvieae* in Fish: A Review, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 29, 177–198.
- Vendrell, D., Balcazar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., Blas, I., Girones, O., Muzquiz, J.L., 2007, Safety And Efficacy of an Inactivated Vaccine Against *Lactococcus garvieae* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Preventive Veterinary Medicine*, 80, 222-229.
- Williams, A.M., Fryer, J.L., Collins, M.D., 1990, *Lactococcus piscium* sp. Nov. A New *Lactococcus* Species from Salmonid Fish, *FEMS Microbiology Letters*, 68(1-2), 109-113.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C., Bercovier, H., 1998, Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 983-985.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Sena Zeynep GÖKEN
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	08.01.1990
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05446645415
E-Posta Adresi	gmsckc@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Su Ürünleri Fakültesi
Bölümü	Su Ürünleri
Mezuniyet Yılı	25.06.2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı
Programı	Hastalıklar Programı
Mezuniyet Tarihi	20.09.2016

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı
Programı	Program Adı
Mezuniyet Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.

Makale ve Bildiriler	
Akaylı, T., Göken, S.Z., Sönmez, E., 2015, Levrek Balıklarında (<i>Dicentrarchus labrax</i>) Kış Döneminde Görülen Karma Enfeksiyonun Teşhisi, 18. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, İzmir, Poster Bildirisi.	