

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Azime KÜÇÜKGÜL**

**DOKTORA TEZİ**

**TİLAPİA (*Oreochromis niloticus*)'LARDA *Streptococcus iniae*  
İNFEKSİYONUNDAN SONRA GELİŞEN AKUT FAZ PROTEİN  
(APP)'LERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2008**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**Azime KÜÇÜKGÜL**

**TİLAPİA (*Oreochromis niloticus*)'LARDA *Streptococcus iniae*  
İNFEKSİYONUNDAN SONRA GELİŞEN AKUT FAZ PROTEİN  
(APP)'LERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2008**

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	10
2.1. Balıklarda <i>S. iniae</i> ve Akut Faz Proteinleri Çalışmaları .....	10
2.2. Bazı Omurgalılarda <i>S. iniae</i> ve Akut Faz Proteinleri Çalışmaları.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Balık materyali.....	22
3.1.2. Uygulama havuzları ve örnekleme zamanları.....	23
3.1.3. Uygulamada kullanılan bakteri ( <i>S. iniae</i> ATCC-29178).....	26
3.1.4. Stres uygulaması.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. <i>Streptococcus iniae</i> ' nin balıklara uygulanması.....	27
3.2.2. Makroskobik ve mikroskobik muayene.....	28
3.2.3. <i>S. iniae</i> ' nin API yöntemiyle identifikasyonu.....	30
3.2.4. Kanın biyokimyasal analizleri.....	30
3.2.4.1. Plazma Analizleri.....	30
3.2.4.2. İstatistik Analizler.....	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Bulgular.....	33
4.1.1. Makroskobik ve mikroskobik muayene .....	34
4.1.2. Enfekte balıklarından izole edilen <i>Streptococcus</i> <i>iniae</i> ' nin fenotipik karakterleri.....	36
4.1.3. Enfekte balıkların biyokimyasal karakterleri.....	38
4.1.3.1. API testi.....	38

4.1.4. Uygulama sonundaki verilerinin plazma değerleri.....	41
4.1.4.1. C-reaktif protein (CRP).....	41
4.1.4.2. Serum amiloid A (SAA).....	42
4.1.4.3. Transferin (Tf).....	43
4.1.4.4. Fibrinojen (Fb).....	44
4.2 Tartışma.....	46
4.2.1. Deneysel oluşturulan <i>Streptococcus iniae</i> enfeksiyonu.....	46
4.2.2. Deney gruplarında izlenen akut faz yanıtları.....	50
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	74

## ÖZ

### DOKTORA TEZİ

# TİLAPİA (*Oreochromis niloticus*)'LARDA *Streptococcus iniae* İNFEKSİYONUNDAN SONRA GELİŞEN AKUT FAZ PROTEİN (APP)'LERİNİN ARAŞTIRILMASI

Azime KÜÇÜKGÜL

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİMDALI

**Danışman** : Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER

**Yıl** : 2008, **Sayfa**:74

**Jüri** : Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER  
Prof. Dr. Necdet AYTAÇ  
Doç. Dr. Ercüment GENÇ  
Yrd. Doç. Dr. Aysel ŞAHAN  
Yrd. Doç. Dr. Erdem DÖNMEZ

Bu araştırmada, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) *Streptococcus iniae* (ATCC 29178) ile deneysel yolla enfekte edilmiş, kan plazmasındaki bazı akut faz proteinleri incelenmiştir. Çalışmada ortalama 60,35±1,04 g canlı ağırlığında 72 adet tilapia kullanılmıştır. Balıklardan 3.3 x 10<sup>5</sup> kob/ml içeren *Streptococcus iniae* intraperitonel (i.p.) olarak 0,1 ml dozunda enjekte edilerek enfekte grup oluşturulmuştur. Aynı sayıda *S. iniae* enjekte edilen balık gruplarına akut bir stres faktörünün ilavesi ile diğer deney grubu oluşturulmuştur. Son grup deney balıkları kontrol grubu olarak incelenip en uygun koşullar altında tutulmuştur. Enfekte ve kontrol grubu balıkların kuyruk venasından alınan kan örnekleri, enfeksiyonun 7, 14 ve 21. günlerinde bazı akut faz proteinleri (APP) [C-reaktif protein (CRP), fibrinojen (fb), serum amiloid A (SAA) ve transferrin (tf)] yönünden incelenmiştir. Çalışmamızda, enfekte gruplarda 1–2 gün içinde renk koyulaşması, balık hareketlerinde düzensizlik ve yavaşlama görülmüştür. Ölçülen akut faz proteinlerinden yalnızca fibrinojen seviyelerinde düşüşler saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Tilapia, C-reaktif protein, Serum amiloid A, Fibrinojen, Transferrin

## ABSTRACT

## PhD THESIS

### RESEARCH OF ACUTE PHASE PROTEINS FOLLOWED AFTER *Streptococcus iniae* - INFECTED IN TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

Azime KÜÇÜKGÜL

DEPARTMENT OF FISHERIES  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

**Supervisor** : Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER

**Year** : 2008, **Pages**: 74

**Jurry** : Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER  
Prof. Dr. Necdet AYTAÇ  
Assos. Dr. Ercüment GENÇ  
Assist. Prof. Dr. Aysel ŞAHAN  
Assist. Prof. Dr. Erdem DÖNMEZ

*Streptococcus iniae* is an important bacterial pathogen of fish, causing up to 50% mortality in stocks, which has recently been associated with human infections. The aim of the present study to assess C-reactive protein, fibrinogen, serum amyloid A and transferrin responses to *Streptococcus iniae* (ATCC 29178) in plasma of tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) following intraperitoneal (i.p.) injection. Two experiment groups, including *S.iniae*-infected (st group) and *S.iniae*-infected with handling stress (st-hd group), with a group of nonstressed control (cntrl) fish, were examined in this study. Blood samples were collected 7th , 14th and 21st days after the experiment. In our study, darken skin, slowdown and confusion in fish motions in infected groups within 1-2 days. Only fibrinogen levels from measured acute phase proteins has been reported to decrease.

**Key Words:** Tilapia, C-reactive protein, Serum amyloid A, Fibrinogen, Transferrin

## **TEŞEKKÜR**

Doktora öğrenimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, her konuda yardım ve hoşgörüsü ile destek olan, eğitimimde büyük katkısı bulunan sayın danışman hocam Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER'e;

Her konuda yardımlarını gördüğüm değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Aysel ŞAHAN ve Doç. Dr. Fatih ÖZOĞUL'a;

Laboratuar çalışmalarımız sırasındaki dostluk ve yardımlarına minnettar olduğum Devlet Su İşleri Baş Mühendisi Yusuf SAĞAT ve Yrd. Doç. Dr. Fatmagün SARIHAN'a;

İlgili ve nazik yaklaşımlarıyla Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarı şefi Hatice ÖZÇÜRÜMEZ'e ve laboratuar personeline, ayrıca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a;

Eğitimim ve tezimin gerçekleşmesinde her daim yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen değerli aileme teşekkürü bir borç biliyorum.

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 3.1. Uygulama düzeneği.....	24
Çizelge 4.1. Havuzlardan elde edilen ortalama pH, çözülmüş oksijen ve sıcaklık değerleri.....	33
Çizelge 4.2. Uygulama boyunca balıklarda görülen ölüm yüzdesi.....	33
Çizelge 4.3. İzole edilen <i>Streptococcus</i> suşunun fenotipik karakterleri.....	37
Çizelge 4.4. İzole edilen <i>Streptococcus iniae</i> türünün tam otomatize Rapid ID32 Strep sistemi-mini API identifikasyon sistemi ile yapılan biyokimyasal özellikleri.....	40
Çizelge 4.5. Tilapialarda iki grubun karşılaştırmalı sonuçları.....	41

Şekil 1.1.	Akut inflamasyon sonucunda ortaya çıkan bazı akut faz reaktantları (Saunders, W. B., 2003).....	2
Şekil 1.2.	Enfeksiyon sonrası zamana bağlı akut faz protein değişimleri (Gershov ve ark., 2000).....	4
Şekil 1.3.	C-Reaktif Protein'in opsonizasyondaki rolü (Gershov ve ark., 2000).....	5
Şekil 3.1.	Denemede kullanılan tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> L. 1758) (orijinal).....	23
Şekil 3.2.	Denemede kullanılan havuzlar (1).....	25
Şekil 3.3.	Denemede kullanılan havuzlar (2).....	25
Şekil 3.4.	Gram pozitif kok ayırıcı tanısı (Bilgehan, H., 1995).....	29
Şekil 4.1.	Deneysel enfeksiyon sonucu tilapiada organlarda izlenen şişkinlikler ve inflamasyonik oluşumlar (orijinal).....	34
Şekil 4.2.	Deneysel enfeksiyon sonrası tilapialarda gözlenen kanlı sıvı birikimi ve şişmiş dalak.....	35
Şekil 4.3.	Deneysel enfeksiyon sonrası tilapia kuyruk bölgesi lezyonları (orijinal).....	35
Şekil 4.4.	Deneysel enfeksiyon sonrası tilapia deri lezyonları (hiperemi) (orijinal).....	36
Şekil 4.5.	BHIA'a yapılan ekim sonucu kolonilerden alınan örneklerin ışık mikroskobu altındaki görünümü (orijinal).....	39
Şekil 4.6.	BHIA üzerinde <i>Streptococcus iniae</i> kolonilerinin görünümü (orijinal).....	39
Şekil 4.7.	<i>S. iniae</i> ile enfekte ve stres içerikli (elle muamele) <i>S. iniae</i> ile enfekte grupları içeren tilapialarda C-reaktif protein (CRP) seviyelerindeki değişimler.....	42
Şekil 4.8.	<i>S. iniae</i> ile enfekte ve stres içerikli (elle muamele) <i>S. iniae</i> ile enfekte grupları içeren tilapialarda serum amiloid A (SAA) seviyelerindeki değişimler.....	43

Şekil 4.9.	<i>S. iniae</i> ile enfekte ve stres içerikli (elle muamele) <i>S. iniae</i> ile enfekte grupları içeren tilapialarda transferin seviyelerindeki değişimler.....	44
Şekil 4.10.	<i>S. iniae</i> ile enfekte ve stres içerikli (elle muamele) <i>S. iniae</i> ile enfekte grupları içeren tilapialarda transferin seviyelerindeki değişimler.....	45

## 1. GİRİŞ

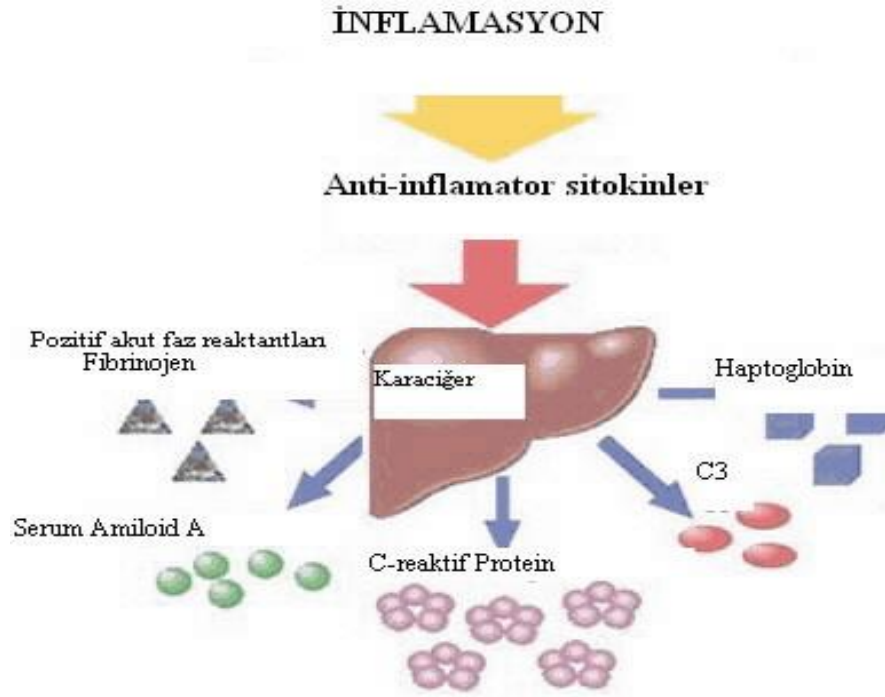
Ülkemizde son yıllarda gelişme gösteren kültür balıkçılığında umut verici ilerlemeler gözlenmektedir. Tatlı sularda alabalık, denizlerde ise çipura ve levrek üretimi yapan işletmeler hızla artmaktadır. Ancak, bir yandan üretim artarken bir yandan da çıkan sorunların aşılması için verilen mücadele ve özellikle bu sorunların başında yer alan hastalıklar, sektör için gelişmeyi kısıtlayıcı bir etken olarak ortaya çıkmaktadır.

Özellikle bakteriyel balık hastalıkları doğal ortam ve kültür ortamlarında yüksek oranlarda ölümlere neden olmaktadır. Balıklarda enfeksiyonlara neden olan bakterilerin çoğu fırsatçı patojen olup kirlilik, sıcaklık ve nakil gibi uygun olmayan çevre şartlarının yaratmış olduğu strese bağlı olarak aktifleşmektedir (Post, 1987; Andrews ve ark., 1988; Reddacliff, 1988; Noga, 2000; Güvener, 2001; Alderson, 2003).

Balıkların yoğun olarak kültüre alındığı intensif yetiştiricilik şartlarında hastalıklar sıklıkla görülmeye başlamıştır. Balık hastalıkları konusunda son yıllarda yapılan çalışmalar, mikroorganizmaların işletmeye girmeden önlem alınmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle gerekli koruyucu önlemler alınmalı, etkin ve devamlı bir şekilde uygulanmalıdır. Koruyucu önlemler arasında balıkların immünizasyonla korunması (aşılama: vaksınasyon) önem taşımaktadır. Balık hastalıklarına karşı aşı kullanımı Avrupa'da özellikle gökkuşuğu alabalığı ve salmon yetiştiriciliğinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir.

Balıklarda gelişen enfeksiyöz hastalıklarda ortaya çıkan reaksiyonlardan bir tanesinde inflamasyon (yangı)'dur. Canlıda inflamasyon ve doku hasarı görüldüğünde yanıt olarak değişen plazma proteinleri akut faz proteinleri (AFP) ya da akut faz reaktantları olarak bilinmektedir (Eckersall ve Conner, 1988; Baumann ve Gauldie, 1990; Whicher ve Westacott, 1992). Akut inflamasyonda, nötrofil sayısında artma ve sedimentasyon hızında yükselme gibi semptomlar tipik olmakla birlikte bu durum 'akut faz yanıtı' olarak tanımlanmıştır. Akut faz yanıtını oluşturan interlökin I (IL-1) ve tümör nekroz eden faktör (TNF) gibi mediatör maddeler, kanda aktive olan monositlerde ve çeşitli organlardaki makrofajlarda sentez edilir ve salınır (Dinarelo,

1984; Beutler ve Cerami, 1986; Heinrich ve ark., 1990; Waage ve ark., 1992). IL-1 ve TNF gibi maddeler, immün yanıtın şekillenmesi için bazı reaksiyonları tetiklerler ve sonuçta plazma akut faz reaktantları olarak bilinen proteinlerden bazılarının düzeyi artar, bazılarının ise azalır. Akut faz yanıtı sonucu olarak plazmada düzeyleri azalan proteinlere 'negatif akut faz reaktantları' denir. Bunların başlıcaları, prealbümin, albümin ve transferrindir (Kushner ve Mackiewicz, 1987; Thompson ve ark., 1992; Gruys ve ark., 1993, Gruys ve ark., 1994; Ingenbleekand ve Young, 1994).



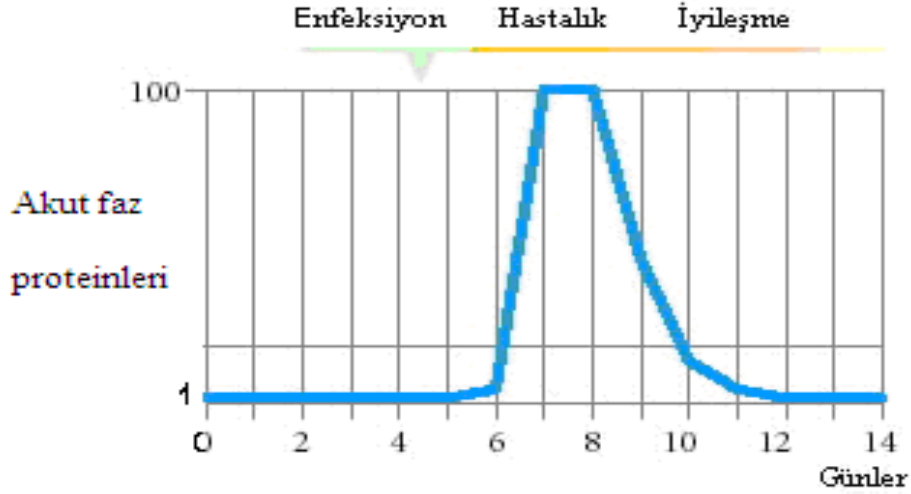
Şekil 1.1. Akut inflamasyon sonucunda ortaya çıkan bazı akut faz reaktantları (Saunders, 2003)

Akut faz yanıtı sonucu plazmada düzeyleri artan proteinler ise 'pozitif akut faz reaktantları' olarak adlandırılmaktadır. Bunların başlıcaları ise; C-reaktif protein (CRP),  $\alpha$ 1-antikimotripsin,  $\alpha$ 1-asit glikoprotein,  $\alpha$ 1-antitripsin, haptoglobin, C4 (kompleman 4), C3 (kompleman 3), fibrinojen ve seruloplazmindir (Kushner ve ark.,

1981., Dowton ve Colten, 1988; McGuire ve ark., 1996; Lannergard ve ark., 2003). Doku hasarına bağlı olarak ortaya çıkan inflamasyon sürecindeki farklı sistemik ve lokal olayların tanımlanmasında kullanılan akut faz cevabı; organizmayı koruyucu, inflamasyonu tetikleyici, yabancı organizmaları uzaklaştırıcı ve doku tamir edici birçok olaylarda rol oynayan önemli bir oluşumdur. Bunlar enfeksiyon, immünolojik olaylar, travmalar, doku nekrozları gibi durumlarda plazmada seviyesi değişen proteinlerdir (Gordon ve Koy, 1985; Gruys ve ark., 1999). Bu proteinler doku makrofajlarından salınan sitokinlerin etkisiyle karaciğerde sentezlenmekte, ayrıca nonspesifik olarak inflamasyonun varlığını ve şiddetini yansıtmaktadırlar (Adler ve Denton, 1975; Ganrtner ve Hiatt, 1997) (Şekil 1.1.).

Akut faz reaktanları, inflamasyon devam ettiği süre zarfında sürekli sentezlenirler. Uyarılara karşı duyarlılıkları, sentez hızları, serum konsantrasyonları, molekül büyüklükleri ve katabolizmaları farklılıklar gösterebilmektedir (Alsemgeest, 1994; Alsemgeest ve ark., 1994).

Akut seyirde akut faz proteinlerinin serum düzeylerindeki artışlar genellikle inflamasyonun şiddeti ve dağılımı ile paralellik gösterirken; kronik seyirde sentezlerindeki baskılanma veya tüketimlerindeki artış sonucu tam olarak şekillenmezler (Şekil 1.2.). Konak savunmasında fagositoz üzerine pozitif etki gösterirler, inflamatuvar hücrelerden proteaz salınımını ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu inhibe ederek doku hasarını sınırlar, hasar gören dokuların onarımında rol alırlar (Ihsak ve Hassan, 1989; Yenen, 1990; Pincus ve Abraham, 2001).



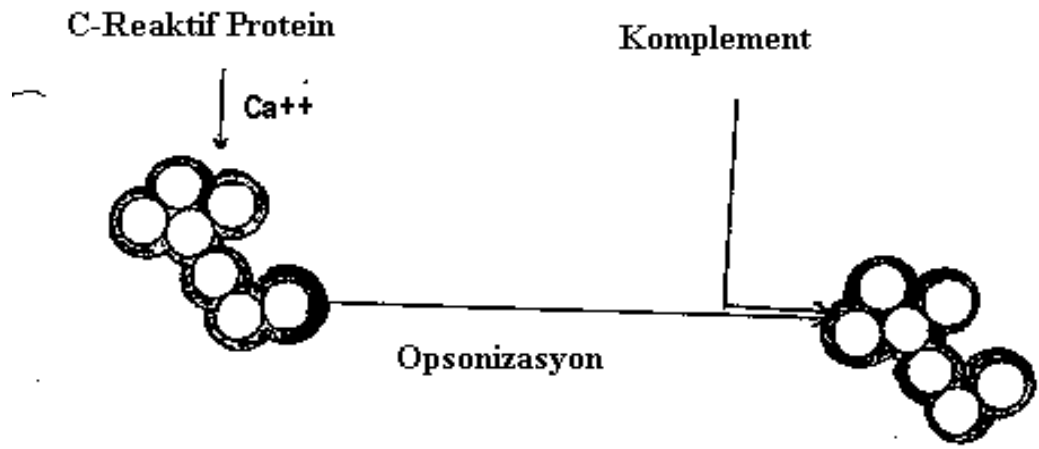
Şekil 1.2. Enfeksiyon sonrası zamana bağlı akut faz protein değişimleri (Gershov ve ark., 2000).

Balığın non-spesifik savunma mekanizmasında yer alan CRP, herhangi bir bakteri ile enfeksiyon sonucu en hızlı artan akut faz proteindir. CRP; ilk kez Tillet ve Francis tarafından tanımlanmış ve pnömokok-C polisakariti ile presipite olabildiğinden dolayı 'C-presipitin' adını almıştır. Önceleri antikor olarak düşünülen bu protein, değişik inflamatuvar durumlarda dolaşıma verilen bir protein olduğunun saptanması ve C polisakariti ile reaksiyon verme özelliğinden yola çıkılarak 'CRP' olarak adlandırılmış ve 1941 yılında MacLeod ve Avery tarafından saf olarak izole edilmiştir. İnflamasyonun çok spesifik ve duyarlı bir indikatör olduğu tespit edilmiştir. Hepatositlerde uyarıya bağlı olarak sentezlendiği ve salındığı için ilk uyarımdan 6–10 saat sonra yeni sentezlenen CRP kanda görülmeye başlar ve 48 saatte en yüksek seviyeye ulaşır. Kısa bir zaman diliminde normal değerlerine döner.

Akut faz yanıtın büyüklüğü ile üyelerinin miktarındaki artış genellikle doğru orantılıdır. Ancak bunu etkileyen çeşitli faktörler olabilir (Ihsak ve Hassan, 1989;

Yenen, 1990; Pincus ve Abraham, 2001). CRP klasik akut faz proteini olup dolaşıma bir kez verildikten sonra immün yanıtı katılır, hasara uğramış hücre duvarı ile CRP-ligand komplekslerini oluşturur. Bu kompleks belirli komplement üyelerinin

aktivasyonuna yol açarak fagositik hücreleri uyarır, böylece immün cevap kuvvetlenir. İnflamasyonun şekillendiği durumlarda genellikle çok yüksek seviyelere ulaşır, hatta 1000 kat kadar artabilir. CRP, komplement sistemi aktive eden ya da fagositoza yardımcı olmak için bir opsonin faktör gibi davranıp, böylece enfeksiyon (bakteri) oluşumuna izin vermez (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. C-Reaktif Protein'in opsonizasyondaki rolü (Gershov ve ark., 2000).

Enfeksiyonda plazma fibrinojen düzeyi genellikle artar. Hem deneysel hayvan modellerinde hemde insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda RDS (solunum güçlüğü sendromu), DİC (yaygın intravasküler koagülopati) ve kan transfüzyonu (kan değişimi) gibi durumlarda enfeksiyon olsa bile fibrinojen seviyelerinin düştüğü gözlenmiştir (Bone ve ark., 1989; Bone, 1991; Bone, 1992; Yan ve ark., 2001). Fibrinojen yüksekliği ESR (eritrosit sedimentasyon rotası)'yi de etkiler. Enfekte ve normal bireylerdeki değerlerin sıklıkla birbirine yakın bulunması nedeniyle fibrinojenin sepsis (enfeksiyona karşı konağın sistemik yanıtı) tanısındaki yeri sınırlıdır (Bodur ve ark., 2006).

Laboratuvar bulgularının ve non-spesifik klinik belirtilerin herhangi bir enfeksiyonun erken evrede ortaya konulmasında yetersiz olduğu durumlarda bu amaca hizmet etmek üzere daha duyarlı ve spesifik laboratuvar testlerine ihtiyacı duyulmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda giderek artan yoğunlukta Serum Amiloid A (SAA) proteini incelenmeye başlanmıştır. Memelilerde olduğu gibi balıklarda da inflamasyonda ortaya çıkan SAA, majör bir akut faz proteindir ve yapıcı doku amiloid grubunda bulunan amiloid A proteini ile ilişkilidir (Uhlar ve Whitehead, 1999). SAA plazmada lipoproteinlerin yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) yapısında bulunan bir apolipoproteindir (Malle ve ark., 1993; Jensen ve Whitehead 1998). SAA'nın genetik ve biyokimyasal yapısı hakkında yeterince bilgiye sahip olursa da görevleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak bazı sitokinlerin pirojenik etkisini, nötrofillerin oksidatif solunumunu ve trombosit aktivitesini azalttığı, antikor üretimini baskıladığı bildirilmektedir (Benson ve Aldo-Benson, 1979; Shainkin-Kestenbaum ve ark., 1990; Zimlichman ve ark., 1990).

Tilapia türleri; dünyanın birçok ülkesinde, tropik ve subtropik iklim kuşaklarında, özellikle de Doğu Afrika, Ortadoğu ve Uzakdoğu ülkelerinde sazandan sonra yetiştiriciliği en fazla yapılan, sıcak iklim balıklarının en değerli olanlarından Cichlid familyasının üyeleridir. Tilapia türleri ülkemiz doğal sularında bulunmamakla birlikte, yetiştirme çalışmalarına yaklaşık olarak 30 yıl önce başlanmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Tilapia'nın çok kirli çevrelere uyum gösterebilmesi hatta hayvan gübresi ve lağım çamuru ile beslenebilmesi bu balığın yetiştiriciliğini ve yetiştirme koşullarında çevre isteklerini daha da önemli kılmaktadır (Wong, 1989). Ayrıca dünya nüfusunun hızla artması, ucuz protein kaynağına olan ihtiyacı giderek arttırmakta ve tilapia üretiminin yaygınlaştırılmasını zorunlu hale getirmektedir (Ogunji, 2004).

Tilapialar, uygun yetiştiricilik koşullarına rağmen, streptokokus familyasından *Streptococcus iniae* olarak bilinen bir patojen ile enfekte oldukları zaman, ağır kayıplara uğramaktadırlar (Bercovier ve ark., 1997). Bu patojen insanları da enfekte edebilen zoonoz bir patojendir (Boomker ve ark., 1979; Perara ve ark., 1994, 1997). *S. iniae* infeksiyonları, tilapia (*Oreochromis* sp.) (Pier ve Madin, 1976; Perara ve ark., 1994; Eldar ve ark., 1994, 1995a; Bowser ve ark., 1998; Press ve ark.,

1998)' ların yanısıra, salmon (*Onchorynchus mykiss*, *Onchorynchus kisutch*) (Eldar ve ark., 1995b) ve hibrid çizgili levrek (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) (Stoffregen ve ark., 1996; Perera ve ark., 1997)' lerde de bildirilmiştir.

İlk defa Amazon Nehri'nde yaşayan bir tür yunustan izole edilen *S. iniae*, hem deniz hemde tatlı su balıklarında hastalığa neden olan ve yetiştiricilik sistemlerinde devamlı olarak virulansını arttıran ayrıca üzerinde daha önce birçok araştırma yapılmış, önemli zoonotik bir balık patojenidir (Pier ve Madin, 1976; Kusuda, 1992; Perera ve ark., 1994; Austin ve Austin, 1999a). Streptokokkozis Japonya'da ilk olarak 1976 yılında kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir (Pier ve Madin, 1976). Bu yıllarda hastalık Japonya'da sarıkuyruk balıklarında da önemli ekonomik kayıplara yol açmıştır. Daha sonraki yıllarda yılan balıkları, ayu ve tilapialarda da enfeksiyon görülmeye başlanmıştır. Gözlerde şiddetli ekzoftalmusla seyrettiği için enfeksiyon "pop eye" hastalığı olarak da adlandırılmıştır. Hastalık bugün dünyanın birçok ülkesinde görülmektedir. Kontamine olmuş balık yemlerinden, zedelenmiş balık derisinden, deneysel yollarla balıklara bulaşabilen, tatlı sudan deniz suyuna kadar birçok türü etkileyen *Streptococcus iniae*, doğada da önemli salgınlara neden olan bir patojendir (Zlotkin ve ark., 1998).

Zoonotik hastalık, hayvanlardan insanlara geçebilen enfeksiyonlardır. Zoonotik hastalıklar dünyada önemli bir halk sağlığı problemidir. Enfekte balıklardan bulaşan zoonotik enfeksiyonların, balık üretici ve tüketicilerinde ciddi problemlere neden olduğu önceki çalışmada vurgulanmıştır.

Son zamanlarda balıklardan insanlara bulaşan zoonozların sayısında ve dolayısı ile literatür incelemelerinde bir artış olmuştur; bu durum balık zoonozlarının her geçen gün biraz daha önem kazandığının belirtisi olarak göze çarpmaktadır (Austin ve Austin, 1999b; Babu ve ark., 2002). İhtiyoz artışı, özellikle balık ve karides gibi akuatik canlıların yapay havuzlarda ve doğal su kaynaklarında kültüre alınmasının yaygınlaşması ile başlamıştır.

Balık zoonozları arasında önemli bir yere sahip olan *Streptococcus iniae*, 1995–1996 yıllarında Kanada'nın Toronto Bölgesi'nde Asya orjinli kadınlarda hastalığa sebep olmuştur (Centers for Disease Control and Prevention, 1996). Bu

patojen, balıklarda nörolojik semptomlara sebep olduğu için “mad fish disease” olarak bilinmektedir. Klinik olarak hasta tilapia balıklarının kadınlar tarafından alınması ve takiben pişirilmeye hazırlanması sırasında balıkla temas yoluyla geliştiği sanılmaktadır.

Balıklarda görülen Streptokokkozis enfeksiyonunun kültür ortamlarında %30-50 mortalite düzeyinin olduğu tespit edilmiştir (Kitao, 1993; Varvarigos, 2001; Eyngor ve ark., 2004). Bakterilerin hareketsiz, fakültatif anaerobik, gram pozitif koklar olduğu, 10–45 °C’de % 6,5 NaCl konsantrasyonu ve pH 4,5–9,6 gibi optimal koşullarda ürediği ve koloni oluşturacak büyüklüğe ulaştıkları saptanmıştır. İzolatların; Eosin Metilen Mavisi (EMB), Mac Conkey besiyerlerinde üreyemediği, TSA (Triptik Soy Agar), Nutrient Agar (NA), Beyin Kalp İnfüzyon Agar (BHIA), safra-eskulin besiyerlerinde ürediği ve kanlı agar (koyun kanı ilave edilmiş)’da ise  $\alpha$ -hemoliz oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu verilere göre, izole edilen suşların Streptococcacea familyasından non-hemolitik bir bakteri olduğu saptanmıştır (Kitao, 1993).

Hasta balıkların; karaciğer, böbrek, dalak ile beyinlerinden alınan doku materyallerinin TSA, Kanlı Agar (% 5 koyun kanı ilave edilmiş) besiyerlerine ekimleri yapılmış ve 25 °C’de 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir (Holt ve ark., 1994; Austin ve Austin, 1999b). TSA besiyerinde beyaz, küçük yuvarlak koloniler, kanlı agarda ise non-hemolitik 0,1–0,2 mm. çapında koloniler izole edilmiştir. İzolatların identifikasyonu için ayrıca, Rapid ID32 strep sistemi (Biomerieux, Marcy, I’Etoile, Fransa) ve lateks aglütinasyon testi kullanılabilmektedir (Koneman ve ark., 1997; Austin ve Austin, 1999b). Streptokokosis’i kontrol etmek çok zordur. Çünkü hastalık etkeni düşük su kalitesine maruz kaldıkları zaman ortaya çıkar. Streptokokosis’e karşı balığın aşılınmasıyla ilgili çok az çalışma vardır (Sakai ve ark., 1987).

Etken BHIA’da 30°C’de 24 saat inkübasyondan sonra 1mm çapında pigmentsiz koloniler oluşturur. Gram pozitif, ikili yada kısa zincir benzeri görünümünde (pleomorfizm görülebilmektedir), katalaz, tuza tolerans ve VP reaksiyon testleri negatiftir (Roberts ve ark., 1984). *S. iniae*, kültüre alınmış balıklarda (başta tilapia olmak üzere gökkuşuğu alabalığı, çipura, sarıkuyruk, yılan

balığı, alabalık vb.) artan insidense sahip bakteriyel bir patojendir. Streptokok enfeksiyonları dünyada hem kültür koşullarında yetiştirilen hem de doğal ortamlardaki balıklarda 22 türde bildirilmiştir.

Türlere özgü temel AFP'lerinin ölçülmesi, hastalığın teşhisi, prognozu ve uygulanan tedavinin etkinliği hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Fakat hastalığın döneminin (akut veya kronik) AFP'lerin birkaç üyesinin birlikte ölçülmesiyle daha iyi değerlendirilebileceği vurgulanmıştır (Eckersall, 2004). Son yıllarda yapılan araştırmalar; plazma veya serumdaki AFP konsantrasyon seviyelerinin, hastalığın prognozunda ve tespitinde önemli diagnostik bilgiler sağladığını göstermiştir (Eckersall, 2000). Hayvanlarda, özellikle balıklarda CRP, SAA, transferin, haptoglobulin, seruloplazmin ve fibrinojen önemli AFP'leridir. Bu proteinlerin serum veya plazma konsantrasyonları travma, çeşitli enfeksiyon ve yangısal durumlarda doku hasarını takiben arttığı belirtilmiştir (Eckersall, 1999; Martinez-Subiela ve ark., 2003).

Bu çalışmada yetiştiriciliği giderek artan tilapialarda, mortalitenin zaman zaman % 50'lere ulaştığı Streptokokkosis'in, deneysel olarak oluşturulmasıyla, balık bireylerinde enfeksiyon sonrası gelişen bazı akut faz yanıtların araştırılması amaçlanmıştır.

Araştırmanın konuyla ilgili bundan sonraki çalışmalara temel oluşturacağı ayrıca elde edilen sonuçların balıklarda, özellikle bakteriyel hastalıkların erken tanısında kullanılabilirliğinin araştırılması yönüyle de önem taşıdığı düşünülmektedir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bir doktora tezi olarak kurgulanan bu araştırma konusuyla ilgili, yurt içinde ve yurt dışında yapılmış araştırmaların bazıları aşağıda verilmiştir.

### 2.1. Balıklarda *S. iniae* ve Akut Faz Proteinleri Çalışmaları

Nakanishi ve ark. (1991), gökkuşağı alabalıklarında C-reaktif proteinini komplement sistemin aktivasyonu yönünden araştırmışlardır. Bu amaçla, balıkları *Streptococcus pneumoniae* ile enfekte etmişler ve denemeleri sonunda elde ettikleri verilerde CRP değerleri için tavşan hemolizine duyarlı koyun eritrositlerinin kullanımı ile reaksiyon verebilen komplement fiksasyon testlerini kullanmışlardır. Komplement sistemin aktivasyonu süresince, salınan C-polisakkarit (CPS)'in etkisiyle saf CRP'nin komplement tüketimini arttırdığını belirlemişlerdir. Konak savunmasında önemli bir role sahip olan CRP'nin akut faz yanıtı süresince, komplement sistemin aktive olduğunu, fagositozun arttığını ve bakteriyel üremenin baskılandığını gözlemlemişlerdir.

İnflamasyon; negatif akut faz proteinlerinin azalmasında ve pozitif akut faz proteinlerinin serum konsantrasyonlarının artmasında öncülük eden karaciğerin biyosentetik fonksiyon değişimlerine bağlı şekillenmektedir. SAA, pentraksinler, CRP ve Serum amiloid P (SAP) major akut faz proteinlerindedir. Bu proteinler, serum seviyeleri artışına bağlı olarak homeostazinin sağlanmasında ya da savunmada kritik rol oynamaktadırlar. Jensen ve ark. (1997), salmonidlerde SAP benzeri pentraksin ve SAA genlerini klonlamışlardır. Bu salmonid SAA'sının, memeli SAA'sı ile benzer aminoasitlerin yaklaşık %70'inin homoloji gösterdiklerini ve ayrıca bir akut faz uyararı ile stimüle oldukları zaman (örn: *Aeromonas salmonicida*), SAA yanıtlarının major bir akut faz reaktantı gibi hem memeli SAA'sı hem de CRP'si ile %40 oranında amino asit

homolojisine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılar çalışmalarında, ilkel savunma sisteminin yalnızca bir kısmını gösteren omurgalı türlerde akut faz yanıtının, gerekli ve çok amaçlı özelliğe sahip olan SAA'daki hipotezi güçlendirdiğini, ancak akut faz yanıtı süresince pentraksin salınımının türe bağlı değişimlerinde oldukça önemli paya sahip ankestral fonksiyonun akut faz yanıtına bağlı olmadığını göstermişlerdir.

Smith ve Schoonbee (1998), *Oreochromis mossambicus*'daki kan koagülasyonunu, iç ve dış koagülasyon faktörleri için tüm kan örneklerinde pıhtılaşma zamanını belirleyerek ölçmüşlerdir. Bunun için balık serumunda bulunan fibrinojen de dahil birçok protein değerlerindeki değişimleri gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacıların sonuçları, balıklardaki pıhtılaşma süresinin daha düşük olmakla birlikte memeli pıhtılaşma zamanına süresine yakın olduğu yönündedir.

Bromage ve ark. (1999), deniz suyu kültüründe Nil tatlı su levreği (*Lates calcarifer*)'nde *Streptococcus iniae*'nin mortalite düzeylerini incelemişlerdir. Bu araştırmacılar letal doz olarak belirledikleri (LD<sub>50</sub>) 2.5 x 10<sup>5</sup> ve 3.2 x 10<sup>4</sup> kob miktarlarını 48 saat ve 10 günlük periyotlarda uygulamışlardır. Enfeksiyon sonrası, ilk grupta (48 saatlik periyot) yüksek mortaliteler (>%40) tespit etmişlerdir. İkinci grupta (10 günlük periyot) ise balıkların canlı olanlarının göz, böbrek, karaciğer ve dalak gibi organlarından alınan örneklerin mikroskopik incelemelerinde *S. iniae*'ye rastlamamışlardır. Ancak, ölmek üzere olan ya da sağlıklı balıklardan kolaylıkla izole edildiklerini bildirmişlerdir.

Eldar ve ark. (1999), bazı hasta deniz balıklarında ilk etken olarak *S. iniae*'yi izole etmişlerdir. Hasta kızıl davul balıkları (*Sciaenops ocellatus*)'nda uyuşukluk ve *S. iniae* ile enfekte olmuş tatlı su balıklarına benzer eksternal (dış) belirtileri (ekzoftalmus ve uyum kaybı) gözlemlemişlerdir. Deri lezyonları, nekroze myositis (kas yangısı) kızıl davul balığının *S. iniae* enfeksiyonunda tipiktir. Araştırmacılar histopatolojik bulgularında; bu balıklar üzerinde *S. inae* enfeksiyonunun, birçok negrotik odak oluşturduğu, sistemik olarak ilerlediğini ve kronik bir seyir gösterdiğini belirtmişlerdir. İki farklı ribotipin tek bir salgına öncelik ettiğini ve moleküler epidemiyolojinin buna bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Evans ve ark. (2000), hibrid çizgili levrek ve tilapialara *Streptococcus iniae*'nin öldürücü bir izolatını balıkların gözlerine ve göz boşluklarına bilateral olarak enjekte etmişler, oluşan hastalığın virülansını izlemişlerdir. Her iki türde de göz inokulasyonunun hastalık ve mortalite neden olmadığını, fakat göz boşluklarına yapılan inokulasyon neticesinde hastalık belirtileri ve mortaliteler saptamışlardır. Her iki türe de uygulanan  $4.8 \times 10^3$  kob dozundaki *S. iniae*'ye hibrid çizgili levrek bireylerinin tilapialardan 100 kat daha az inokulum gösterdiklerini izlemişlerdir. İki balık grubunda  $4.8 \times 10^5$  kob dozunda *S. iniae* inokule ettiklerinde mortalite oranının hibrid çizgili levreklerde azaldığını görmüşlerdir. *S. iniae* enfeksiyonu sonrasında balıklarda düzensiz ve sarmal biçimde kıvrılarak yüzme, suyun yukarısına ya da aşağısına yönelme, baş aşağı yüzme, iştahsızlık, uyuşukluk ve deride kararmalar olmak üzere çeşitli hastalık septomlarını bildirmişlerdir. Ekzoftalmus, göz opasitesi ve vücut eğriliği gibi bulgulara rastlamamışlardır. Hem hibrid çizgili levrek hem de tilapiaların göz boşluklarına uyguladıkları  $4.8 \times 10^3$  CFU *S. iniae* inokulasyonundan 14 gün sonra balıklarda anti-streptokokal belirtiler izlemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada, kültüre alınmış balıklarda *S. iniae* enfeksiyonunun potansiyel bir tehlike olabileceğini savunmuşlardır.

Shoemaker ve ark. (2000), kültüre alınmış tilapia'ları *S. iniae* ile enfekte etmişler, balık yoğunluğu ve enfeksiyon dozuna bağlı olarak mortalite oranlarını belirlemişlerdir. Belirlenen yoğunluk (sırasıyla 5,6 gr/L, 11,2 gr/L ve 22,4 gr/L) ve dozların (sırasıyla  $2,5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$  ve  $1 \times 10^8$  kob/ml) her biri için 5'er adet olmak üzere tank kullanmış, toplam 45 tank kullanılmıştır. Düşük, orta ve yüksek stok yoğunluklarında olacak şekilde ayırdıkları balık gruplarında enjeksiyondan 28 gün sonra mortalite oranlarını incelemişlerdir. Stok yoğunluğu az olan ortamda ki grubu (% 4,8 mortalite) stok yoğunluğu orta ve çok olan gruplarla karşılaştırmışlar; orta dereceli yoğunlukta bulunanlarda % 28,4, yüksek yoğunlukta bulunanlarda ise % 25,6'sında mortalite belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar, ölmüş ya da ölmek üzere olan balık bireylerini 48 saat boyunca diğerlerinden ayırmadan aynı bakterinin  $8,6 \times 10^7$  kob/ml dozu ile tekrar enfekte etmişler mortalite miktarlarında önemli farklar bulamamışlardır.

Siwicki ve ark. (2000), farklı balık türlerinden, homeostasiste görülen olumsuzluk durumlarında balıkların non-spesifik reaksiyonu olan ve sitokinler tarafından oluşturulan spesifik stimülasyonu takiben hepatositler tarafından salınan akut faz protein (AFP)'lerinden seroplazmin (Cp), fibrinojen (Fb), SAA ve CRP olarak bilinen çeşitli AFP'lerini izole etmişlerdir. Bu araştırmacılar mevcut çalışmalarında, farklı pestisitlerin balıklardaki AFP'leri üzerinde etkilerini yükseltmek ve akuatik kirliliğin belirlenmesi için AFP'lerinin saptanmasının yararlarını gösterebilmeyi amaçlamışlardır. Farklı AFP'lerin intoksikasyon sonrası değerlerindeki değişimleri analiz etmişler ve Cp ile CRP'nin normal değerlerinden 3–5 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, AFP'lerinin canlılar için oldukça hassas ve etkin bir belirteç olduğunu belirtmişlerdir.

Parazitler ve diğer patojenler tarafından oluşturulan doku travması ya da doku invazyonu hayvanların vücut sıvılarında birçok makromoleküllerin düzeylerinde değişiklikler yaratmaktadır. Bu değişimler, çeşitli organlarda metabolik değişimlere neden olan ve akut faz proteinleri olarak bilinen yanıtla yol açmaktadırlar. Bayne ve Gerwick (2001) tarafından yapılan araştırma, memeliler, kemikli balıklar ve kıkırdaklı balıklarda tanımlanan AFP'leri; CRP, serum amiloid P ve komplement sistemin çeşitli komponentleri olarak bildirmiştir. Ayrıca, kemikli balıklarda diğer akut faz proteinlerinin transferin ve trombin olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar, bunlardan yalnızca CRP'nin akut faz protein miktarlarında artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Gökkuşığı alabalığında precerebellin benzeri proteinin fonksiyonu bilinmemekle birlikte diğer bir AFP olduğunu da bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların sonuçları, memelilerde olduğu gibi balıklarda da AFP'nin primer kaynağının hepatositler olduğu yönündedir.

*S. iniae*, ekonomik öneme sahip balık türlerinde meningoensefalitis hastalığına ve ortaya çıktığı durumlarda ciddi ölümlere neden olan son yıllarda insanlar da yumuşak doku hasarları şeklinde enfeksiyona neden olabilen önemli bir patojendir (Weinstein ve ark., 1997). Genetik olarak çeşitliliğe sahip olan *S. iniae*, hastalığın septomlarını göstermemiş balıklardan izole edilirken, pulsed-field jel elektroforezis (PFGE) ile de identifiye edilebilir olduğundan, hastalığa neden olan türler için hem insanlarda hem de balıklarda tek bir klona sahip olduğu

anlaşılmaktadır. Fuller ve ark. (2001) yapmış oldukları çalışmada, hastalığa neden olan isolatların patojenitesini incelemek için *in vivo* ve *in vitro* modeller üzerinde durmuşlardır. Hastalık ile ilişkili klonal PFGE profilli ırklarda önemli ağırlık kayıplarının ve subkutan bir fare model enfeksiyonunda ise bakteriyeminin olduğunu görmüşlerdir.  $10^2$  kob miktarı ile enfekte edilen balıklarda bakteriyemi bulguları gözlemlenmişler;  $10^7$  kob'luk gruplarda ise bakteriyemiye ilaveten mortalitede artış tespit etmişlerdir. Kontrol grubunda ve  $10^8$  kob miktarı inokule edilen balık grubunda bakteriyemi ve ağırlık kaybının önemsizmeyecek derecede az olması araştırmacıların diğer bulguları arasındadır. Aynı zamanda, hastalık etkeni ile ilişkili türlerin fagositik aktiviteye daha dirençli olması ve konak hücrelerinden salınan laktat dehidrojenaz (LDH) ile ölçülen insan endonükleaz hücrelerinin sitotoksik olduğunu gözlemlenmişlerdir. Araştırmacılar hücrel invazyonun; *S. iniae* enfeksiyonunun patojenezine katkıda bulunduğunu, ayrıca fagositik aktiviteye direnç ve direk sitotoksiteden de hastalık ile ilişkili klonun virülans özelliği farklılığına bağlı olarak değiştiği kanısına varmışlardır.

Gerwick ve ark. (2002) çalışmalarında, gökkuşağı alabalıklarında çeşitli biyolojik ajanlar uygulayarak stres oluşturmuşlar ve AFP'lerinde görülen değişimleri izlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçları elektroforez yöntemiyle belirlemiş ve değerlendirmişlerdir. Buna göre, plazma protein değerlerinin tümünde artışlar saptamışlardır. Bu artışlar enfeksiyonlardan 2 gün sonra başlayarak bir hafta boyunca devam etmiştir. Plazma değerlerinde en fazla artışa neden olarak *Vibrio spp.* ile oluşturulan enfeksiyonu göstermişlerdir. Bu araştırmacılar aynı zamanda araştırmalarında bazı protein değerlerinde artışlar saptarken bazılarında azalmalar kaydetmişler, özellikle de virus ve mantar enfeksiyonlarına karşı yanıtlarda artışlar izlemişlerdir.

Jesse ve Melody (2003), *in vivo* olarak çeşitli dokularda spesifik virülans mekanizmalarını karakterize etmek için zebra balık (*Danio rerio*)'larını tek hayvan modeli olarak geliştirmişlerdir. Bu modeli kullanarak deney grubunu iki streptokokkal tür (*Streptococcus iniae*; balık ve insan patojeni ve *Streptococcus pyogenes*; insanlara özgü patojen) ile enfekte etmişler ve değişimleri rapor etmişlerdir. Her iki türün zebra balıkları üzerindeki ilk semptomlarının,

intramüsküler enjeksiyon (kas içi) sonucu öldürücü sistemik bir hastalığa neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Deney balıklarında hastalık oluşturan, hem insanlar hem de balıklar için öldürücü olabilen bu iki türün meydana getirdiği streptokokkal enfeksiyonların benzer sonuçlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar, önemli bir patojen olan *Streptococcus iniae* ile enfekte olmuş zebra balıkları (*Danio rerio*)’nda bakteriyel patojenite modeli oluşturmuşlardır. Buna göre dorsal kısımdan enjeksiyonu takiben, zebra balığı için, lethal dozu olarak (LD50)  $10^3$  kob belirlemişler ve 2–3 gün içinde ölümler tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar yetiştiricilik sistemlerindeki balık popülasyonlarında, ilk olarak fokal nekrotik lezyonlar ve tüm ana sistemlerinde invazyonlar (beyin dahil) gözlemişlerdir.

Kodoma ve ark. (2003), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiricilik ünitelerinde, ektoparazitlere karşı kullanılan formalin, metrifonat ve potasyum permanganat ile balıkları muamele etmiş ve serum miktarlarında oluşan CRP değerlerindeki değişimleri izlemişlerdir. Serumda kontrol grubu CRP miktarlarını enzim-bağlı immünosorbent testi (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) ile belirlemişler ve düzeyin  $88 \pm 5$   $\mu\text{g/ml}$  olduğunu tespit etmişlerdir. Deneysel işlemde 8–9 gün sonra CRP değerlerinin pik seviyeye ulaştıklarını, 19 gün sonra ise normal değerlerin altında seyrettiğini rapor etmişlerdir. Diğer kimyasallarla oluşturan gruplarda, elde ettikleri verilerin benzerlik gösterdiğini ve alabalık serumundaki CRP değerlerinin balık sağlık durumu açısından biyoindikatör olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

McNulty ve ark. (2003), *Streptococcus iniae*’nin solungaca inokulasyonu ile hibrid (melez) çizgili levreklerde oluşturan enfeksiyonun virülansını incelemişlerdir. Bu amaçla araştırmacılar oluşturdukları 4 deney grubu için  $5,0 \times 10^5$ ,  $2,6 \times 10^6$ ,  $5,0 \times 10^6$  ve  $1,0 \times 10^8$  kob dozları uygulamış ve her bir doz için balık gruplarında meydana gelen semptomları gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri verilere göre mortalite oranlarını sırasıyla %13, %27, %100 ve %100 saptamışlardır. Ayrıca inokulasyondan 0,5, 4, 8, 12, 24, 48 ve 72 saat sonra doku diseminasyonunu (yaygınlık) belirlemişlerdir.  $2,6 \times 10^6$  kob dozun inokule edildiği grupta 48 saat sonra solungaçlarda yoğun invazyonlar olduğunu, ancak  $5,0 \times 10^6$  kob olarak uygulanan dozda ise 12 saat içinde dış bulguların yanı sıra beyin, baş böbrek, dalak ve karaciğer gibi iç organlarda da yoğun

olarak *S. iniae*'nin varlığını tespit etmişlerdir.

Karsten ve Rice (2004), omurgalılarda nörojenik stres ve inflamasyonun bir belirteci ve akut faz yanıtının biyoindikatörü olarak dolaşımdaki CRP seviyelerini mevsimsel olarak incelemişlerdir. Farklı coğrafik bölgelerden elde avlanan köpekbalıkları üzerinde çalışmışlar, fakat farklı habitatlarda yaşayan köpekbalıklarının CRP seviyeleri ile ilgili yeterli verilere ulaşamamışlardır. Bu araştırmacılar, deney hayvanlarında CRP miktarlarını belirlemek için CRP'ye karşı spesifik bir antikor geliştirmişlerdir. Total CRP konsantrasyonlarını ise ELISA tekniğini kullanarak elde etmişlerdir. Bu araştırmacılar en yüksek CRP konsantrasyonunu yaz mevsiminde olduğunu gözlemlemişlerdir.

Pressley ve ark. (2005), zebra balıklarında AFP değişimlerini izlemek için balıkları üç bakteriyel patojen (*Aeromonas salmonicida*, *Staphylococcus aureus* ve *Edwardsiella tarda*) ile enfekte etmişlerdir. Akut faz yanıt süresince AFP'lerinin insanlardakine benzer bir değişim gösterdiğini ve geçici olduğunu saptamışlardır. Bu araştırmacılar TNF-alfa ve IL-6 gibi sitokinlerin inflamasyon sonrası hızlı artışına bağlı olarak AFP'lerin normal seviyelere düştüğünü bildirmişlerdir.

Li (2006), 2003–2006 yılları arasında Asya'da yetiştiriciliği yapılan deniz balıklarının sağlığı için tehlike oluşturan bakteriyel, viral ve parazitik etkenleri belirlemek ve tanımlamak istemiş bu amaçla balıklardaki mevcut patojenleri saptamıştır. Balıkların % 84'ünün bir ya da daha fazla patojen ile enfekte olduğunu ve türlerin bazılarının birçok patojen ile yeniden enfekte olduğunu bildirmiştir. Bakteriyel patojenlerden en çok *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *Pasteurella damsela*'ya rastlamıştır.

Russo ve ark. (2006), akvaryum balıkları olan kızılkuşuk siyah köpekbalığı (*Epalzeorhynchus bicolor*) ve gökkuşuğu köpekbalığından (*Epalzeorhynchus frenatus*) *S. iniae*'yi izole etmişlerdir. Enfekte köpek balıklarında deride kararma ve uyuşukluk hali gözlemişlerdir. Balıkların ventral bölgeleri, baş kısımları, pelvik ve pektoral yüzgeç tabanlarında hemorajiler bu araştırmacıların diğer bulguları arasındadır. Enfekte balıklarda %10 oranında ekzoftalmus belirlemişlerdir. Ölmek üzere olan balıklarda streptokokal enfeksiyonlar için karakteristik olan dönme hareketini gözlemlemişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar, bağırsaklar, dalak, böbrek,

posterior böbrek ve beyindeki lökosit infiltrasyonuna bağlı histolojik bulgulara da çalışmalarında yer vermişlerdir. Aynı organlarda nekrozis ve doku dejenerasyonunu incelemişlerdir. Beyin ve böbrek dokularından hazırladıkları kültürlerden bu etkenin gram (+) olduğunu belirlemişlerdir. Bakteriyel identifikasyonu; BIOLOG MicroLog3 versiyon 4.00 Sistem (Biolog, Inc., Hayward, California) ve standart mikrobiyolojik yöntemlerle elde etmişlerdir. *S. iniae* ile enfekte olmamış kızilkuyruk siyah köpekbalığı (*Epalzeorhynchus bicolor*), izole edilmiş bakteri türleri ile ilişkili bir model geliştirmek için kullanmışlardır. Her biri 38 L olan 25 tank ile yürüttükleri çalışmada her tanka 25 balığı rasgele olarak stoklamışlar, tankları uygulama ve kontrol grubu olarak ayırmışlardır. İntrasöломik olarak köpekbalıklarını enfekte etmiş ve 14 gün süre boyunca oluşan mortaliteyi günlük olarak kaydetmişlerdir. Ölmek üzere olan balıklarda streptokokkosisin klinik belirtileri görülmüş, ölmüş ve ölmek üzere olan balıklarda *S. iniae* etkenine rastlanmıştır. İki grup arasında *S. iniae*'ye olan hassasiyeti (duyarlılığı) değerlendirmişlerdir. İki gruptaki balıklara uygulanan  $1,5 \times 10^4$  kob *S. iniae* dozu uygulanması sonrasında kızilkuyruk siyah köpekbalıklarında mortalite yaklaşık %70 olurken diğer grup balıklarda daha yüksek düzeyde gözlenmiştir. Mortalitelere, kızilkuyruk siyah köpekbalıklarında enfeksiyondan sonra 10 ve 11. günlerde; gökkuşağı köpekbalıklarında ise 3 ve 4. günlerde görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Shoemaker ve ark. (2006), tilapiaları  $8.8 \times 10^3$ ,  $8.8 \times 10^4$  ve  $8.8 \times 10^5$  kob olmak üzere üç farklı doza maruz bırakmışlardır. *S. iniae* ile enfekte olmayan (kontrol grup) ile tryptic soy broth (TSB) besiyerinde üreyen kolonilerden elde edilen ve ayarlanmış kob dozunda süspansiyonla enfekte ettikleri grupları (kontrol grupları) ayırmışlardır. Yüksek doza maruz bıraktıkları balıklarda düşük doza (% 29,6) kıyasla daha yüksek mortaliteler belirlemişlerdir (% 45). Orta dozda enfekte ettikleri balıklarda ise mortalite oranını % 36,3 tespit etmiş ve mortalite oranının düşük ya da yüksek dozda enfekte ettikleri balık gruplarından dikkat çekici seviyelerde farklı olmadığını gözlemişlerdir. Kontrol grubu balıklarda da yalnızca birkaç balığın öldüğünü bildirmişlerdir. *S. iniae* infeksiyonundan sonra canlı kalan tilapialarda hastalığın klinik belirtilerini göstermeyenler üzerinde büyüme performanslarını araştırmışlardır. Bu balıkları her biri 57 litre olan akvaryumlara rastgele olarak

stoklamışlar ve 8 hafta doyma noktasında yemlemişlerdir. Üç tekrarlı yaptıkları bu uygulamada, *S. iniae* ile enfekte edilen tilapialarda yem etki durumu ile canlılık arasında, yem alımı ve ağırlık kazancında önemli farklar elde edememişlerdir. 8 haftalık besleme uygulamasını takiben tilapiaları  $1 \times 10^6$  kob dozunda *S.iniae* ile enfekte etmişler ve oluşan immüniteyi araştırmışlardır. Ortalama kümülatif mortalitenin kontrol gruplarında (enfekte olmayan grupta % 41.7, broth ile enfekte edilmiş balıklarda % 43.3) düşük, orta ve yüksek dozda enfekte ettiklerinden (sırası ile % 7.4, %3.3 ve % 8.3) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Serum protein seviyelerinin, *S. iniae* ile enfeksiyondan hemen sonra yükseldiğini belirtmişlerdir. Bu araştırmacıların sonuçlarına göre canlı *S. iniae* ile enfekte olan balıkların enfekte olmayanlar gibi hastalık belirtilerini göstermediğini tespit etmişlerdir.

Lin ve ark. (2007), zebra balık (*Danio rerio*)'ları üzerinde immünolojik çalışmalar için önemli bir model belirlemişlerdir. Bunun için biri gram (-) bir bakteri olan *Aeromonas salmonicida* diğeri gram (+) bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* olmak üzere iki bakterinin zebra balığında oluşturduğu immün yanıtı incelemişlerdir. İnfeksiyonu içeren genleri akut faz proteinleri (AFP) içerenlerin kodlanması ile birlikte baskı çıkarıcı hibridizasyon yöntemiyle tanımlanmışlardır. Memeliler ile karşılaştırıldıkları zaman, göze çarpan benzerlikler ve belirli farklar saptamışlardır.

Sowunmi ve ark. (2007), *Clarias gariepinus* ve *Tilapia zillii* türlerinde solungaç ve yanak boşluğundaki mevcut bakteriyal florayı karşılaştırmaları sonucu *Bacillus* sp. *Bacillus licheniformis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus* sp. türlerine rastlamışlardır. Bu türlerin kolonileri incelendiğinde her iki balık türü içinde solungaçların önemli oranlarda (kob =  $7.98 \pm 0.29$ ,  $t < 0.05$  ve kob =  $6.65 \pm 0.38$ ,  $t < 0.05$ ) enfekte olduğunu, ayrıca *S. iniae* ile enfeksiyon oranının diğer bakteri türlerine kıyasla daha yüksek seviyeler (% 20) gösterdiği gözlemlenmiştir.

Xu ve ark. (2007), tilapia (*Oreochromis niloticus*)'lar üzerinde *Gymnarchus niloticus* ve *S. iniae* enfeksiyonunun etkisini eş zamanlı olarak çalışmışlar, parazitin ve bakterinin balıklar üzerindeki mortalite ve duyarlılıklarını incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, *G. niloticus* ve *S. iniae* (G-S grup)'ye maruz bırakılan

balıkların öldüklerini, ayrıca mortalite oranlarını karşılaştırdıklarında, G-S grubunun (% 42,2), parazit ile enfeste olmayanlardan (% 6,7) daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. *S. iniae* ile enfekte grupta ölü ya da ölmek üzere olan balıkların % 92'den fazlasında bakteriyolojik inceleme yaparak, *S. iniae* enfeksiyondan sonraki 24 saat içinde intraperitoneal injeksiyon ya da immersion yöntemi ile enfekte edilen balıklardan biriktirilen *G. niloticus*'un %40-60'ından izole etmişlerdir.

Özer ve ark. (2008), gökkuşuğu alabalığı işletmesinde bir yıl boyunca farklı büyüklüklerde 260 balık örneğini, gram pozitif bakteri florası açısından klasik izolasyon ve identifikasyon yöntemleriyle incelemişler, izolatların identifikasyonu için ticari ID32 Strep hızlı kiti (BioMerieux) kullanmışlardır. Balık örneklerinin 63'ünde (%24,23) 59 adet Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif kok izole etmişlerdir. Bu araştırmacılar, Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif kok izolatlar olarak *Aerococcus viridans*, *Enterococcus durans*, *E. hirae*, *Enterococcus faecium*-1, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis lactis*, *Leuconostoc* spp. ve *Streptococcus anginosus*'u tanımlamışlardır. Bu bakterilerin izole edildiği 62 balıktan 28'inde (%45.16) deride kararma, gözde matlık, tek ya da çift taraftlı eksoftalmus, solungaçta kansızlık gibi hastalık belirtileri ve 7'sinde (%11.29) karaciğerde kanama ve anemi saptamışlardır.

Villarreal ve ark. (2008), gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*)'nı *Flavobacterium psychrophilum* ile deneysel olarak enfekte etmişler ve enfeksiyon sonrası kan plazmasında, tüm omurgalılarda major akut faz proteinlerinden ve doğal immünitinin efektörü olan SAA'nın seviyelerindeki değişimleri izlemişlerdir. Elde ettikleri verilere göre, balık SAA'sının memeli SAA'sına benzemediğini ayrıca hasta balıklarda değerlerin önemsenmeyecek derecede artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

## 2.2. Bazı Omurgalılarda *S. iniae* ve Akut Faz Proteinleri Çalışmaları

Akut faz proteinleri (özellikle çalışmamızda incelenen CRP, SAA, transferin ve fibrinojen) ile ilgili araştırmalar birçok hayvan türü üzerinde de çalışılmış ve bu proteinlerin inflamasyonun oluşumu ve gelişimi bakımından önemi vurgulanmıştır.

Rikihiya ve ark. (1993), *Ehrlichia canis* ile köpeklerde deneysel enfeksiyon geliştirmişler, CRP ve alfa1-asit glikoprotein (AAG)'nin serum konsantrasyonlarında gözlenen değişimlerini belirlemişlerdir. CRP'nin analizi için ELISA, AAG konsantrasyonu için ise köpeklere özgü spesifik bir yöntem kullanmışlardır. Enfeksiyondan 4–6 gün sonra deney hayvanlarının CRP miktarlarında 3.3–6.5, AAG konsantrasyonlarında ise 1,9–8,6 kat artış saptamışlardır. Bu araştırmacılar deneyden 14 gün sonra köpeklerde kronik ve şiddetli klinik belirtiler gözlemlemişler fakat 34 gün sonra bu parametrelerin stres öncesi değerlere gerilediğini bildirmişlerdir. Özellikle köpeklerdeki *E. canis* enfeksiyonlarında, CRP ve AAG konsantrasyonlarında meydana gelen değişimlerin izlenmesinin inflamasyonun seyri hakkında önemli veriler sağlayabileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Yamamoto ve ark. (1993) ise köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada, akut faz yanıtı boyunca SAA değerlerinde gözlenen değişiklikleri belirlemek için immün teknikler kullanmış ve SAA seviyelerde artışlar saptamışlardır.

Yule ve ark. (1997), köpeklerde deneysel enfeksiyon oluşturularak, SAA'nın inflamasyon süresince gösterdiği değişiklikleri kaydetmişler ve çalışmalarında elde ettikleri sonuçları göz önünde bulundurarak, SAA'nın bir enfeksiyonun biyo-belirteci (biyo-indikatör) olarak değerlendirilebileceğini vurgulamışlardır.

Weinsthen ve ark. (1997), Kanada'da balık çiftliklerinde çalışan ve septisemi şikâyetiyle hastaneye başvuran bir grup hasta insan üzerinde yaptıkları çalışmalarda *S. iniae*'yi izole etmişlerdir. Bu insanların, hasta balıklarla direk temas yoluyla enfekte olduklarını bildirmişlerdir. Fakat insan sağlığını tehdit edecek derecede önemli olmadığını belirtmişlerdir.

Köpeklerde *Bordetella bronchiseptica* ile oluşturulan deneysel enfeksiyonda CRP'in normal seviyelerden 95 kat kadar yükseldiği gözlenmiştir (Eckersall, 1999).

Yanong ve Francis-Floyd (2002), *S. iniae*'ye daha çok yaşlı ve sağlık durumu kötü olan insanların duyarlılık gösterdiği ve bu bireylerde immün sistemin tehdit ettiğini bildirmişlerdir.

Sasaki ve ark. (2003), sağlıklı ve hasta kedilerde ELISA ile SAA düzeyini ölçmüşlerdir. Klinik olarak sağlıklı kedilerde SAA seviyesinin  $0,60 \pm 1,06$   $\mu\text{g/ml}$  olduğu, yaralanmalarda  $61,63 \pm 97,48$   $\mu\text{g/ml}$ , enfeksiyöz hastalıklarda  $47,22 \pm 86,40$

$\mu\text{g/ml}$  ve renal rahatsızlıklarda ise  $30,98\pm55,67 \mu\text{g/ml}$  gibi yüksek seviyelerde olduğunu, elde edilen sonuçların normal değerlere göre farklı olduğunu tespit etmişlerdir.

Ganheim ve ark. (2006), deneysel enfeksiyon sonucunda danaların akut faz yanıtındaki farkları ve benzerlikleri saptamışlardır. Haptoglobin, SAA ve fibrinojenin serum konsantrasyonlarındaki bazal değerlerini incelemişlerdir. Sözü edilen akut faz proteinlerinde artışlar belirlemişler fakat gruplar arasında önemli farklar gözlememişlerdir. Bu parametrelerin hastalık indikatörü oluşturma gücünün eşit olduğunu bildirmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, Mayıs 2006 ile Ekim 2006 tarihleri arasında Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü 6. Bölge Su Ürünleri Başmühendisliği İşletmesinde 3,75 m<sup>3</sup> hacimli 9 adet yetiştiricilik havuzunda yürütülmüştür. Araştırmada rastgele seçilen balık bireylerinin sağlık durumunu kontrol etmek için 10 adet balık bakteriyolojik ve parazitolojik incelemelerden geçirilmişlerdir. Çalışmada iki grup oluşturulmuştur. İlk bölümde balıklar *Streptococcus iniae* ile enfekte edilmiş ve LD<sub>50</sub> doz belirlenerek bu dozun altında bir doz deneysel enfeksiyon dozu olarak seçilmiştir; ikinci uygulamada ise belirlenen doz ile enfekte edilen balıklar üzerine akut bir stres oluşturucu uygulanmış ve hemen sonrasında gelişen bazı akut faz yanıtlarındaki değişimler izlenmiştir.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Balık Materyali

Balık materyali olarak, Chichlidae familyası üyesi olan ve ülkemizde yaygın olarak bulunmayan ancak bazı bölgelerde yetiştiriciliğinde artış görülen Nil tilapiası (*Oreochromis niloticus* L. 1758) kullanılmıştır (Şekil 3.1.).

Araştırmada kullanılan 72 adet balık bireyinin ortalama canlı ağırlığı 60,35±1,04 gr'dır. Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü 6. Bölge Su Ürünleri Başmühendisliği yetiştiricilik ünitesinden temin edilen balıklar 1 ay boyunca ortama adapte olmaları için bekletilmişlerdir. Balıklar ortama adapte olduktan sonra vücut ağırlıklarının %2–3 oranında sazan yemi ile günde iki kez yemlenmiştir.



Şekil 3.1. Denemede kullanılan tilapia (*Oreochromis niloticus* L. 1758)  
(orijinal)

### 3.1.2. Uygulama Havuzları ve Örnekleme Zamanları

Araştırma (1,5x2,5x1m) boyutlarında, %1'lik formalin ile dezenfekte edilmiş 9 adet beton havuzda yürütülmüştür (Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.). Araştırma süresince havuzlarda su sıcaklığı ortalama  $26,2 \pm 0,799$  °C, pH 7.2 ve çözülmüş oksijen miktarı ise ortalama  $5,4 \pm 0,449$  mg/L olarak ölçülmüştür. Araştırma havuzlarında fotoperiyot uygulanmış (12 saat karanlık:12 saat aydınlık) havalandırma ise, hava taşları ile sağlanmıştır.

Parazitolojik muayene amacıyla balık bireylerinde iç ve dış parazit taramaları yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle hasta balıkların vücut yüzeyleri ile solungaçları incelenmiştir. Solungaçlar ile ağız içerisindeki parazitler toplanarak balıktan uzaklaştırılmış ve % 4'lük formol solüsyonuna alınmıştır (Baran ve ark., 1994; Bullock, 1978; Collins, 1993). Bununla birlikte aynı balık örneklerinin otopsileri yapılarak karaciger, safra kesesi, bağırsak içeriği, hava kesesi ve böbrekleri incelenip herhangi bir endoparazitin olup olmadığı araştırılmıştır. Kan parazitlerinin varlığını araştırmak için kalpten kan örneği alınarak frotileri hazırlanmıştır. Daha sonra bu frotiler Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Giemsa boyama yöntemi ile boyanmıştır (Toparlak ve Tüzer, 1994).

Bakteriyel muaene için tilapia balıklarının karaciğer, dalak ve böbrek gibi iç organlarından Todd Hewitt Broth (THB) ve Brain Heart Infusion Agar (BHIA) besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Besiyerleri 30 °C’ de 24–48 saat süre ile inkübe edilmiştir. THB’de izole edilen bakterilerin saf kültürlerinin identifikasyonu için hareketlilik, Gram boyama ve Çizelge 4.3.’de gösterilen diğer rutin biyokimyasal testler ile API yöntemi uygulanmıştır.

Çizelge 3.1. Uygulama düzeneği

	Havuz sayısı (adet)	Balık sayısı (her havuz için) (adet)	Uygulama tekrarı	Uygulama zamanı (gün)
1. Uygulama	3	8	3	1
2. Uygulama	3	8	3	1
Kontrol	3	8	3	1



Şekil 3.2. Denemede kullanılan havuzlar (1)



Şekil 3.3. Denemede kullanılan havuzlar (2)

### 3.1.3. Uygulamada Kullanılan Bakteri (*S. iniae* ATCC-29178)

Araştırmada, İsrail’de bulunan Hebrew Üniversitesi, Klinik Mikrobiyoloji Bölümü’nden temin edilen *Streptococcus iniae* suşu (katolog no: ATCC–29178) kullanılmıştır.

Bakterinin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde rutin yöntemler her ne kadar referans olarak kullanılmaktaysa da besi yerlerinin hazırlanış ve inokulasyonunda standart dizasyon, laboratuvar çalışanının göstereceği duyarlılığa bağlı olduğundan, her zaman olanaklı olmamaktadır. Klasik yöntem maliyet açısından avantajlı gibi görünse de iş gücü yönünden olumsuzluklar içermektedir. Besiyeri seçiminde örneğin tipi, miktarı önemlidir. Uygun besiyerinin seçimi anaerobik bakteriyolojinin başarısı için önemlidir. Anaerob besi yerleri hemin ve vitamin K gibi katkı maddelerini içermelidir. Anaerob bakteriyoloji için kullanılacak ideal besiyeri oksijene maruziyeti sınırlandırılmış olmalıdır. Bu nedenle çalışmamızda mevcut suşun çoğaltılmasını sağlamak için, ticari olarak üretilen Todd Hewitt Broth ve Brain Heart Infusion Agar (BHIA) kullanılmıştır. Todd Hewitt Broth ve arkasından Brain Heart Infusion Agar (BHIA)’a ekimleri yapılan bakteri, 30 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kültürün korunması amacıyla bu işlemler ayda bir kez tekrarlanmıştır.

### 3.1.4. Stres Uygulaması

*Streptococcus iniae* ile enfekte edilmiş balıklara stres uygulanmış ve 10 dakika elle rahatsız edilerek 7., 14. ve 21. günlerde kan örnekleri alınmıştır. Bu stres faktörü için gerekli materyal olarak küçük bir el kepçesi kullanılmıştır (Küçükgül, 2003).

Deneysel infeksiyonu oluşturmak için uygun infektif doz olarak belirlediğimiz  $3.3 \times 10^5$  kob/ml’lik *S. iniae*, üç tekrarlı olacak şekilde her bir havuzda 8’li gruplar halinde bulunan 24 balığa 0,1 ml miktarda intraperitonel olarak (i.p.) enjekte edilmiştir, kontrol grubu içinde aynı sayıda Todd-Hewitt Broth kullanılmıştır.

Deney grubunu oluşturan 24 balık ise *S. iniae* ile enfekte edildikten sonra 10 dakika el yardımıyla oluşturulan strese maruz bırakılmış, kontrol grubu olarak belirlenen balıklar ise optimal koşullar altında tutulmuştur.

$$\begin{aligned} \text{Sayı/ml} &= \text{Koloni sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü} &= 3,3 \times 10^5 \text{ kob} \\ \text{Dilüsyon tüpünden petriye aktarılan hacim (ml)} &= 330.000 \text{ adet/ml} \end{aligned}$$

$$\text{Seyreltme faktörü} = \frac{1}{\text{Seyreltme oranı}} = 0,1 \text{ ml enjeksiyonda} = 33.000 \text{ adet bakteri}$$

Enjeksiyonu takiben 7, 14, 28. günlerde kontrol ve enfekte balık gruplarından CRP analizi için sodyum sitratlı, SAA analizinde ise jelli düz cam deney tüplerine 8'er örnek alınarak analizin türüne göre istenen akut faz yanıtlarına (C-reaktif protein, serum amiloid A, transferin ve fibrinojen) bakılmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. *S. iniae*'nin Balıklara Uygulanması

+ 4°C'de korunan *S.iniae* stok kültüründen alınan bakteri izolatları Brain Heart Infusion Agara ve hazır olarak temin edilmiş olan % 5 koyun kanlı besi yerine aseptik koşullarda ekilerek 30 °C'de 24 saat inkübasyonu ile gençleştirilmiştir. Gençleştirilmiş *S. iniae* suşu, 10 ml Todd-Hewitt Broth içeren tüpe ekilerek 24 saat sonra üreyen bakterilerden alt kültür elde edilmiştir. Inkübasyondan sonra, yüzeye yayma yöntemi ile bir mililitredeki canlı bakteri sayısı tespit edilmiştir (Atlas ve ark., 1995; Temiz, 1994). Deneysel infeksiyonu oluşturmak için standarda dayalı sayım yöntemine göre 10 g (ml) örnek alınarak 90 ml seyreltme çözeltilinde homojenize edilmiş ve ardışık dilüsyonlar yapılmıştır. Seyreltme çözeltisi olarak THB kullanılmıştır. Dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak spatülle yayılmış 30 °C 24–48 saatlik inkübasyondan sonra karakteristik koloniler sayılmıştır. En az 5 koloni seçilip, balık solungaç ve derisi ile iç organlarından alınan örnekler aseptik koşullar altında

ekimleri sağlanarak identifikasyonları yapılmış ve *S. iniae* oldukları doğrulanmıştır.

Optik yoğunluğun fotometrik olarak ölçülmesi homojen hücre süspansiyonlarından mümkün olduğundan uygulamamızda bu amaçla turbidometrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem monokromatik bir ışığın bir hücre süspansiyonundan geçerken uğradığı yoğunluk kaybının ölçülmesi (toplam ekstinksiyon) esasına dayanır (Gürğün ve Halkman, 1990) Hücre yoğunluğu ölçülmesinde, toplam ekstinksiyon değerinin ölçülmesine yarayan turbidometri için gerekli olan basit yapılı spektrofotometre bu amaçla kullanılmıştır.

Standart eğrinin hazırlanması amacıyla bakteri besiyerine aşılınmış, belirli zaman aralıkları ile ekstinksiyonları ölçülmüş, aynı anda kültürel sayım yapılmış, böylece çeşitli ekstinksiyon değerlerine karşı gelen canlı hücre sayıları belirlenmiş, tüm değerler milimetrik kâğıda işlendikten sonra çizilmiştir. Standart eğri çiziminde istatistik hesaplamalar ile elde edilen regresyon doğrusu kullanılmıştır. Sonuc olarak belirlenen bakteri yoğunluğunun 540 nm ( $A_{540}$ ) dalga boyundaki absorbansı 1OD (optik dansite) olarak bulunmuştur. Bir mililitredeki canlı bakteri sayısı hesaplanmış ve sözü edilen doz deney balıkları için hastalık oluşturan doz olarak uygulamada kullanılmıştır. Birinci ve ikinci grup balıklar bu dozda bakteri ile i.p. olarak, toplam 48 balık bireyine enjekte edilmiştir.

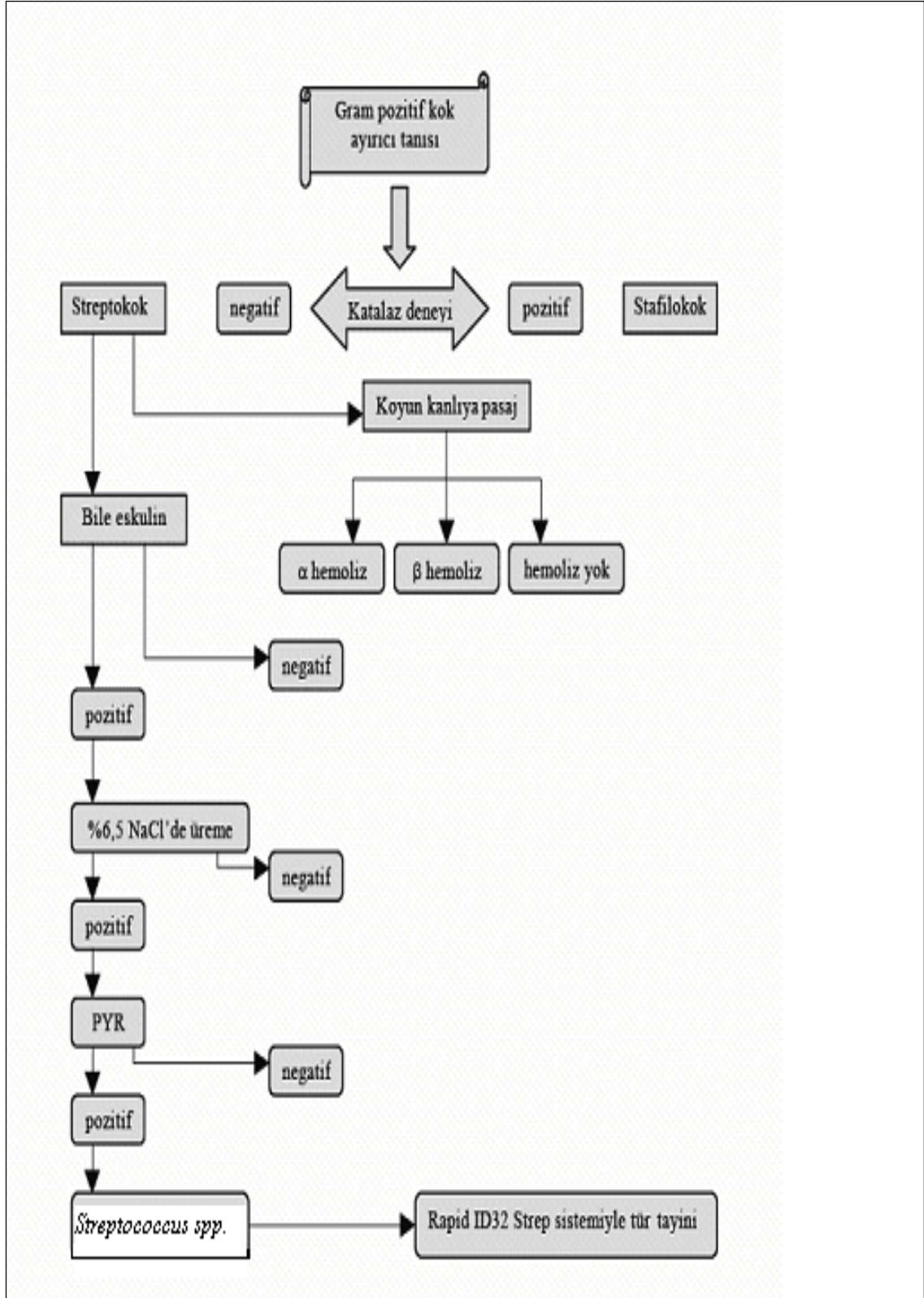
### 3.2.2. Makroskobik ve Mikroskobik Muayene

Enfekte edilen balıklar deney süresince gözlenmiş, gözlenen değişiklikler günlük olarak kaydedilmiştir.

Mikroskopik inceleme için deney balıklarının iç organlarından (beyin, böbrek, dalak, solungaç vb.) alınan örnekler ayrı ayrı aseptik koşullarda BHIA besi yerine ekim yapılmıştır. Besiyerleri 30 ° C de 24–48 saat inkübe edilmiştir.

Enfekte balıklarındaki izolasyon işlemleri için gram pozitif kok ayırıcı tanısı kullanılmıştır (Şekil 3.4).

Şekil 3.4. Gram pozitif kok ayırıcı tanısı (Bilgehan, 1995).



### 3.2.3. *S. iniae*'nin API Yöntemiyle İdentifikasyonu

API yöntemiyle bakteri identifikasyonu Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında yapılmıştır.

İzolasyon, hasta tilapia bireylerinin iç organları ve deri üzerindeki lezyonlu bölgelerinden steril pamuklu çubukla smear yöntemiyle alınarak % 1 maya ekstratı ve % 5 koyun kanı ilave edilmiş BHI agar (BHIA5SB)'a ekilmesiyle yapılmıştır. Ekim yapılan besi yerleri 30°C'de 72 saat inkube edilmiştir. Primer izolasyondan sonra tipik *Streptococcus iniae* kolonileri saflaştırmak için bir kez, % 5 koyun kanı içeren agara pasaj edilmiş, 30°C'de 24 saatlik pasajdan sonra biyokimyasal testler için % 1,5 NaCl ilave edilerek BHIA'ya ekilmiştir.

Bakterinin tam otomatize Rapid ID32 striplerine inokulasyonunda BHIA'ya saf su yerine % 1.5 NaCl içeren steril su kullanılmıştır. Koloni homojenize edildikten sonra McFarland No: 4 yoğunluğunda standardize edilmiştir. Stripler 25°C'de 72 saat süresince inkube edilip, Austin ve Austin (1999a) tarafından belirtilen tabloya göre tanımlanmıştır. Fenotipik olarak identifiye edilen bakteriler konfirmasyon için *S. iniae* serotip O1'e karşı (ATCC-29178) tavşanda üretilen antiserum ile lamda aglutinasyona tabi tutulmuştur. Antiserum ve aglutinasyon testi Toranzo ve ark. (1987)'nin belirttiği yöntemle yapılmıştır.

### 3.2.4. Kanın Biyokimyasal Analizleri

#### 3.2.4.1 Plazma Analizleri

Knoph ve Thorud (1996) ile Val ve ark. (1998)'nin yaptıkları çalışmalarda kullandıkları yöntem takip edilmiş, kan analizlerinin yapılması için gerekli olan kan örneği, anal yüzgecinin hemen arkasında bulunan kaudal venadan alınmıştır. Kana mukozal artıkların karışmaması amacıyla, bu venanın çevresi iyice kurulanıp % 75'lik etil alkolle temizlendikten sonra, 5 ml'lik 22 numaralı iğneli plastik enjektörler kullanılarak örneklerin hemoliz olmamaları için özen gösterilmiştir. Manipulasyon stresini en az seviyeye düşürmek için, kan alma işlemi en geç 45sn' de tamamlanmıştır.

Kan plazmasındaki bazı akut faz proteinlerinin analizleri için, örnekler analizin çeşidine göre deney tüplerine alınmış ve sonraki iki saat içerisinde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarına soğuk zincir altında ulaştırılarak çalışmaya başlanmıştır.

Fazla trombin varlığında, dilüe olmuş plazmanın pıhtılaşma zamanı doğrudan plazmadaki fibrinojen seviyesine bağlıdır. Trombin güçlü bir proteolitik enzimdir. Trombin etkisi ile fibrinojen molekülü önce fibrinopeptid A ve – B'ye ayrılır; geriye fibrin monomerleri kalır. Bu monomerler polimerize olup çözünür ve fibrin komplekslerini meydana getirir. Faktör XIII, Ca<sup>++</sup> ile birlikte fibrin polimerlerini sağlamlaştırır ve çözünmeyen fibrin oluşturur (Kern, 2005; Kumar, 2000). Bu veriler ışığında çalışmamızda analiz edilen total fibrinojen konsantrasyonu için, fibrin zamanlayıcısı (Pathteq, Marburg, Germany) kullanılarak Multifibren (14 X 2 ml kod. no. OWZG 15) ölçülmüş ve Von Clauss pıhtılaşma metodu uygulanmıştır. Kaolin Süspansiyonu (kod. no. OQAB) fibrin zamanlayıcı amacıyla kullanılmıştır. Alınan kan örnekleri için sodyum sitratlı deney tüpleri kullanılmış ve 2500 rpm devirde 15 dakika santrifüj edilip kan serumu ayrılmıştır. Sitratlı plazmadan, büyük miktardaki trombini koagule etmek için yararlanılmıştır. Koagulyasyon zamanı örneklerdeki fibrinojen konsantrasyonuna bağlı olduğundan kontrol plazma N (kod. no. ORKE) ve kontrol plazma P (kod. no. OUPZ) internal kontrol miktarları için standartlar olarak kullanılmıştır. Bu metot için C.V. %1,8 olarak belirlenmiştir.

Transferin, Randox (Kat. no: TF 7197) ile sağlanan immünoturbidimetrik immün teknik kullanılarak Roche/Hitachi 902 cihazı ile ölçülmüştür. Bu metot, insan transferini (siderofilin) için spesifik olan buffer (tampon)'lı antikor ile insan transferini içeren bir örneğin reaksiyonuna bağlı olup Turbid solüsyonu ile sonuçlanan bu absorbans (66 nm), örnekteki transferin konsantrasyonu için orantılandırılmıştır. Standartların absorbansından standart bir eğri oluşumu ile, örnekteki transferin konsantrasyonu belirlenmiştir. Randox spesifik protein düşük (katalog no. PS1657) ve yüksek (Kat. no: PS1658) kontrol, kontrol miktarı için kullanılmıştır.

Plazma Serum Amiloid A ve C-reaktif protein tayini için, tam otomatik BN II nefelometre sistem (Dade Behring, Milan, Italy)'inde gelişmiş partikül nefelometrik

immün tekniği kullanılmıştır (Ledue ve ark., 1998). İki tetkikte zarf şeklinde hücre partiküllü içeren ve kovalent olarak koagule olan spesifik antikorlu immün bir reaksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm için Cobas Integra otoanalizörü kullanılmıştır. SAA için varyasyon katsayısı %3,3- 5 (uzantı içinde)' ten % 3,1–6,9 (uzantı arasında)'e dek sıralanmıştır. Referans limiti ise 6,8 mg/L'dir.

#### 3.2.4.2. İstatistik Analizler

Başlangıçta tüm değişkenlere normal dağılıma uygunluk testi yapılarak parametrik test ölçütlerine uyumu değerlendirilmiştir. Buna göre verilerimiz iki grup halinde incelenmiştir. Birinci grupta yer alan deneme balıklarına uygulanan stres faktörleri için parametrik yöntemlerle analiz yapılmıştır, diğer grubu ise uygulama sonrası CRP, SAA, Transferin ve Fibrinojen oluşturmuş ve non-parametrik yöntemler uygulanarak analizleri yapılmıştır. Non-parametrik yöntem olarak T testi (Independent samples = T test) ve parametrik yöntem olarak DUNCAN Çoklu Aralık Testi (Duncan Multiple Range Test) kullanılmıştır. Ortalamaların karşılaştırılmasında non-parametrik veriler de Mann-Whitney testi, parametrik veriler için Student's t testi kullanılmıştır. Uygulamalar sonucunda, oluşan farklılıklar için önem düzeyleri belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ;  $P > 0,05$ ). Sözü edilen tüm istatistiksel analizler için SPSS 10,0 Paket programından yararlanılmıştır (Anonymous, 1993; Hayran ve Özdemir, 1995).

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

##### 4.1. Bulgular

Çalışmanın gerçekleştirildiği havuzlardan elde edilen pH, çözülmüş oksijen ve sıcaklık değerleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Havuzlardan elde edilen ortalama pH, çözülmüş oksijen ve sıcaklık değerleri

Parametre	Uygulama 1	Uygulama 2	Kontrol
pH	7,58±0,18	7,50±0,13	7,45±0,19
Çözülmüş oksijen (mg/l)	5,40±0,44	5,42±0,38	5,44±0,45
Sıcaklık (°C)	26,2±0,79	26,3±0,79	26,2±0,77

Kontrol ve enfekte gruplara ait tilapia bireyleri *Streptococcus iniae* ile deneysel yolla enfekte edilmiş ve enfekte doz olarak  $3.3 \times 10^5$  kob/ml kullanılmıştır. Aynı dozda *S. iniae* enjekte edilen balık gruplarına akut bir stres faktörü uygulanarak diğer deney grubu oluşturulmuştur. Elde edilen verilere ait ölüm yüzdeleri günlük olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Uygulama boyunca balıklarda görülen ölüm yüzdesi

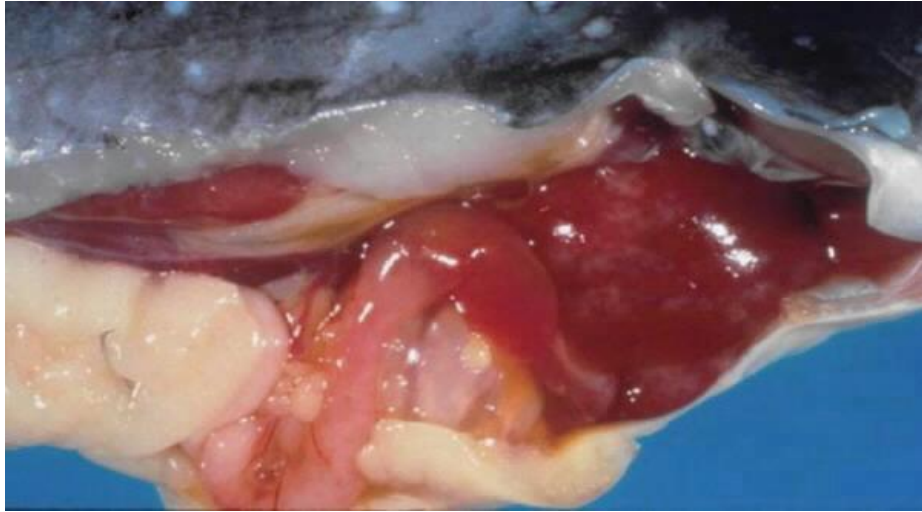
Gün Doz ( $3.3 \times 10^5$ )	1.	2.	3.	4.	7.	14.	21.	Ölü sayısı	Ölüm (%)
1.Uyg.	0/24	0/24	1/24	2/24	1/24	0/24	0/24	4/24	17
2. Uyg.	0/24	1/24	1/24	1/24	2/24	0/24	0/24	5/24	21
Kontrol	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0

#### 4.1.1. Makroskobik ve Mikroskobik Muayene

*S. iniae* ile enfekte olmuş balık gruplarında 24–48 saat içerisinde renk koyulaşması, balık hareketlerinde düzensizlik ve yavaşlama, havuz kenarlarında hareketsiz durma tarzında belirtilerin ortaya çıktığı gözlenmiştir.

Deneysel olarak enfekte edilen balıklarda yapılan mikroskobik muayenede, iç organlarda hemoraji, deride hiperemi ve lezyonlar, beyinde kanlanma, vücut boşluğunda kanlı sıvı birikimi görülmüştür (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4.).

Bakteri verilmesini takiben ilk hafta içinde önemsenmeyecek düzeyde ölümler gözlenmiştir. Fakat 2. ve 3. hafta içinde bakteri verilen balık gruplarında ölüm olmadığı görülmüştür. Deney süresince kontrol grubu olarak ayrılan balıklarda ölüm olmamıştır.



Şekil 4.1. Deneysel enfeksiyon sonucu tilapiada organlarda izlenen şişkinlikler ve inflamasyonik oluşumlar (orijinal)



Şekil 4.2. Deneysel enfeksiyon sonrası tilapialarda gözlenen kanlı sıvı birikimi ve şişmiş dalak (orijinal)



Şekil 4.3. Deneysel enfeksiyon sonrası tilapia kuyruk bölgesi lezyonları (orijinal)



Şekil 4.4. Deneysel enfeksiyon sonrası tilapia deri lezyonları (hiperemi) (orijinal)

#### 4.1.2. Enfekte Balıklarından İzole Edilen *Streptococcus iniae*'nin Fenotipik Karakterleri

Grup B streptokoklar katalaz negatif, fakültatif anaerob, gram pozitif diplokoklardır. Koyun kanlı agarda 3–4 mm büyüklüğünde gri-beyaz renkli koloniler yapmaktadırlar (Söyletir ve Över, 2002). Genellikle Beta hemolitiklerdir (Spellerberg, 2002). Günümüzde B grubuna özgül antijenik yapıları belirlemek üzere indirek immünfloresans, zıt yönlü immünelektroforez, lâteks aglütinasyon, stafilokokal koaglütinasyon, ELISA ve API gibi teknikler kullanılmaktadır. En sık olarak API testi kullanılmıştır (Holt ve ark., 1994).

Çalışmamızda mevcut bakterinin koloni morfolojisi, saf kültür oluşturma ve gram boyama tekniğinin kullanılmasıyla (Bilgehan, 2002) (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6); hareket muayenesi, asılı damla yöntemiyle; oksidaz testi, test stripine (Merck) koloninin sürülmesiyle; katalaz testi, lama bir damla %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile koloninin karıştırılmasıyla yapılmıştır. İzole edilen *Streptococcus iniae* türünün tuza gereksinimleri ve toleransları %6,5 NaCl tuz içeren peptonlu suda belirlenmiştir.

Katalaz deneyinde, hemolizlerinin görülebilmesi için koyun kanlı agara pasaj yapılmıştır. Alfa hemolitik olanlar ve hemoliz yapmayanlar şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Katalaz negatif bu bakteriler Bile Eskulin Agara ekilip 35–37 °C’de inkübe edilmiştir. % 40 safralı ortamda üreyerek eskulini hidrolize eden ve besiyerinde siyah pigmentasyon oluşturan bakteriler Bile Eskulin pozitif kabul edilip % 6,5’luk NaCl’de üreyip üremedikleri kontrol edilmiştir (Çizelge 4.3.). Bunun için % 6,5’luk NaCl içine yeni pasaj yapılmış kültürlerden ekim yapılarak 35–37 °C’de 3 saat süreyle inkübe edilmiştir. 3 saat sonunda % 6,5’luk NaCl’den koyun kanlı agara pasaj yapılarak 35–37 °C’de 18–24 saat inkübe edilmek üzere etüve kaldırılmıştır. Bu pasajlarda Gram pozitif kok üremesi üzerine bakterilerin % 6,5’luk NaCl deneyi pozitif kabul edilmiş, ardından tür ayrımı için Rapid ID32 Strep-mini Api sistemi kullanılmıştır (Becton, Dickinson and Company).

Çizelge 4.3. İzole edilen *Streptococcus* suşunun fenotipik karakterleri.

<b>Morfolojik ve Biyokimyasal Karakterler</b>	<b>Nil tilapia</b>
Hücre morfolojisi	Küresel
Gram boyama	+
Hareket	+
Kok(K)-Basil(B)	K
Katalaz	-
Hemoliz	Beta
% 10 °C’de üreme	+
%6,5 NaCl’de üreme	+

### 4.1.3. Enfekte Balıkların Biyokimyasal Karakterleri

#### 4.1.3.1. API Testi

*Streptococcus* sp. olarak belirlediğimiz bu bakterinin tür tayini Rapid ID32 Strep sistemi-mini API yöntemi ile (Bio-Merieux) yapılmıştır. Bakteriyel hastalıkların teşhisinde patojenin çabuk ve doğru identifikasyonu önemlidir. Bu sistem streptokok ve benzeri bakteri identifikasyonu için adapte edilmiş 32 testlik mini asimilasyon testlerinden oluşmaktadır. Sistem dört saatlik süre sonunda identifikasyon sağlamıştır. Sistemin çalışması kit (süspension medium, 32 kuyucuktan oluşan strip, densitometre, dispenser, steril dispenser ucu ve VPA, VPB, FB, NIN ayıraçları) ile sağlanmıştır.

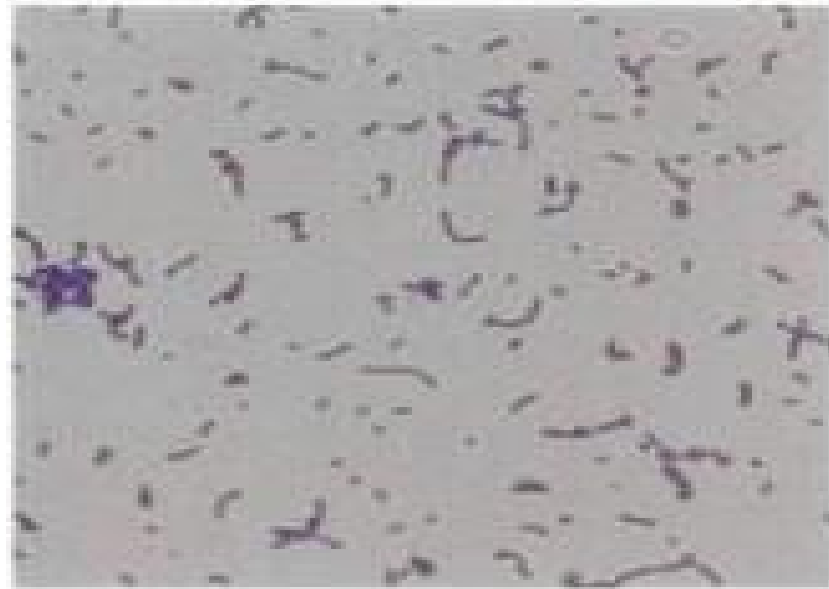
Mini API cihazı (Bio Merieux) ise okuyucu sistem olarak görev yapmış ve çalışma prensibine göre işlemsel sıra izlenmiştir. Koyun kanlı ağara yapılmış 18–24 saatlik taze kültürlerden süspansiyon besi yeri içine 4 Mc Farland yoğunluğunda inokulum hazırlanmıştır. Stripteki her kuyucuğa otomatik dispenser ile 55 µl'lik inokulum dağıtılmıştır. 35–37 °C yerine 24 °C'de 72 saat süreyle inkübe edilip, bu süre sonunda ilgili ayıraçlar damlatılmıştır. 5 dakika sonra mini API cihazında otomatik olarak okunmuş ve sonuç olarak bakterinin türü teşhis edilmiştir (Colomi ve ark., 2002).

Deniz ve tatlı su balıklarının bakteriyel patojenlerinin identifikasyonunda mini API sistemi bir çok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Baudin-Laurencin, 1981; MacDonell ve ark., 1982; Kent, 1982; Maugeri ve ark., 1983, Romalde ve Toranzo, 1991; Biosca ve ark., 1993; Grisez ve ark., 1991; Kronvall ve Hagelberg, 2002).

İzole edilen *Streptococcus* türlerinin tam otomatize Rapid ID 32 strep identifikasyon sistemi ile yapılan biyokimyasal özellikleri Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. BHIA'a yapılan ekim sonucu kolonilerden alınan örneklerin ışık mikroskobu altındaki görünümü (orijinal)



Şekil 4.6. BHIA üzerinde *Streptococcus iniae* kolonilerinin görünümü (orijinal)

Çizelge 4.4. İzole edilen *Streptococcus iniae* türünün tam otomatize Rapid ID32 Strep sistemi-mini API identifikasyon sistemi ile yapılan biyokimyasal özellikleri

<b>Biyokimyasal karakterler</b>	<b><i>Streptococcus iniae</i></b>
Piruvat	+
H <sub>2</sub> S	ND
Eskulin hidrolizis	ND
Hippurat	-
Voges-Proskauer	-
Arjinin Dihidrolaz (ADH)	+
<b>Şekerden asit üretimi</b>	
Arabinoz	-
Glukoz	+
Laktoz	-
Mannitol	+
Ramnoz	-
Salisin	-
Sorbitol	-
Trehaloz	+
Oksidaz	-

#### 4.1.4. Uygulama Sonundaki Verilerinin Plazma Değerleri

Birinci ve ikinci gruptaki deney balıkları  $3.3 \times 10^5$  kob/ml dozda bakteri ile enfekte edilmiş ve 3 haftalık deney süresince her hafta sonunda ayrı ayrı alınan kan örnekleri bazı akut faz proteinleri yönünden değerlendirilmiştir.

Deney süresince elde edilen verilere ait ortalamalar ve standart hatalar Duncan Çoklu aralık testi ile belirlenmiş ve Çizelge 4. 5.'de gösterilmiştir.

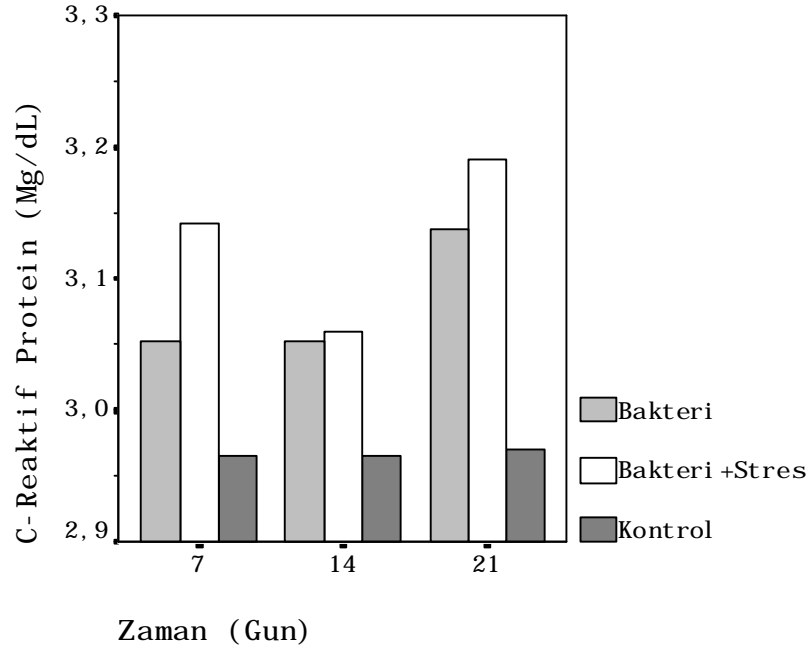
Çizelge 4.5. Tilapialarda iki grubun karşılaştırmalı sonuçları

	<b>İlk Grup</b> (Bakteri İnfek.)				<b>İkinci Grup</b> (Bakteri + Stres)			
	0*	7	14	21	0*	7	14	21
Örnekleme zamanı (gün)	0*	7	14	21	0*	7	14	21
CRP (mg/dl)	2,97	3,06	3,07	3,12	2,97	3,14	3,08	3,18
SAA (mg/dl)	2,82	2,92	3,00	3,02	2,82	3,02	3,09	3,03
Tf (d/l)	0,78	0,60	0,75	0,87	0,78	0,62	0,78	0,88
Fb (g/l)	138	132	57	42	138	102	55	38

\*: Kontrol grubu

##### 4.1.4.1. C-reaktif Protein (CRP)

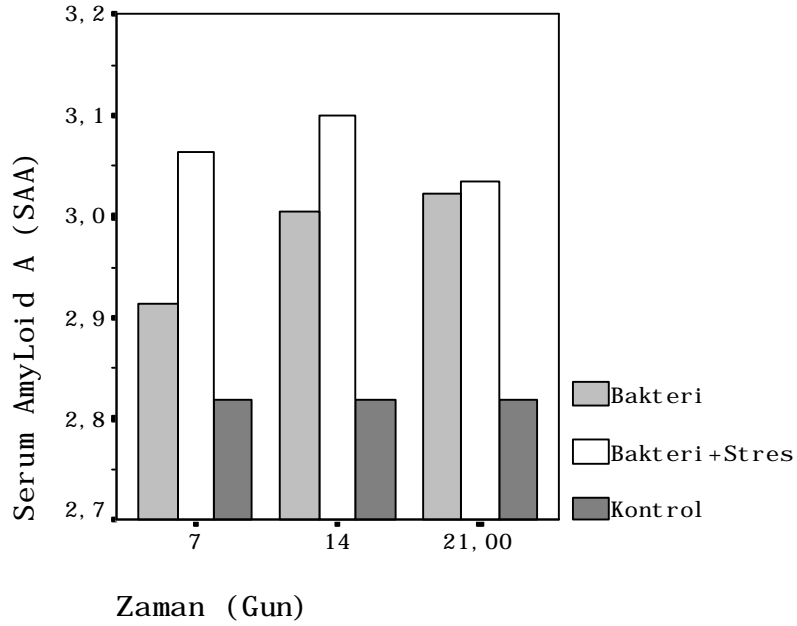
Uygulamanın birinci haftasında, *S. iniae* ile enfekte edilen ilk grup ve ikinci grup balıklarında ortalama CRP seviyeleri 3,06 ve 3,14 mg/dL (kontrol grubu 2,97 mg/dL) olarak belirlenmiştir. İkinci hafta sonunda plazma CRP seviyeleri kontrol gurubu ile karşılaştırılmış ve önemli bir azalma kaydedilmiştir ( $P < 0.05$ ). Son haftada ise (28. gün sonu) CRP seviyelerinde artışlar izlenmiştir (3,13 ve 3,18 mg/dL) (Şekil 4.7.)



Şekil 4.7. *S.iniae* ile enfekte ve stres uygulanmış (elle muamele) *S. iniae* ile enfekte grupları içeren tilapalarda C-reaktif protein seviyelerindeki değişimler

#### 4.1.4.2. Serum Amiloid A (SAA)

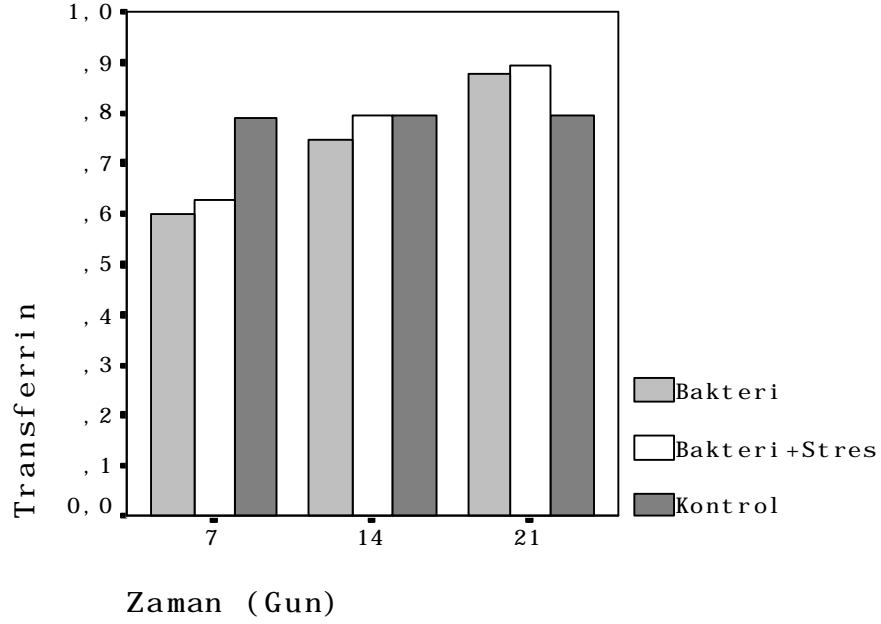
Çalışmanın ilk haftasında birinci ve ikinci gruplarda izlenen ortalama SAA değerleri 2,92 ve 3,07 mg/dL (kontrol grubu 2,82 mg/dL) olarak kaydedilmiştir. İkinci hafta sonunda, iki grupta da kandaki SAA konsantrasyonu kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve daha yüksek seviyeler belirlenmiştir fakat üçüncü hafta ilk grupta SAA miktarlarında azalmalar (3,05 mg/dl) diğer grupta ise artışlar izlenmiştir (3,04 mg/dl) (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. *S.iniae* ile enfekte ve stres uygulanmış (elle muamele) *S. iniae* ile enfekte grupları içeren tilapilarda serum amiloid A seviyelerindeki değişimler

#### 4.1.4.3. Transferin (Tf)

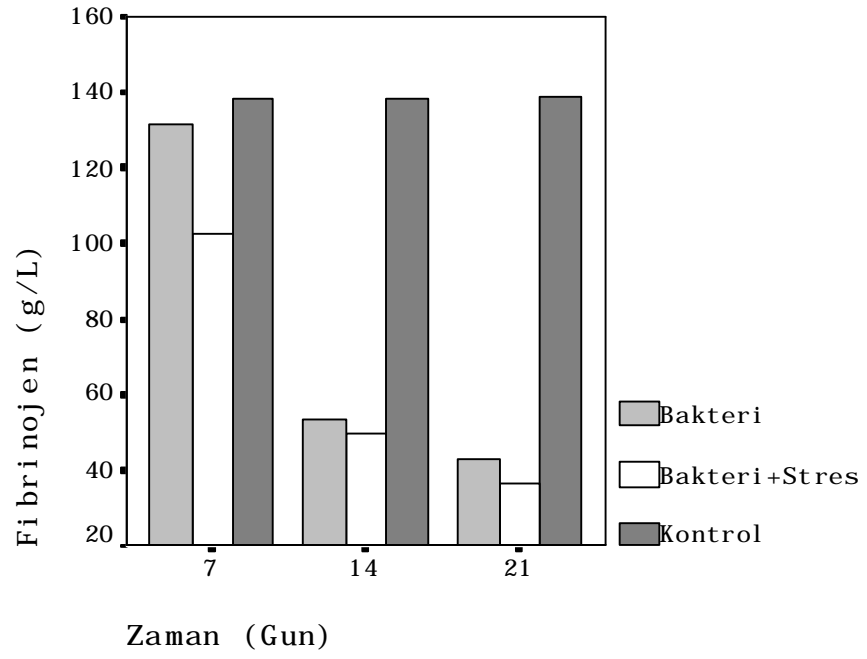
İlk hafta sonunda, Transferin değerleri kontrol 0,59 ve 0,62 d/L olarak bulunmuştur. Denemenin ikinci haftasında elde edilen verilere göre bakteri ile enfekte edilen grupta CRP ve SAA değerleri birbirine yakın olarak bulunmuş fakat kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında daha yüksek seviyelerde oldukları saptanmıştır. Diğer deney grubu için (bakteri+stres) değerler benzerlik gösterirken deney süresinin son aşamasında (3. hafta) sözü edilen tüm değerler kontrol grubundan oldukça yüksek seviyeler içermişlerdir. Yalnız negatif akut faz proteini olarak bilinen transferin değerlerinde kontrol grubundan düşük seviyeler izlenmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4. 9. *S.iniae* ile enfekte ve stres içerikli (elle muamele) *S. iniae* ile enfekte grupları içeren tilapılarda transferin seviyelerindeki değişimler

#### 4.1.4.4. Fibrinojen (Fb)

İlk grupta birinci hafta sonunda, fibrinojen değerleri (138 g/L) 132 g/L olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5.). Takip eden süreler sonunda (14. ve 21. gün) değerlerde devam eden düşüşler izlenmiştir (sırasıyla 57 ve 42 g/l). Denemenin ilk grubunda elde edilen verilere göre bakteri enfekte edilen grupta ilk hafta önemsiz bir düşüş gözlenmiş ( $P>0.05$ ) fakat ikinci ve üçüncü haftalarda ciddi düşüşler belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Diğer deney balıkları için (bakteri+stres) değerler benzerlik gösterirken deney süresinin son aşamasında (3. hafta) sözü edilen tüm değerler kontrol grubundan oldukça düşük seviyeler içermişlerdir. (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. *S.iniae* ile enfekte ve stres uygulanmış (elle muamele) *S. iniae* ile enfekte grupları içeren tilapilarda fibrinojen seviyelerindeki değişimler

## 4.2 Tartışma

Çalışmamızda, tilapia bireyleri *Streptococcus iniae* ile deneysel yolla enfekte edilerek kan plazmasındaki bazı akut faz proteinleri incelenmiştir. Araştırmada kullanılan balıklara  $3.3 \times 10^5$  kob/ml içeren *Streptococcus iniae* intraperitoneal (i.p.) olarak 0.1 ml dozunda enjekte edilerek infeksiyon grubu oluşturulmuştur. Aynı sayıda *S. iniae* enjekte edilen balık gruplarına akut bir stres faktörünün ilavesi ile diğer deney grubu oluşturulmuştur. Son grup deney balıkları kontrol grubu olarak incelenip en uygun (optimum) koşullar altında tutulmuştur. Enfekte ve kontrol grubu balıkların kuyruk venasından alınan kan örnekleri, infeksiyonun 0, 7, 14 ve 21. günlerinde bazı AFP'leri; CRP, SAA, transferin ve fibrinojen yönünden incelenmiştir.

Araştırmada ele alınan konular, sırasıyla yurt içi ve yurt dışında yapılmış araştırmalar ile birlikte değerlendirilerek aşağıda verildiği gibi tartışılmıştır.

### 4.2.1. Deneysel Oluşturulan *Streptococcus iniae* İnfeksiyonu

Streptokokal hastalıkların sıklıkla görülmemesine rağmen görüldüğü durumlarda balık çiftliklerinde toplu ölümlere neden olduğu bilinmektedir. Balık populasyonlarında stres, sekonder bir etki olarak ortaya çıkmakta ve infeksiyöz hastalık salgınlarında önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle yüksek su sıcaklıkları, yoğun stok, hasat işlemleri, balıklar üzerinde yapılan manipülasyonlar, yüksek amonyak ve nitrit düzeyleri, uygun olmayan su kalitesi vb. gibi stres koşulları, streptokokal salgınlar ile birleşerek yetiştiricilik sistemlerinde hastalığın virulansını arttırmaktadır.

Birçok Streptokok türü balıklar için patojeniktir. Sucul ortamlarda da doğal olarak bulunmaktadır, hatta bazı çiftliklerde endemik bir hastalık nedeni olabilmektedir. Bu türlerin belirlenmesi için spesifik kaynaklar maalesef yeterli değildir. Balık populasyonlarında Streptokok infeksiyonları balık türüne bağlı olarak değişmekle birlikte ağır kayıplara neden olabilmektedir. Çünkü Streptokok etkenleri ilk olarak beyni etkileyip enfekte balıkların kendi etrafında dönme (spinning) gibi

anormal davranışlar göstermesine neden olmaktadır (Ferguson ve ark., 1994). Diğer klinik belirtiler vücut renginde kararma, tek ya da çift taraflı eksoftalmus, korneada matlık, göz içinde veya etrafında, operkulumda, yüzgeç diplerinde, anal bölgede ya da bedenin herhangi bir yerinde kanamalar, vücut yüzeyinde ülserasyonlar, karında şişkinlik, zayıflık ve yüzmede dengesizlik gibi hastalık belirtileri ile karakterize edilmektedir. Ancak birçok durumda, belirtiler daha ortaya çıkmadan balıklarda artan oranlarda ölüm görülebilmektedir (Weinstein ve ark., 1997; Shoemaker ve Klesius, 1997). Karın boşluğunda kanlı bir sıvı, dalakta büyüme ve kızarıklık, kalp, karaciğer ve böbrekte değişik lezyonlar, karaciğerde solgunluk, bağırsaklarda yangı, iç organlarda sıklıkla karşılaşılan bulgulardır (Sarıhan, 2005; Akhlaghi ve Mahjor, 2004; Chang ve ark., 2002; Dönmez, 2002; Yanong ve Francis-Floyd, 2002; Eldar ve Ghittino, 1999; Al-Harbi 1994; Austin ve Austin, 1993; Kitao, 1993; Ceschia ve ark., 1992; Boomker ve ark., 1979).

Mevcut verilerden gram pozitif olarak bildiğimiz *S. iniae* hem balıkları hemde insanları enfekte etme özelliğinde (zoonoz) olan bir bakteridir. *S. iniae* 1994 yılında, tilapia hibridlerindeki bir salgından hastalık ajanı olarak bildirilen bir etkindir (Eldar ve ark., 1994), 1991 yılında ise Teksas (ABD), Ottova ve Kanada' da insan enfeksiyon vakalarının meydana geldiği rapor edilmiştir, ancak iki durumda da enfeksiyonun kaynağı tam olarak saptanamamıştır (MMWR, 1996).

Balıklar üzerinde hastalığa neden olan ve sıklıkla daha önceden de literatürlerde kaynak olarak kullanılmış birçok bakteri bulunmaktadır. Bu bakterilerin balıklar üzerindeki virülansları ve buna bağlı olarak etki alanlarında değişiklik göstermektedir. Tatlı su balıklarında en yaygın bakteriyel patojen olarak *Aeromonas hydrophila* yer almaktadır. Fırsatçı bir patojen olan bu bakteri balık çiftliklerinde optimal koşulların bozulduğu durumlarda hemen ortaya çıkabilmektedir. Diğer bir bakteriyel patojen olarak bilinen *Streptococcus iniae*, tam olarak fırsatçı bir patojen değildir, ancak diğer çevresel bakterilerden daha hızlı bir şekilde etkileyebilen önemli bir balık patojeni olup, salgınlara ve ağır kayıplara neden olabilmektedir (Shoemaker ve ark., 2000; Fuller ve ark., 2001). Ferguson ve ark. (1994), zebra balık (*Danio rerio*)' larını yüksek dozda streptokokkus konsantrasyonlarına maruz bırakmışlar enfeksiyondan sonraki 2–4 gün içinde % 100 mortalite saptamışlardır.

Sonuç olarak fazla ortaya çıkmasa da çıktığı koşullarda balık çiftliklerinde ekonomik olarak ciddi kayıplara neden olan ve özellikle tilapia balıkları üzerinde etkili olan Streptokokal hastalıklar ülkemiz açısından çok önemlidir. Özellikle Çukurova Bölgesi'nde tilapia yetiştiriciliği, çevresel faktörlerin uygunluğu ve verimlilik açısından elverişli olduğu için giderek artan bir grafik göstermektedir. Bu sebeple çalışmamızda tilapia balıkları kullanılmış ve etken olarakta *Streptococcus iniae* bakteri türü seçilmiştir.

DeneySEL (test grubu) balıklar için seçilen bakteri konsantrasyonu banyo tarzında, intramüsküler (kas içi) ya da intraperitoneal (periton boşluğu= karın zarı) yolla verildiklerinde balıkları enfekte edebilmektedirler. Hangi yolla enfekte edileceğine doğru karar verilmelidir. Birçok araştırmacı doğal yolla veya deneysel olarak enfekte edilmiş balıklardaki hastalığın akut ve subakut formları arasındaki farkları, balıkları farklı yollarla enfekte ederek saptamışlardır. Buna göre araştırmacılar, bakteriyi banyo tarzında ve intraperitoneal olarak uyguladıkları zaman, ilk 48 saat içinde mortalitelerin yüksek olduğu akut formu tespit etmişlerdir (Boomker ve ark., 1979; Minami ve ark., 1979). Ancak oral yolla yapılan enfeksiyon modelinde ise hastalık belirtilerinin dereceli olarak görüldüğü subakut formun şekillendiği bildirilmiştir (Foo ve ark., 1985).

Balık enfeksiyondan korunmak için patojenin girişini takip eden süre içinde hızlı bir şekilde doğal mukozal immünite sistemini devreye sokar. Özellikle intramüsküler ya da intraselomik olarak patojen vücuda verildiğinde bu etkileşim daha hızlı olmakta ve hastalığın ortaya çıkışı ve virülansı baskılanmaktadır.

Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda intraperitoneal yol tercih edilmiştir. Çünkü periton içine verdiğimiz *S. iniae* direk iç organlara nüfuz etmiş ve istenilen amaca ulaşmamızı sağlamıştır.

Çalışmamızda iki hedef amaçlanmıştır. İlk bölümde Tilapia'lar üzerinde *S. iniae*'nin (hastalandırıcı doz) etkileri incelenirken; diğer bölümünde *S. iniae*'ye ilave olarak akut bir stresör (elle manipülasyon) uygulayarak kan plazmasında normal şartlarda da mevcut olan akut faz proteinlerindeki değişimler gözlenmiş ve tartışılmıştır.

Russo ve ark. (2006) *S. iniae* ile hastalık modeli oluşturmuş ve bu amaçla belirli bir zaman aralığında, daha önceden sayısı belirlenmiş balıkları öldürmek için gereksinim duyulan lethal bakteri dozunu (LD50) hesaplayarak, deney grubuna uygulamışlardır. Yapılan birçok araştırmada ise, hedef bakteri CFU (koloni oluşturan birim) dozu olarak seçilmiş ve 14 günlük süre içinde balıkların %70'ini öldüren doz lethal doz olarak belirtilmiştir. (Kimura ve Kusuda, 1979; Nordmo ve Ramstad, 1997; Perera ve ark., 1997; Sako, 1998). Bromage ve Owens (2002), barramundi (*Lates calcarifer*) balıklarını deneysel olarak *S. iniae* ile enfekte etmiş ve çok düşük bakteriyel sayılarda bile morbidite (popülasyonda hastalığa tutulanların sayısı) ve mortalite oranlarını belirlemişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise deney balıklarımız üzerinde  $3.3 \times 10^5$  CFU/ ml miktarında bakteri uygulanmış ve bu dozun lethal doz olarak değil, ancak hastalık oluşturuca konsantrasyona sahip doz olduğu saptanmıştır. Buna göre enfeksiyondan sonraki ilk bir hafta içinde birinci deney grubunda %17, diğerinde ise %21 mortalite oranı gözlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Araştırmamız kapsamında *S. iniae* ile enfekte edilen balıklarda eksternal bulgular olarak, deri ve kuyruk yüzgecinde hiperemik lezyonlar (Şekil 4.3., Şekil 4.4.), balık hareketlerinde aktivite düşüklüğü (letarji), havuz köşelerinde ve dip kısımlarında hareketsiz durma, deride koyulaşma gözlenirken, internal bulgular olarak ise, bağırsaklarda sarı seröz sıvı birikimi, dalakta büyümeler görülmüştür. (Şekil 4.1., Şekil 4.2.)

Yetiştiriciliği yapılan tilapialar üzerinde deneysel olarak enfekte edilen yada doğal *S. iniae* infeksiyonlarının etkilerini araştırmak için birçok çalışma bulunmaktadır (Bowser ve ark., 1998; Perera ve ark., 1998; Plumb, 1994; Roberts, 2001; El-Bouhy, 2002). *S. iniae* ile enfekte olmuş ölmek üzere olan tilapia bireylerinde vücut yüzeyinde (Bowser ve ark., 1998), ağız ve operküler etrafında, yüzgeç ile anüs tabanında dermal hemorajiler (deri üzerinde kan odakları) (Perera ve ark., 1998) bildirilmiştir. Aynı zamanda, Perera ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada oryantasyon (uyum) kaybı, korneal opasite, ekzoftalmus ve göz biçim bozukluğu saptamışlardır.

Bu araştırmacılar daha önceki verileri incelemiş ve *S. iniae*'ye maruz bırakılan balıklar üzerinde deri ve göz lezyonlarına rastlamamışlardır. Fakat koyulaşmış deri pigmentleri, dip kısımda yüzme, ani atlamalar ve düşüşler, iştah kaybı gibi bulguları daha fazla gözlemlemişlerdir.

Evans ve ark. (2000), Hibrid çizgili levrek ve tilapialar üzerinde *S. iniae*'nin etkilerini incelemek amacıyla, yüksek ve düşük koloni konsantrasyonlarında bakteri kullanmışlardır. Bunun yanında bu balıkların burun deliklerinden verilmek suretiyle ikinci kez *S. iniae* inokule etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, daha düşük doz uyguladıkları balıklarda önemsenmeyecek derecede ölüm oranı saptamalarına rağmen hastalık semptomlarının meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca göz inokulasyonundan sonra iki balık türünde de hastalık belirtilerine rastlamamışlardır.

Shoemaker ve ark. 2000, *Streptococcus iniae* ile deneysel enfekte ettikleri tilapialarda, doza bağlı olarak önemli mortaliteler bildirmişlerken, Perera ve ark. 1997 yılında yaptıkları benzer çalışmada mortaliteler gözleyemediklerini ve enfeksiyondan 4 gün sonra *S. iniae*'yi izole edemediklerini belirtmişlerdir. Sonuçlarda gözlenen bu farklar, araştırmacıların uyguladıkları balık türleri ve buna bağlı olarak çevre koşullarındaki değişiklik ve farklı enfeksiyon dozlarından oluşabilmektedir.

Bu bulgular *S. iniae* enfeksiyonlarından elde edilenlerle aynı olarak kabul edilmektedir. Buna ilaveten hastalığa dair farklı bulgular doğal veya deneysel yollarla oluşturulan *S. iniae*'ye ve enfeksiyon rotalarına göre çeşitlenebilmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz eksternal ve internal bulguların bazıları daha önce bildirilen literatürlerle benzerlikler gösterebilir enfeksiyonun etki mekanizması ve sürelerindeki değişikliklerin uygulanan bakteri dozundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### 4.2.2. Deney Gruplarında İzlenen Akut Faz Yanıtları

İnflamasyon, homeostazisin devam etmesi için vücuda giren patojene verilen bir cevaptır. Akut faz proteinleri inflamasyon ya da doku hasarının nonspesifik komponentleri (inflamasyon, otoimmün hastalık vb.) olup ya potansiyel bir patojen

ile mücadele etmek veya vücudu korumak için hasar görmüş olan dokudan salınan sitokinlerle akut faz proteinlerine verilen yanıt boyunca karaciğer tarafından üretilen proteinlerdir. (Kushner ve ark., 1981; Dinarello, 1983; 1989; Blackburn, 1994; Gruys ve ark., 1994; Ingenbleek ve Young, 1994). Bunlar bakteriyel, viral gibi yabancı maddelerin konağa girişi ile serum seviyelerinde oldukça fazla yüksek değerlere ulaşmaktadır. Örneğin insanlarda doku hasarı ve inflamasyon durumlarında CRP ve SAA 24–48 saat içinde 1000 kat kadar artabilmesine rağmen, fibrinojen, seroplazmin gibi AFP'leri ise daha hafif bir artış (%60–70) göstermektedir (Laurell, 1985; Thompson ve ark. 1992). Bunun tam tersi etki gösteren transferin negatif akut faz proteini olup inflamasyon boyunca hafif düşüşler ile kendini ele vermektedir. Özellikle CRP balıklarda da tanımlanmış ve major AFP olarak literatürlerde yer almaktadır (Karsten and Rice, 2004; Hoole ve ark., 2003).

CRP; fosfokolin ve galaktoz içeren polisakkaritler gibi bakteri, mantar ve parazitlerin yüzeylerinde de sıklıkla mevcut olan çeşitli ligandları tanımakta, bunlar vasıtasıyla komplemanı aktive etmektedir (Pepys ve Baltz, 1983). CRP, inflamasyonun olduğu yerde in vivo olarak lokalize olup IL-6 ve TNF-alfa sentezini stimüle ederek seviyelerinde artışlarla patojenin aktivitesini bloke etmektedir (Plotnikoff ve ark., 2006). CRP'nin klinik belirtisi hem insanlar hem balıklar hemde diğer hayvan grupları için infeksiyöz ve inflamator hastalıkların teşhisi için diagnostiktir. Ancak inflamasyon boyunca verilen yanıt türleri arasında farklılık gösterebilmektedir. İnsanlarda tanımlanan ilk ve major akut faz proteini olan CRP, tedaviye verilen yanıt, hastalığın seyri ve inflamator lezyonların oluşumu hakkında gerekli veriyi sağlamada oldukça önemlidir. Patojen kaynaklı hastalıklar, travmatik oluşumlar gibi birçok durumda dolaşımdaki konsantrasyonlarında artışlar göstermektedir (Pepys and Baltz, 1983). Bunun yanında diğer akut faz proteinlerinden olan SAA, fibrinojen, haptoglobulin (hp) gibi proteinler inflamasyon yanıtı boyunca konsantrasyonlarında daha düşük seviyelerle kendilerini göstermektedirler (Laurell, 1985).

CRP, SAA; insan, köpek, balık ve geviş getiren hayvanların serum konsantrasyonlarında çok yüksek değerlere ulaşırken, kedi ve koyun gibi canlılarda daha düşük düzeyde seyredebilir (Conner et al. 1988a; Conner et al. 1988b; Eckersall

et al. 1996; McIntyre ve ark., 1997).

Eckersall ve ark. (1996), deneysel amaçlı yaptıkları uygulamalarda terebentin (neft yağı) uyarısına karşı AFY'ını belirlemişlerdir. Buna göre Hp ve CRP değerlerinin konsantrasyonlarında 24 içinde artışlar, 48 saat içinde ise pik seviyeler gözlemlenmişler, 6 gün sonunda normal değerlere düştüklerini saptamışlardır. Bu çalışmada alfa1-glikoprotein (AGP) değerlerinde değişimler bildirilmemiştir. Bunun tam tersine domuzlar üzerinde çalışan Itoh ve ark. (1993), meningitis ya da pnömoni gibi infeksiyöz hastalıklarda AGP'nin daha önemli AFP'ni olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarda izlenen bu farkların infeksiyöz ve inflamator uyarımı arasındaki bir farktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda iki deney grubu oluşturulmuştur. İlk gruba sadece belirlenen dozda *S. iniae* verilmiş, diğer gruba ise bakteri enjeksiyonunu takiben 15 dakikalık süre zarfında akut bir stres faktörü (elle rahatsızlık) uygulanmıştır.

Balıklar 4 hafta gözlem altında tutulmuş ve yemlenmelerine devam edilmiştir. Her hafta sonunda alınan kan örnekleri CRP, SAA, transferin ve fibrinojen yönünden analiz edilmiş, gruplar istatistiksel olarak T-testi yardımıyla karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi tartışılmıştır.

Araştırmamızın ilk bölümünde *S. iniae* ile infeksiyondan hemen sonra CRP ve SAA seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında yükselme eğilimi göstermişler ve bu süreç 21 gün boyunca önemsenmeyecek derecede devam etmiştir ( $P>0.05$ ). Fakat diğer grupta (enfekte ve akut stres) ilk hafta CRP ve SAA değerleri nerdeyse 1,5 kat artmıştır. İkinci hafta (14. gün) kontrol grubuna kıyasla yüksek olmakla birlikte CRP'de azalma SAA' da ise bir miktar artış kaydedilmiştir. 3. hafta CRP artış gözlenirken SAA seviyelerinde düşme eğilimi gözlenmiştir (Tablo 1). Transferin seviyeleri ise ilk hafta her iki grupta içinde azalmalara neden olmuş fakat izleyen haftada kontrol seviyelerine ulaşmışlardır (Şekil 4.9.). Fibrinojen değerlerinde enfeksiyonu izleyen tüm deneysel dönem içinde her iki grupta düşüşler kaydedilmiştir (Şekil 4. 10.).

Hepatositlerdeki intraselüler streptokokozun önemi, mevcut literatürlerde yeterli olarak açıklanmasa da, karaciğer patojenlerin integral bir elementi olan intraselüler bir bölmede çoğalan birçok bakteriyel patojenlerin üreme yeri olarak

bildirilmiştir (Stevens, 1995). Herhangi bir patojen konağa girdiği andan itibaren seviyelerini giderek arttıran, insanlar kadar balıklar içinde önemli olan, akut faz proteinlerinin de orijini yine karaciğerdir. Karaciğer tarafından üretilen bu proteinler farklı sitokinler tarafından uyarılmakta ve birçok balıkta doku zararı iç organlarda şişlik ve kanlanma gibi bulgular ortaya çıkmaktadır (Bayne ve ark., 2001). Çalışmamızda gözlemlediğimiz iç organlarda meydana gelen dokusal değişikliklerle bu araştırmacıların belirttikleri bulgular paralellik göstermektedir.

Bayne ve Gerwick (2001), memelilerde akut faz proteinleri olarak bilinen proteinlerden CRP, serum amiloid P (SAP) ve birçok komplement sistemin komponentlerini kemikli ve kıkırdaklı balıklardan, transferin ve trombin gibi proteinleri de kemikli balıklar üzerinde yaptıkları çalışmada bildirmişlerdir. Fakat bu araştırmacılar sadece CRP seviyelerinde artışlara rastlamışlardır. Bu çalışmada plazma akut faz protein miktarlarından yalnız CRP'nin bütün gruplarda kontrol grubuna oranla yüksek çıkmasına rağmen araştırma bulgularımıza uygun şekilde kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür.

Balıklar arasında plazma protein profillerinde belirlenen bireysel farkların, genetik farklılıklar ve partiküler bir antijene daha evvel maruz bırakılıp bırakılmadığına bağlı olarak değişim gösterdiği bilinmektedir. Çalışmamızdaki farklılıkların bu nedenden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Villarroel ve ark. (2008), gökküşağı alabalığını (*O. mykiss*) *Flavobacterium psychrophilum* ile deneysel olarak enfekte etmişler ve enfeksiyon sonrası kan plazmasında, tüm omurgalılarda major akut faz proteinlerinden ve doğal immünitinin efektörü olan SAA'nın seviyelerindeki değişimleri izlemişlerdir. Elde ettikleri verilere göre, enfeksiyon sonrasında SAA seviyelerinin kontrol grubuna nazaran çok yüksek seviyelere ulaştığını bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların bulguları çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle paralellik göstermektedir. Fakat çalışmamızda enfeksiyon sonrası SAA miktarının, plazmadaki değerlerinin çok yüksek olmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar göstermektedir ki, balık türleri ve uygulanan biyolojik etken farklı olmasına rağmen, enfeksiyon sonrası akut faz proteinlerinin en büyük belirteçlerinden biri olan Serum amiloid A'nın izlediği seyir ve etkileri aynı olabilmekte ve genel olarak artma eğilimi göstermektedir.



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yurdumuzda 1970'li yıllarda gökkuşağı alabalığı ile başlayan kültür balıkçılığı son yıllarda denizlerde yapılan çipura ve levrek yetiştiriciliği ile çok geniş boyutlar kazanmıştır (Alpbaz 1990). Yurdumuzda kültür balıkçılığın gelişmesine paralel olarak bu işletmelerde bakteriyel (Baran v e ark., 1994, Timur 1991, Diler ve Kubilay 1996, Timur and Timur, 1985), viral (Timur 1991) ve paraziter hastalıklar da dünyanın diğer ülkelerinde olduğu gibi yurdumuzda da son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Streptococcus, Enterecoccus, Lactococcus gibi gram pozitif hareketsiz kokların klasifikasyonlarında halen bazı güçlükler olduğu bildirilmektedir. (Austin ve Austin, 1999; Chen ve ark., 2001)

Patojenler balıkların vücuduna girdiğinde sellüler ve humoral non-sfesifik savunma mekanizmaları devreye girmektedir. Komplement ve lizozim gibi birçok çözülebilir faktör ile birlikte bu savunmanın oluşmasına yardımcı olan en önemli hücreler fagositlerdir, bunun yanında balıklar üzerinde önemli olan diğer çözülebilir faktörler ise plazma akut faz protein (AFP) miktarlarında gözlenen değişimlerdir. AFP, enfeksiyonu takiben ilk artan komplement sistemin vazgeçilmez komponentleri olarak bilinmektedir. Bir kısmı enfeksiyona bağlı olarak artarken bir kısmı ters olarak etki gösterebilmektedir. Balıkların non-spesifik savunma mekanizmalarının çoğu çözülebilir faktörlerdir ki bunlarda AFP olarak bildirilmiştir. En hızlı artan parametre C-reaktif protein ve Serum amiloid A değerleridir ki stres durumlarında opsonizasyon bir faktör olarak rol oynamaktadırlar. İnfeksiyonun şiddetine bağlı olarak 100 kata kadar artışlar gösterebilmektedir ve bu artış enfeksiyonun ilk gününden itibaren izlenmektedir. Transferin ise balıklarda koruyucu bir rol üstlenmekte olup enfeksiyonun şiddetine ters olarak etki gösterip değerleri enfeksiyonu takiben hızla azalmaktadır.

Balık hastalıklarına gerek yurdumuzda gerekse yurt dışı yayınlarında yer alan mevcut literatürlerde oldukça fazla yer verilmişken, AFP'lerinin balık hastalıklarındaki rolü üzerinde yeterince yaygın olmadığı yapılan incelemelerimiz neticesinde saptanmış olup bu konu üzerine durma gereği hissedilmiştir ve özellikle biyolojik bir etkene maruz kalma durumlarında hemen seviyelerinde artışlar şeklinde

kendini belli eden AFP'leri erken teşhis amacıyla belirlemek ve yetiştiricilik ünitelerindeki bakteriyel salgın durumlarında ağır kayıpları en aza indirmek açısından da göz ardı edilemeyecek kadar önemli bir konudur.

Sonuç olarak, akut faz proteinlerinin işlevleri ile etkileşimlerinin bilinmesi, akut faz yanıtını başlatan, süresini ve şiddetini etkileyen faktörlerin anlaşılması, infeksiyöz ve inflamatuvar hastalıkların tanısı ile tedavisinde de önemli bir adım oluşturmaktadır.

## KAYNAKLAR

- ADLER, S.M., DENTON, R.L., 1975. The erythrocyte sedimentation rate in the newborn period. *J. Pediatr*, 86: 942–948.
- ALDERSON, J., 2003. Guppy diseases. <http://www.petsforum./ppga/diseasesart>.
- AKHLAGHI, M., MAHJOR, A.A., 2004. Some histopathological aspects of streptococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24: 132-136.
- ANDREWS, C., A. AXELL, N. CARRINGTON., 1988. An A-Z of common pests and diseases, In: *The Manual of Fish Helth*. (Eds.: G.Rogers), Chapter 6, Salamender Books Ltd., Italy, 102-157pp.
- AL-HARBI, A.H., 1994. First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia, *Aquaculture*, 128: 195–201.
- ALPBAZ, A. 1990. Deniz Balıkları Yetiştiriciliği. Ege Üniv. Su Ürünleri Yüksekokulu Yayınları No: 20, Ege Üniv. Basımevi, İzmir.
- ALSEMGEEST, S.P.M., 1994. Blood Concentrations of Acute Phase Proteins in Cattle as Markers for Disease. PhD Thesis, Utrecht University, Utrecht, the Netherlands,
- ALSEMGEEST, S.P.M., KALSBECK, H.C., WENSING, T., KOEMAN, J.P., VAN EDEREN, A.M., GRUYS, E., 1994. Concentrations of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) as parameters of inflammatory diseases in cattle. *Vet. Quart.*, 16: 21-23.
- ANONYMOUS., 1993. SPSS for Windows Advanced Statics Release 6.0., 578p.
- ATLAS, R.M., WILLIAMS, J.F, HUNTINGTON, M.K., 1995. *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Appl Environmental Microbiology*, 61: 1208–1213.
- ATLAS, R.M., BROWN, A.E., AND PARKS L.C., 1995. *Laboratory Manual of Experimental Microbiology*. Mosby-Year Book, Missouri. 119-127pp.

- AUSTIN, B., AUSTIN, D.A., 1993. Bacterial Fish Pathogens, Ellis Horwood Ltd. Chichester. 384p.
- AUSTIN, B., and AUSTIN, D.A., 1999a. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, 3rd ed. Praxis Publishing, Chichester, U.K. 335–344pp.
- AUSTIN, B. and AUSTIN, D.A., 1999b. Chapter 2 -Characteristics of the diseases. *In* Bacterial Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. 13–15pp.
- BABU, R., AGARWAL, S.B., DĪXĪT, B.S., BANERJĪ, R., 2002. Effect of seed-borne fungi on oil content of *Strychnos nux-vomica* L. seeds. J. Oil Technol. Assoc., 34: 49 – 51.
- BARAN, İ., KUMLUTAŞ, Y., KASKA, Y. and TÜRKOZAN, O., 1994. Research on the amphibia, reptilia and mammalia species of the Köyceğiz-Dalyan Special Protected Area. Tr. J. of Zoology, 18: 203–219.
- BAYNE, C.J., and GERWICK, L., 2001. The acute phase response and innate immunity of fish. Dev. Comp. Immunol, 25: 725–743.
- BAUDIN LAURENCIN, F., 1981. Fish vibrio strains antisera in France. Int. Symp. on fish Biologics : Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A. Develop. Biol. Standard., 49: 257 - 259.
- BAUMANN, H., GAULDIE, J., 1990. Regulation of acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. Mol Biol Med, 7: 147–159.
- BENSON, M.D., ALDO-BENSON, M. 1979. Effect of purified protein SAA on immune response in vitro: mechanisms of suppression. J Immunol., 122: 2077–2082.
- BERCOVIER H., GHI.LINO C., ELDAR A., 1997. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. Dev. Biol. Stand., 90: 153–160.
- BEUTLER, B., CERAMI, A., 1986. Cachectin/Tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. Immunol Res, 5: 281–293.

- BİLGEHAN, H., 1995. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Vajinitisler. Barış Yayın. Fakülteler Kitabevi, 2. Baskı, 390- 393.
- BİLGEHAN, H., 2002. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, 777, İzmir.
- BIOSCA, E.G., ESTEVE C., GARAY E., AMARO, C., 1993. Evaluation of the API 20E system for identification and discrimination of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2. Journal of Fish Diseases,16:79-82.
- BLACKBURN, W.D., 1994. Validity of acute phase proteins as markers of disease activity. J Rheumatol., 21:9–13.
- BODUR, H., ŞENCAN, M., DÖKMETAŞ, İ., ELALDI, N., 2006. C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 28: 27 – 32.
- BONE, R.C., 1991. The pathogenesis of sepsis. Ann Intern Med., 115: 457-469.
- BONE, R.C., 1992. Modulators of coagulation. A critical appraisal of their role in sepsis. Arch Intern Med., 152: 1381-1389.
- BONE, R.C., FISHER, C.J., CLEMMER, T.P., SLOTMANN, G.J., METZ, C.A., BALK, R.A., 1989. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. Crit Care Med., 17: 389-393.
- BOOMKER, J., IMES, G.D., CAMERON C.M., NAUDE, T.W., SCHOONBEE, H.J., 1979. Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 46: 71–77.
- BOWSER, P., WOOSTER, G., GETCHELL, R., 1998. *Streptococcus iniae* infection of tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. J World Aquacult Soc., 29: 335–339.
- BROMAGE, E.S., THOMAS, A. and OWENS, L., 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Diseases of Aquatic Organisms, 36: 177–181.
- BROMAGE, E. S., and OWENS, L., 2002. Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: Effects of different routes of exposure. Diseases of Aquatic Organisms, 52: 199–205.
- BULLOCK, A.M., 1978. Laboratory methods in fish pathology, In: Fish Pathology,(Eds.: Roberts R.J.), Bailliere Tindall, London, 391-400pp.

- CHEN, T.C., J. H. YOON, K. J. ST. CROIX, AND E. S. TAKLE, 2001: Suppressing impacts of the Amazonian deforestation by global circulation change. Bull. Amer. Meteor. Soc., 82: 2209–2216.
- CHANG, P.H., LIN, C.W., LEE, Y.C., 2002. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 22: 319-327.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL and PREVENTION., 1996. Invasive infection due to *Streptococcus iniae* Ontario, 1995–1996. Morb. Mortal. Wkly. Rep., 45: 650-653.
- CESCHIA, G., GIORGETTI, G., GIAVENNI, R., SARTI, M., 1992. A new problem for Italian trout farms: Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 12: 71-72.
- COLLINS, R., 1993. Principles of Disease Diagnosis. In “aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine”, (Eds: L. Brown), Pergamon Press. First edition, 447p.
- COLORNI, A., DIAMANT, A., ELDAR, A., KVITT, H., ZLOTKIN, A., 2002. *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes. Dis Aquat Org, 49: 165–170.
- CONNER, J.G., ECKERSALL, P.D., FERGUSON, J., DOUGLAS, T.A., 1988a. The acute phase response in the dog following surgical trauma. Res Vet Sci, 45: 107–11.
- CONNER, J.G., ECKERSALL, P.D., WISEMAN, A., AITCHISON, T.C., DOUGLAS, T.A., 1988b. Bovine acute phase response following turpentine injection. Res. Vet. Sci., 44: 82-88.
- DİLER, Ö., KUBİLAY, A., 1996. Gökkuşuğu alabalıklarında yüksek mortaliteye neden olan hemorajik septisemi etkeni *Pseudomonas* sp. üzerine bir çalışma (Poster). II. International Symposium on Aquatic Products September 21–23, İstanbul, Türkiye.

- DINARELLO, C.A., 1983. Pathogenesis of fever during hemodialysis. *Contr Nephrol.*, 36: 90–99.
- DINARELLO, C.A., 1984. Interleukin–1 and the pathogenesis of the acute phase response. *The New England Journal of Medicine*, 311: 1413–1418.
- DINARELLO, C.A., 1989. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol.*, 44: 153–205.
- DOW TON, S.B., COLTEN, H.R., 1988. Acute phase reactants in inflammation and infection. *Sem. Hematol.*, 25: 84-90.
- DÖNMEZ, A.E., 2002., *Tilapia (Oreochromis niloticus )'larda Deneysel Streptococcus iniae Enfeksiyonunda Oluşan Histopatolojik Bulguların ve Bazı Kan Parametrelerinin İncelenmesi.* Çukurova Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Su ürünleri Anabilim dalı, (Yayınlanmamış doktora tezi), 72s.
- ECKERSALL, P.D., CONNER, J.G., 1988. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet Res Comm*, 12: 169–178.
- ECKERSALL, P.D., SAINI, P.K., MCCOMB, C., 1996. The acute-phase response of acid-soluble glycoprotein, alpha(1)-Acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and c-reactive protein, in the pig. *Veterinary Immunology And Immunopathology*, 51: 377–385.
- ECKERSALL, P.D., 1999. The acute phase response in animals textbook of the Japanese Society of veterinary clinical pathology 10–21.
- ECKERSALL, P.D., 2000. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as marker of disease in animals. *Revue Med. Vet.*, 151: 577-584.
- ECKERSALL, P.D., 2004. The time is right for acute phase protein assay. *The veterinary journal*, 168: 3–5.
- EL-BOUHY, A. M., 2002. Studies on streptococcosis in some fresh water fishes in relation to aquatic birds. Ph. D. Thesis Faculty of Veterinary Medicine Zagazig University.

- ELDAR, A., BEJERANO, Y., BERCOVIER, H., 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*, 28: 139–143.
- ELDAR, A., BEJERANO, Y., LIVOFF, A., HOROVITCZ, A., BERCOVIER, H., 1995b. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet Microbiol* 43: 33–40.
- ELDAR, A., GHITTINO, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases, *Diseases of Aquatic Organisms*, 36: 227-231.
- ELDAR, A., FRELIER, P.F., ASANT, L., VARNER, P.W., LAWHON, S., BERCOVIER, H., 1995a. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicaemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 840–842.
- ELDAR, A., PERL, S., FRELIER, P.F., BERCOVIER, H.B., 1999. Red drum (*Sciaenops ocellatus*) mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. *Diseases of Aquatic Organism*, 36: 121–127.
- EYNGOR, M., ZLOTKIN, A., GHITTINO, C., PREARO, M., DOUET, D.G., CHILMONCZYK, S., ELDAR, A., 2004. Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean Countries, *Applied and Environmental Microbiology*, 7: 5132–5137.
- EVANS, J.J., SHOEMAKER, C.A. AND KLESIUS, P.H., 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. *Aquaculture*, 189: 197–210.
- FERGUSON, H.W., MORALES, J.A. AND OSTLAND, V.E., 1994. Streptococcosis in aquarium fish, *Diseases of Aquatic Organisms*, 19: 1-6.
- FOO, J.T.W., HO, B., LAM, T.J., 1985. Mass mortality in *Siganus canaliculatus* due to streptococcal infection. *Aquaculture*, 49: 185–195

- FULLER, J.D., BAST, D.J., NIZET, V., LOW, D.E., AZAVEDO, J.C.S., 2001. *Streptococcus iniae* virulence is associated with a distinct genetic profile. *Nucleic Acids Res.*, 21: 4407–4414.
- GÅNHEIM, C., HULTÉN, C., CARLSSON, U., KINDAHL, H., NISKANEN R., WALLER, K.P., 2006. The Acute Phase Response in Calves Experimentally Infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 50: 183–190.
- GARTHNER, L.P., HIATT, J.L., 1997. *Collor Textbook of Histology*. Philadelphia, WB Saunders Company, 109–131.
- GERSHOV, D., KIM, S., BROTH, N., ELKON, K. B., 2000. C-Reactive Protein Binds to Apoptotic Cells, Protects the Cells from Assembly of the Terminal Complement Components, and Sustains an Antiinflammatory Innate Immune Response: Implications for Systemic Autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 192: 1353-1364
- GERWICK, L., STEINHAEUER, R., LAPATRA, S., SANDELL, T., ORTUNO, J., HAJISEYEDJAVADI, N. AND BAYNE, C., 2002. The acute phase response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma proteins to viral, bacterial and fungal inflammatory agents. *Fish Shellfish Immunol*, 12: 229–42.
- GORDON, A.H., KOY, A., 1985. *The Acute Phase Response to Injury and Infection. The Roles of Interleukin 1 and Other Mediators*. Elsevier, Amsterdam.
- GRISEZ L., CEUSTERS, R., OLIEVER, F., 1991. The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. *Journal of Fish Diseases*, 14: 359–365.
- GRUYS, E., OBWOLO, M.J., TOUSSAINT, M.J.M., 1994. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.*, 64: 1009–1018.

- GRUYS, E., TOUSSAINT, M.J.M., LANDMAN, W.J.M., TIVAPASI, M., CHAMANZA, R., VAN VEEN, L., 1999. Infection, Inflammation and Stress Inhibit Growth. Mechanisms and Non-specific Assessment of the Processes by Acute Phase Proteins. *In: Wensing, T. (Ed.), Production Diseases in Farm Animals. 10th International Conference, 1998. Wageningen Press, Wageningen, 72–87pp.*
- GRUYS, E., VANEDEREN, A.M., ALSEMGEEST, S.P.M., KALSBECK, H.C., WENSING, T., 1993. Acute-phase protein values in blood of cattle as indicator of animals with pathological processes. *Archiv Fur Lebensmittel Hygiene, 44: 107–109.*
- GÜRGÜN, V., ve HALKMAN, K., 1990. Mikrobiyolojide sayım yöntemleri. gıda teknoloji derneği, yayın no 7. Ankara.
- GÜVENER, R.P., 2001. Bazı akvaryum balıklarında görülen *Aeromonad* enfeksiyonlarının teşhisi üzerinde bir çalışma. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, 1-44s.
- HAYRAN, M., ÖZDEMİR, O., 1995. Bilgisayar İstatistik ve Tıp Hekimler Yayın Birliği HYB. Medikal Araştırma Birimi MEDAR, Ankara, 484s.
- HEINRICH, P.C., CASTELL, J.C., ANDUS, T., 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J., 265: 621–636.*
- HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS. S.T., 1994. *Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins. 485–487 s. Baltimore, Maryland, USA.*
- HOOLE D., LEWIS J.W., SCHUWERACK P.M., CHAKRAVARTHY C., SHRIVE A.K., GREENHOUGH T.J., CARTWRIGHT J.R., 2003. Inflammatory interactions in fish exposed to pollutants and parasites: a role for apoptosis and C reactive protein. *Parasitology, 126: 71- 85.*

- IHSAK R, HASSAN K., 1989. The erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, plasma fibrinogen and viscosity in chronic renal disease patients with infection, *Malays J. Pathol.*, 11: 29–31.
- INGENBLEEK, M., YOUNG, V., 1994. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Ann. Rev. Nutr.*, 14:495–533.
- ITOH, H., TAMURA, K., IZUMI, M., MOTOI, Y., FUNAYAMA, Y., 1993. Characterization of serum alpha-1 acid glycoprotein in fetal and newborn calves during development. *American Journal of Veterinary Research*, 54: 591–595.
- JENSEN, L. E., HINEY, M. P., SHIELDS, D. C., UHLAR, C. M., LINDSAY, A. J., WHITEHEAD, A. S., 1997. Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *J. Immunol.*, 158: 384-92.
- JENSEN, L.E., WHITEHEAD, A.S., 1998. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute phase response. *Biochem. J.*, 334: 489–503.
- JESSE D. M., MELODY N. N., 2003. Zebrafish as a model host for streptococcal pathogenesis. *Acta Tropica*, 91: 53–68.
- KARSTEN, A.H. and RICE, C. D., 2004. C-Reactive protein levels as a biomarker of inflammation and stress in the Atlantic sharpnose shark (*Rhizoprionodon terraenovae*) from three southeastern USA estuaries. *Mar. Environ. Res.*, 58: 747-51.
- KENT, M. L., 1982. Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fish using API 20E (Analytab Products) multitube test strips. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 39: 1725–1729.
- KERN W. F., 2005. PD ve Hematoloji, Hemostaz ve Tromboz. 1. Baskı. 381-400s.
- KIMURA, H., KUSUDA, R., 1979. Studies on the pathogenesis of streptococcal infection in cultured yellowtails *Seriola* spp.: effect of the cell free culture on experimental streptococcal infection. *J Fish Dis*, 2: 501–510.

- KITAO, T., 1993. Streptococcal Infections. 196-210. Bacterial Diseases of Fish. Eds. Inglis V, RJRoberts, NR Bromage. Blackwell Sci. Ltd. Cambridge.
- KNOPH, M. B., and THORUD, K., 1996. Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater-effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematological parameters. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113: 375-381.
- KODAMA, H., MATSUOKA, Y., TANAKA, Y., LIU, Y., IWASAKI, T. and VATARAI, S., 2003. Changes of C-reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sera after exposure to anti-ectoparasitic chemicals used in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 16: 589-597.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN, W.C., 1997. *Colour Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5. Ed. Lippincott Philadelphia.
- KRONVALL, G., HAGELBERG, A., 2002. Numerical evaluation of minimal biochemical test combinations for the identification of *Enterobacteriaceae* species. *APMIS* 110: 451–457.
- KUMAR, C. R., 2000. Basic Pathology, Hemostaz ve tromboz 6. Baskı. 65-70s.
- KUSHNER, I., GEWURZ, H., BENSON, M.D., 1981. C-reactive protein and the acute phase response. *J. Lab. Clin. Med.*, 97:739-749.
- KUSHNER I., MACKIEWICZ, A., 1987. Acute phase proteins as disease markers. *Disease Marker*, 5: 1–11.
- KUSUDA, R., 1992. Bacterial fish diseases in mariculture in Japan with special emphasis on streptococcosis. *Israeli Journal of Aquaculture*, 44: 1–40.
- KÜÇÜKGÜL, A., 2003. Farklı tip stres faktörlerinin aynalı sazan (*Cyprinus carpio* linnaeus, 1958) bireylerinde serum glikoz, kortizol ve kan hemoglobin miktarları üzerine etkileri. Çukurova Üniv. Fen Bilimleri Su ürünleri Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, 59s.
- LANNERGARD, A., LARSSON, A., KRAGSBJERG, P., FRIMAN, G., 2003. Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 63: 267-272.

- LAURELL, C.B., 1985. Acute phase proteins - a group of protective proteins. *Rec. Adv. Clin. Biochem.*, 103–124.
- LEDUE, T., WEINER, D., SIPE, J., POULIN, S., COLLINS, M. AND RIFAI, N., 1998. Analytical evaluation of particleenhanced immunonephelometric assays for C-reactive protein, serum amyloid A and mannosebinding protein in human serum. *Ann. Clin. Biochem.*, 35: 745–753.
- LI, A., 2006. Intervet at CAA2. Highlights of the 5th International Symposium of Aquatic Animal Health, 5–6
- LIN, B., CHEN, S., CAO, Z., LIN, Y., MO, D., ZHANG, H., GU, J., DONG, M., LIU, Z., XU, A., 2007. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: striking similarities and obvious differences with mammals. *Mol. Immunol.*, 44: 295-301.
- MACDONELL, M.T., SINGELTON, F.L., HOOD, M.A., 1982. Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 423–427.
- MALLE, E., STEINMETZ, A., RAYNES, J.G., 1993. Serum amyloid A (SAA):an acute phase protein and apolipoprotein. *Atherosclerosis*, 102: 131–46
- MAUGERI T.L., CRISAFI, E., GENOVESE, L., SCOGLIO, M.E.R., 1983. Identification of *Vibrio anguillarum* with the API 20E system. *Microbiologica*, 1: 73–79.
- MARTINEZ-SUBIELA, S., TECLES, F., CERON, J.J., 2003. Critical differences of acute phase proteins in canine samples. *The Veterinary Journal*, 166: 233–237.
- MCINTYRE C., HARPER I., MACDOUGALL I. C., RAINE A. E. G., WILLIAMS A., BAKER L. R. I. 1997. Serum C-reactive protein as a marker for infection and inflammation in regular dialysis patients. *Clinical nephrology*, 48: 371–374.
- MCGUIRE, W., ALESSANDRO, U.D., OLALEYE, B.O., THOMSON, M.C., LANGEROCK, P., GREENWOOD, B.M., KWIATKOWSKI, D., 1996. C-reactive protein and haptoglobin in the evaluation of a community-

- based malaria control programme. *Transact. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90: 10-14.
- MCNULTY S. T., KLESIUS P. H., SHOEMAKER C. A., EVANS J. J., 2003. *Streptococcus iniae* infection and tissue distribution in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) following inoculation of the gills. *Aquaculture*, 220: 165–173.
- MINAMI, T., 1979. *Streptococcus* sp., pathogenic to yellowtail, isolated from fishes for diets. *Fish Pathology*, 14: 15–19.
- MMWR., 1996. Invasive Infection with *Streptococcus iniae*, 2 August, 45(30): 650-53. Invasive infection with *Streptococcus iniae*, Ontario, 1995-1996. Morbidity and Mortality weekly Report available on-line from the Centers for Disease Control's website at [www.cdc.gov/mmwr](http://www.cdc.gov/mmwr).
- NAKANISHI, Y., SUZUKI, Y., NAKAMURA, T., HATANAKA, Y., FUKUDA, Y., FUJISAWA, A. AND SHIMAOKA, G., 1991. Direct observation of plasma-lens effect. *Appl. Surf. Sci.*, 55: 48-49.
- NORDMO, R., RAMSTAD, A., 1997. Comparison of different challenge methods to evaluate the efficacy of furunculosis vaccines in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *L. J. Fish Dis.*, 20: 119–126.
- NEELY, M. N., PFEIFER, J. D. and CAPARON, M., 2002. *Streptococcus*-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infect Immun.*, 70: 3904-3914.
- NOGA, E.E., 2000. Vibriosis, In: fish disease diagnosis and treatment. (Eds.: Edward J. Noga), Iowa State Pres.,USA, 149-150pp.
- OGUNJI, J.O., 2004. Alternative protein sources in diets for farmed tilapia. *Animalscience.com Reviews* (2004) No. 13; CAB International Publishing (Oxford, UK). *Nutrition Abstracts and Reviews: Series B* 74(8), 23N – 32N
- ÖZER, S., BULDUKLU, P., DÖNMEZ, E. 2008. Mersin ilinde yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) streptokokkozis varlığı. *Journal of Fisheries Sciences*, 2(3): 272–283.
- PERERA, R.P., COLLINS, M.D., JOHNSON, S.K., LEWIS, D.H., 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T.*

- aurea* hybrids. Journal of Aquatic Animal Health, 6: 335–340.
- PERERA, R.P., JOHNSON, S.K. and LEWIS, D.H., 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting Tilapia in Texas. Aquaculture, 152: 25–33.
- PERERA, R.P., FISKE, R.A., JOHNSON, S.K. 1998. Histopathology of hybrid tilapia infected with a biotype of *Streptococcus iniae*. J. Aquat. Anim. Health, 10: 294–299.
- PEPYS, M.B., BALTZ, M.L., 1983. Acute phase proteins with special reference to CRP and related proteins (pentraxins) and serum amyloid. A. Adv. Immunol, 34: 141–221.
- PLOTNIKOFF, R.C., TAYLOR, L.M., WILSON, P.M., COURNEYA, K.S., SIGAL, R.J., BIRKETT, N. 2006. Factors associated with physical activity in Canadian adults with diabetes. Med. Sci. Sports Exerc., 38: 1526-1534.
- PLUMB, J. A., 1994. Health maintenance of cultured fishes: principal microbial diseases. CRC Press, Boca Raton, FL.
- PIER, G.B. and MADIN, S.H., 1976. Nov., a betamoly *Streptococcus* isolated an Amazon fresh. *Streptococcus iniae* sp. Water dolphin. *Inia Geoffrensis*. Int. J. Syst. Bacteriol., 26: 545-553.
- PINCUS, M.R., ABRAHAM, N.Z., 2001. Interpreting laboratory results, “Henry JB: Clinical, Laboratical Diagnosis and Management by Laboratory Methods” 92-107p., Saunders Co., Philadelphia.
- PRESS, N., BRYCE, E. AND STIVER, G., 1998. Strain characteristics of *Streptococcus iniae* isolated from tilapia species in Vancouver, British Columbia. Can. Commun. Dis. Rep., 24: 181–182.
- PRESLEY, M.E, PHELAN, 3RD P.E., WITTEN, P.E., MELLON, M.T., KIM C.H., 2005. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. Dev Comp Immunol, 29: 501–13.
- POST, G., 1987. Bacterial diseases of fish, In: Textbook of fish health. (Eds.: Dr. George Post), T.F.H. publications, 44-47pp.

- REDDACLIFF, G.L., 1988. Disease of aquarium fish. Refresher course for veterinarians, 23–27 May 1988, Sydney, 315–322pp.
- RIKIHISA, Y., YAMAMOTO, S., KWAK, I., IQBAL, Z., KOCIBA, G., MOTT, J., CHICHANASIRIWITHAYA, W., 1993. C-reactive protein and  $\alpha$ -acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. Proc. Jpn. Soc. Anim. Biochem., 29: 69–76.
- ROBERTS, R. J., 2001. Fish Pathology, 3rd ed. Bailliere Tindall, London.
- ROBERTS, J.K.M., LINKER, C.S., BENOIT, A.G., JARDETZKY, O. and NIEMAN, R.H., 1984. Salt stimulation of phosphate uptake in maize root tips studied by  $^{31}\text{P}$  Nuclear Magnetic Resonance. Plant Physiol., 75, 947–950.
- ROMALDE, J.L., TORANZO, A.E., 1991. Evaluation of the API 20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 11: 147–149.
- RUSSO, R., MITCHELL, H., YANONG, R., 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. Aquaculture, 1: 105–110.
- SAKAI, A., YANO, M., SATOH, H., LWATA N. and OMURA, T., 1987. Intragenic analysis of waxy mutants in rice. Jpn. J. Breed., 37: 162–163.
- SAKO, H., 1998. Studies on *Streptococcus iniae* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Bull. Nansei Natl. Fish. Res. Inst., 31: 63–120.
- SARIHAN, F., 2005. Tilapia (*Oreochromis niloticus*)’larda levamisol ve *Streptococcus iniae* uygulamasından sonra oluşan immün yanıtın izlenmesi. Çukurova Üniv. Fen Bilimleri Su ürünleri Anabilim Dalı. (Yayınlanmamış doktora tezi), 88s.
- SASAKI, K., MA, Z., KHATLANI, T.S., OKUDA, M., INOKUMA, H., ONISHI, T., 2003. Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as a inflammatory marker. J. Vet. Med. Sci., 64(4): 545–548.
- SAUNDERS W.B. 2003. The Role of C-Reactive Protein in the Evaluation and Management of Infants With Suspected Sepsis. Advances in Neonatal Care, 3 (1) : 3–13.

- SHAINKIN-KESTENBAUM, R., CARUSO, C., BERLYNE, G.M. 1990. Reduced superokside dismutase activity in erythrocytes of dialysis patients: A possible factor in the etiology of uremic anemia. *Nephron*, 55: 251–253.
- SHOEMAKER, C.A., EVANS, J.J. and KLESIUS, P.H., 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 188: 229–235.
- SHOEMAKER, C.A., LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., WELKER, T.L. AND KLESIUS, P.H., 2006. Growth response and acquired resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), that survived *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture Research*.
- SHOEMAKER, C.A. AND KLESIUS, P.H., 1997. Protective immunity against enteric septicemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), following controlled exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish Diseases*, 20: 101–108.
- SIWICKI, A.K., FULLER, J.C., NISSEN, S., OSTASZEWSKI, P., STUDNICKA, M., 2000: In vitro effects of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) on cell-mediated immunity in fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 76: 191–197.
- SMITH, G.L. AND SCHOONBEE, H.J., 1998. Blood coagulation factors in the freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, 32: 673–677.
- SOWUNMI, A.A., OKUNUBI, M. A., EFUNTOYE, M.O., 2007. Occurrence of bacteria in gills and buccal cavity of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and *Tilapia zillii* (Gervais) from Lekki lagoon, Southwest Nigeria. *World Journal of Biological Research* 001:1.
- SÖYLETİR, G.ve ÖVER, U., 2002. Beta hemolitik streptokoklar. In: Topçu AW, Söyletir M, Doğanay M. (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.78-88s.
- SPELLERBERG, B., 2002. Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes and Infection*, 17: 33–42.

- STEVENS D.L., 1995. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis*, 1: 69–78.
- STOFFREGEN, D., BACKMAN, S., PERHAM, R., BOWSER, P., BABISH, J., 1996. Initial disease report of *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped (sunshine) bass and successful therapeutic intervention with the fluoroquinolone antibacterial enrofloxacin. *J World Aquacult Soc*, 27: 420–434
- TEMİZ, A., 1994. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Ankara. 274s.
- THOMPSON, D., MİLFORD-WARD, A., WHICHER, J., 1992. The value of acute phase measurements in clinical practice. *Ann Clin Biochem*, 29: 123–131.
- TİMUR, G., 1991. A histological study of a carp pox (Viral epithelioma) disease in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 11 (5): 171–173.
- TİMUR, G., TİMUR, M., 1985. Egirdir gölü sudak (*Stizostedion lucioperca* L. 1758) balıklarında yüksek mortaliteye neden olan bakteriyel hemorajik septisemi Hastalığı üzerinde bir araştırma. *A.Ü: Vet. Fak. Dergisi.*, 32: 33–41.
- TOPARLAK, M., TUZER, E., 1994. Paraziter Hastalıkların Tanısında Laboratuvar Teknikleri. Pfizer, Hayvan Sağlığı, 20s.
- TORANZO, A.E., BAYA, A.M., ROBERSON, B.S., BARJA, J.L., GRIMES D.J. AND HETRICK, F.M., 1987. Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 61: 81–97.
- UHLAR, C.M. AND WHITEHEAD, A.S., 1999. Use of serum amyloid a gene in diagnosis and treatment of glaucoma and identification of anti-glaucoma agents. *Eur. J. Biochem.*, 265: 501-523.
- VAL, A.L., DE MENEZES, G.C. AND WOOD, C.M., 1998. Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts. *J. Fish Biol.*, 52: 83-93.
- VARVARIGOS, P., 2001. Gram positive coccobacteria (Micrococcaceae, Streptococcaceae) causing systemic disease in intensively farmed fish, Brief review. [http://www.vetcare.gr/Gram\\_positive\\_cocci.htm](http://www.vetcare.gr/Gram_positive_cocci.htm) (03.07.2007). 109–114pp.

- VILLARROEL, F., CASADO, A., VÁSQUEZ, J., MATAMALA, E., ARANEDA, B., AMTHAUER, R., ENRIQUEZ, R., CONCHA, M.I., 2008. Serum amyloid A: A typical acute-phase reactant in rainbow trout? *Dev. Comp. Immunol.*, 32(10):1160-9.
- WAAGE, A., SHALABY, R., TERJE, E., 1992. Tumour necrosis factor, interleukin-1, interleukin-6, interleukin-8, and interferone-G in septic shock. In: Kunkel SL, Remick DG (eds) *Cytokines in health and diseases*. Marcel Dekker, New York, 151-164pp.
- WEINSTEIN, M., LITT, M., KERTESZ, D.A., WYPER, P., ROSS, D., COULTER, M., MCGREER, A., FACKLAM, R., OSTACH, C., WILLEY, B.M., BORCZYK, A. AND LOW, D.E., 1997. Invasive infections due to a fish pathogen *Streptococcus iniae*. *New England Journal of Medicine*, 33(7): 5589–5594.
- WHICHER, J.T., WESTACOTT, C.I. 1992. The acute phase response. In: Whicher JT, Evans SW (eds) *Biochemistry of Inflammation*. Kluwer Academic, London, 243-271pp.
- WONG, M.H. 1989. Toxicity tests of landfill leachate using *Sarotherodon mossambicus* (freshwater fish). *Ecotoxicology and environmental safety*, 17; 149-156.
- XU, D., SHOEMAKER, C., KLESZIUS P., 2007. Tilapia infected with gyrodactylus more susceptible to *Streptococcus*? *American Fisheries Society Annual Meeting Proceedings*. 9p.
- YAN, S.B., HELTERBRAND, J.D., HARTMAN, D.L., WRIGHT, T.J., BERNARD, G.R., 2001. Low levels of protein C are associated with poor outcome in severe sepsis. *Chest.*, 120: 915-922.
- YANONG, R.P.E., FRANCIS-FLOYD, R., 2002. *Streptococcal Infections of Fish*. Circular FA057, Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

- YENEN, Ş.O., 1990. İnfeksiyon hastalıklarında akut faz reaktanları, “Çalangu S, Eraksoy H, Özsüt H (eds): İnfeksiyon Hastalıkları '90-'91” kitabında s.21-42, Yüce Yayınları, İstanbul.
- YAMAMOTO, S., SHIDA, T., MİYAJI, S., SANTSUKA, H., FUJISE, H., MUKAWA, K., FUKUKAWA, E., NAGAE, T., NAIKI, M., 1993. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Veterinary Research Communications*, 17: 85–93.
- YULE, T.D., ROTH, M.B., DRİER, K., JOHNSON, A.F., PALMER-DENSMORE, M., SMMONS, K., FANTON, R., 1997. Canine parvovirus elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. *Vaccine*, 15: 720–729.
- ZIMLICHMAN, S., DANON. A., NATHAN, I., MOZES, G., SHAINKIN–KESTENBAUM, R., 1990. Serum amyloid A, an acute phase protein, inhibits platelet activation. *J. Lab. Clin. Med.*, 116:180–186.
- ZLOTKIN, A., HERSHKO, H. AND ELDAR, A., 1998. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4065–4067.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1979 yılında Mersin’de doğdu. İlk ve orta öğretimini Tarsus’ta, lise öğretimini Mersin’de tamamladı. 1996 yılında girdiği Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesini 2000 yılında bitirdi. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve 2003 yılında tamamladı. 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı ve halen devam etmektedir.