



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**LEVREK (*DICENTRARCHUS LABRAX* L. 1758)
BALIKLARINDA
VIBRIO ANGUILLARUM' UN PATOGENESİSİ ÜZERİNE
BİR ARAŞTIRMA**

**Su Ürünleri Yük. Müh. Menekşe Didem ERCAN
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı
Hastalıklar Programı**

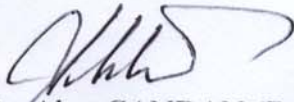
**Danışman
Prof.Dr. Akın CANDAN**

Temmuz, 2009

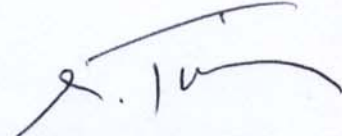
İSTANBUL

Bu çalışma 28/ 07/ 2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Hastalıklar programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

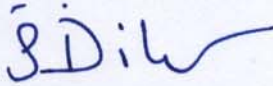
Tez Jürisi



Prof.Dr. Akın CANDAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



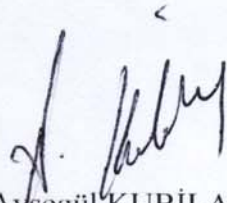
Prof.Dr. Gülşen TİMUR
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof.Dr. Öznur DİLER
Süleyman Demirel Üniversitesi
Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi



Prof.Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç.Dr. Ayşegül KUBİLAY
Süleyman Demirel Üniversitesi
Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T914-02062006 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yapılan bu çalışmada, deniz balıkları yetiştiriciliği alanında büyük bir yeri olan levrek balığının deneysel olarak *V. anguillarum* ile enfeksiyonu gerçekleştirilerek patogenezisi araştırılmıştır.

Tüm akademik hayatım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli danışman hocam Prof.Dr. Akın CANDAN ve her zaman yanımda olan Doç.Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM' a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tüm üniversite hayatım boyunca bilgileri ile bana ışık tutan hocalarım Prof.Dr. Metin TİMUR, Prof.Dr. Gülşen TİMUR ve Yetiştiricilik Bölümü öğretim üyelerine emekleri için teşekkürü bir borç bilirim. Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Yard.Doç.Dr. Aygöl EKİCİ, Araş.Gör. Eda YARDIMCI, Araş.Gör. Güneş YAMANER, Araş.Gör. Pelin ÇİFTÇİ, Araş.Gör. Emre TURGAY' a, bana laboratuvarlarını açan ve bilgilerini paylaşan İ.Ü. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyeleri ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, İ.Ü. Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Mine ANĞ KÜÇÜKER' e, araştırmam için gerekli olan materyalleri sağlayan, İşleme ABD., S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, AKUADAN Su Ürünleri Ltd. Şti., İDA GIDA San. A.Ş ve Hatko A.Ş.' ye, çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi' ne teşekkür ederim. Doktora eğitimim boyunca anlayışları ve destekleri için aileme, dostlarıma ve eşim Araş.Gör. Ertan ERCAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz, 2009

Menekşe Didem ERCAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. LEVREK BALIĞI HAKKINDA GENEL BİLGİLER	5
2.2. VİBRİOZİS HASTALIĞI VE ETKENLERİ	7
2.3. <i>VIBRIO ANGUILLARUM</i> ' UN GENEL ÖZELLİKLERİ	9
2.4. <i>VIBRIO ANGUILLARUM</i> ' UN DEMİR BAĞLAMA ÖZELLİĞİ	16
2.5. TELEOST BALIKLARDA KAN	18
2.5.1. Kanın Yapısı	18
2.5.2. Kan Hücrelerinin Oluşumunda Görev Alan Organlar	21
2.6. DEMİRİN CANLILAR İÇİN ÖNEMİ	22
2.7. TRANSFERRİN	23
2.8. GEN ANLATIMI VE ANALİZİ	25
2.8.1. RNA'nın İzolasyonu ve Saflaştırılması	26
2.8.2. RNA'nın Analizi	27
2.8.2.1. Spektrofotometre	27
2.8.2.2. Elektroforez	27
2.8.3. Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	28
2.8.4. Northern Emdirimi	29
2.8.4.1. Prob Hazırlanması, Digoksisijenin (DIG) Sistemi	30

2.8.4.2. Denatürasyon.....	30
2.8.4.3. RNA'nın Membrana Aktarımı	30
2.8.4.4. Fiksasyon	31
2.8.4.5. Melezleme (Hibridizasyon) Öncesi İşlemler	31
2.8.4.6. Melezleme	31
2.8.4.7. Melezleme Sonrası Yıkama İşlemleri	31
2.8.4.8. İşaretili Probların Belirlenmesi	32
2.9. BALIKLARDA GEN ANLATIM ÇALIŞMALARI.....	32
3. MALZEME VE YÖNTEM	35
3.1. MALZEME.....	35
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Balıklar ve Sistem	35
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşları	37
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	37
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri ve Kitler	37
3.1.5. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar	39
3.2. YÖNTEM.....	42
3.2.1. Balıkların Bakımı ve Beslenmesi	42
3.2.2. Bakteri İzolasyonu ve Üretimi	42
3.2.2.1. Biyokimyasal Testler	43
3.2.2.2. Siderofor Üretiminin Belirlenmesi	43
3.2.3. Deneysel Enfeksiyon Oluşturma	43
3.2.3.1. LD ₅₀ değerinin Belirlenmesi	43
3.2.3.2. Pilot Enfeksiyon Denemesi	44
3.2.3.3. Enfeksiyon Denemesi	44
3.2.4. Balıkların Örneklenmesi	45
3.2.5. Hematolojik Örneklemeler	45
3.2.6. Bakteriyel Örneklemeler	46
3.2.7. Histolojik Örneklemeler	46
3.2.8. Serolojik Örneklemeler ve Transferrin Miktar Ölçümü	47
3.2.9. Dokudan RNA izolasyonu	49
3.2.10. RT-PCR (Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	49
3.2.11. Northern Emdirimi	51
4. BULGULAR	55
4.1. BAKTERİYOLOJİK BULGULAR.....	55

4.1.1. Siderofor Üretimi Bulguları	57
4.1.2. Deneysel Enfeksiyon Bulguları	58
4.2. KLİNİK BULGULAR.....	58
4.3. HEMATOLOJİK BULGULAR.....	60
4.4. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	66
4.5. SEROLOJİK BULGULAR	78
4.6. RNA İZOLASYONU VE RT-PCR BULGULARI	82
4.7. NORTHERN EMDİRİM BULGULARI.....	85
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	86
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Levrek (<i>Dicentrarchus labrax</i>) balığı	5
Şekil 2.2	: pJM1 plazmidinin kodladığı demir alımı düzen şeması.....	18
Şekil 2.3	: RT-PCR'ın işleyiş mekanizması ve bileşenleri, RT: Reverse transcriptase, cDNA: tamamlayıcı DNA, DNA Pol.: DNA polimeraz ..	29
Şekil 3.1	: Çalışmada kullanılan sistem, a) filtreler b) tanklar	35
Şekil 3.2	: CX535550 Genbank numaralı Levrek balığı transferrin gen EST dizisi	40
Şekil 3.3	: Kapiler aktarım sistemi	44
Şekil 4.1	: TCBS besiyerinde üremiş <i>V. anguillarum</i> kolonileri.....	56
Şekil 4.2	: a) VAM besiyerinde üremiş <i>V. anguillarum</i> kolonileri, b) Ekim yapılmamış VAM besiyeri	56
Şekil 4.3	: CAS besiyerinde üremiş <i>V. anguillarum</i> kolonileri; a) Sıvı besiyerinden damlatma yöntemi ile yapılan deneme sonucu üreme b) öze ile ekim sonucu üreme.....	57
Şekil 4.4	: CAS besiyerinde üremiş <i>V. anguillarum</i> kolonileri ve pozitif kontrol <i>Bacillus cereus</i> kolonileri	58
Şekil 4.5	: Enfekte olmuş levreklerde görülen belirtiler; a) baş üzerinde ve yüzgeç diplerinde hemorajiler, b) gözde ve ağız çevresinde hemorajiler.....	59
Şekil 4.6	: Enfekte olmuş levreklerde görülen belirtiler; a) karaciğerde peteşiyal hemoraji ve ekimozlar, b) bağırsakta sarı renkte sıvı toplanması ve beyaz mukoid madde birikimi	59
Şekil 4.7	: Eritrosit, Lökosit Sayıları ve Hematokrit Değerleri Değişim Grafikleri	62
Şekil 4.8	: Enfekte balık kan örneklerinde eritrositlerin poligonol şekil alması (okla gösterilmiştir), v: <i>V. anguillarum</i> hücreleri MayGrünwald-Giemsa x1000	63
Şekil 4.9	: Enfekte balık kan örneklerinde kan hücrelerinin erimesi (okla gösterilmiştir), MayGrünwald-Giemsa x1000.....	64
Şekil 4.10	: Enfeksiyonun 2. günü kan örneklerinde <i>V. anguillarum</i> hücreleri (okla gösterilmiştir), MayGrünwald-Giemsa x1000	64
Şekil 4.11	: Enfekte balık kan örnekleri, l: lenfosit, m: monosit, n: nötrofil, v: <i>Vibrio anguillarum</i> hücreleri, MayGrunwald-Giemsa x1000	65
Şekil 4.12	: Enfeksiyonun 1. günü örnekleri dalak dokusunda hemosiderin birikimi (okla gösterilmiştir), H+E x400.....	67
Şekil 4.13	: Enfeksiyonun 2. günü örnekleri karaciğer dokusunda nekrotik odaklar (okla gösterilmiştir), H+E x400.....	67
Şekil 4.14	: Enfeksiyonun 2. günü örnekleri pankreas dokusunda hiperemi, H+E x400	68
Şekil 4.15	: Enfeksiyonun 2. gününde solungaçta hemoraji, filament epitel hücrelerinde nekroz ve dökülme (okla gösterilmiştir) H+E x200.....	68

Şekil 4.16	: Enfeksiyonun 2. gününde kalbin ventrikülündeki kaslarda hemorajik odaklar (okla gösterilmiştir) H+E x200.....	69
Şekil 4.17	: Enfeksiyonun 2. gününde kalp kas hücrelerinde nekroz sonucu miyopati (okla gösterilmiştir), H+E x400.....	69
Şekil 4.18	: Enfeksiyonun 3. gününde böbrek dokusunda tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon ve liquefactive nekroz odakları (L), a) peritübüler ödem (okla gösterilmiştir), H+E x100, b) nekrotik intertübüler dokuda yaygın hemoraji odakları (okla gösterilmiştir) H+E x100	70
Şekil 4.19	: Enfeksiyonun 3. gününde bağırsak mukoza epitel hücrelerinde nekroz ve lümeneye dökülme (okla gösterilmiştir), H+E x100	71
Şekil 4.20	: Enfeksiyonun 4. gününde dalak dokusunda bakteri hücreleri tespiti, a) H+E x1000, b) Twort' un gram boyası x1000	72
Şekil 4.21	: Enfeksiyonun 4. gününde bağırsak duvarı ve kasta delinme (okla gösterilmiştir), H: hiperemi, H+E x200.....	73
Şekil 4.22	: Enfeksiyonun 5. gününde boşalmış dalakta multifokal liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiştir), H+E x200.....	73
Şekil 4.23	: Enfeksiyonun 5. gününde böbrek dokusunda peritübüler ödem (okla gösterilmiştir), O: multifokal hemorajik odaklar, M: melanonakrofüaj merkezleri , H+E x100	74
Şekil 4.24	: Enfeksiyonun 5. gününde böbrek dokusunda peritübüler ödem (okla gösterilmiştir), H+E x400.....	74
Şekil 4.25	: Enfeksiyonun 5. gününde böbrek dokusunda nekrotik odaklarda bakteri hücreleri tespiti (okla gösterilmiştir), H+E x1000.....	75
Şekil 4.26	: Enfeksiyonun 5. gününde karaciğer dokusunda multifokal hemorajik odaklar (okla gösterilmiştir), H+E x200.....	75
Şekil 4.27	: Enfeksiyonun 5. gününde hasta levrek balığında dermise kadar inen deri lezyonu; erimiş epidermis (E) ve altında kalan pullar (P), H+E x100 ...	76
Şekil 4.28	: Enfeksiyonun 6. gün dalak örneklerinde gözlenen nekroz sonucu dokuda boşalmalar, H+E x400	76
Şekil 4.29	: Enfeksiyonun 6. gününde karaciğerde liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiştir), H+E x200.....	77
Şekil 4.30	: Enfeksiyonun 6. gününde böbreklerde yaygın liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiştir), peritübüler ödem oluşumu ve intertübüler hemapoietik dokuda boşalma, H+E x200.....	77
Şekil 4.31	: Enfeksiyonun 6. gününde bağırsak duvarında, mukoza epitelinde ve kaslarda nekroz ile lümeneye dökülme, H+E x200.....	78
Şekil 4.32	: ELISA deneme sonuçları; a) TMB eklendikten sonraki görüntü ,b) 1M HCl eklenip reaksiyon durduktan sonraki görüntü, c) Kuyuların örnek isimleri; K: anti-carp Ig ile kaplama, LS: Levrek serumu, P: peroksidaz işaretli anti-rabbit IgG	79
Şekil 4.33	: Örneklerin demir bağlama kapasitesine göre renk değiştirmesi, B: kör, S: Kit demir standartı, 1-37: Örnek numaraları.....	80
Şekil 4.34	: Günlük doymamış demir bağlama kapasitesi (UIBC) değerleri grafiği	81
Şekil 4.35	: Enfekte balık transferrin doğunluk değişim grafiği	82
Şekil 4.36	: Levrek balığının karaciğer dokusundan izole edilen total RNA örnekleri, M: RNA ladder high range	84
Şekil 4.37	: RNA örneklerinden yapılan RT-PCR sonucu; 1: Levrek β -aktin geni, 2: Levrek transferrin gen EST'si, M: Marker (1000 bp DNA ladder) ...	84

- Şekil 4.38** : RT-PCR sonuçları, a-e: internal kontrol gen β -aktin çoğaltılan örnekler, 1-27: transferrin geni çoğaltılan örnekler, K: kontrol (insan β -aktin geni), M: 100bp DNA ladder..... 85
- Şekil 4.39** : Northern emdirim deneyi; A: β -aktin gen anlatım sonuçları, T: transferin gen anlatım sonuçları, 1-6: enfekte balık örnekleme günleri, K: kontrol balığı 85

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	: Günlük örneklenen canlı balık ve ölü balık sayısı	45
Tablo 3.2	: Transferrin geni EST çoğaltımı için kullanılan primer dizileri.....	50
Tablo 3.3	: β -aktin geni çoğaltımı için kullanılan primer dizileri.....	50
Tablo 4.1	: İzole edilen <i>Vibrio anguillarum</i> suşunun fenotipik özellikleri	55
Tablo 4.2	: <i>V. anguillarum</i> suşlarının API20E profilleri	56
Tablo 4.3	: Toplam Eritrosit, Toplam Lökosit Sayıları ve Hematokrit Değerleri ..	61
Tablo 4.4	: Günlük doymamış demir bağlama kapasitesi (UIBC) ve demir değerleri	81
Tablo 4.5	: Enfekte balık transferrin doygunluk değişimi.....	82
Tablo 4.6	: RNA örneklerinin konsantrasyonları	83

ÖZET

LEVREK (*DICENTRARCHUS LABRAX* L. 1758) BALIKLARINDA *VIBRIO ANGUILLARUM*' UN PATOGENESİSİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Vibriozis, levrek balıkları (*Dicentrarchus labrax* L. 1758)' nda çok sık görülen önemli bakteriyel hastalıklardan biridir. En önemli etkeni *Vibrio anguillarum* Gram (-), basil şeklinde ve hareketli bir bakteridir. *Vibrio anguillarum* ile enfekte olmuş balıklarda klinik tabloda hemorajik septisemi gözlenir. Bu patojen çeşitli toksinler ve virülans faktörleri üreterek balığın savunma mekanizmasını çöktürmektedir.

Bu çalışmada deneysel olarak *V. anguillarum* enfeksiyonu oluşturularak bakterinin konak canlıda oluşturduğu patolojik değişiklikler ve konak canlının verdiği tepki araştırılmıştır. *V. anguillarum* patogenesisini incelemek için deneysel enfeksiyon oluşturulduktan sonra balıkların kan ve doku örnekleri alınmıştır. Bu örnekler ile total eritrosit sayımı, total lökosit sayımı, hematokrit değeri ölçümü, kan frotileri, doymamış demir bağlama kapasitesi belirlenmesi, serum demir miktar ölçümü, serum transferrin doygunluğu belirlenmesi, bakteri re-izolasyonu, histopatolojik inceleme, transferrin gen anlatımı analizi yapılmıştır.

30g üstü levrek balıkları 10^5 hücre/ml *V. anguillarum* içeren yapay deniz suyunda (%30) tutularak enfekte edilmiştir. Ölmek üzere olan yada yeni ölmüş hasta balık örneklerinin, dış ve iç bakıda hastalığın tipik patolojik bulgularını taşıdığı saptanmıştır. İnternal olarak genellikle karaciğerde fokal hemorajiler ve bağırsakta sarı renkli sıvı birikimi gözlenmiştir. Dalağın büyümüş olduğu ve aynı zamanda dalağın ve böbreğin erimiş olduğu da saptanmıştır.

Enfeksiyonun 2. gününden itibaren olgunlaşmamış eritrosit sayıları artmış, 3. ve 6. günlerinde ise bu sayı %50 civarına ulaşmıştır. Yapılan bu çalışmada lökositlerin ilk iki gün enfeksiyon etkeni bakteriye karşı cevap olarak sayılarının yükseldiği fakat enfeksiyonun ilerleyen günlerinde sayılarının azaldığı tespit edilmiştir. Enfekte balıklarda histopatolojik olarak böbrek, dalak, karaciğer dokularının hemoraji ve liquefactive nekroz ve kalp kasında myopati saptanmıştır. 4. günden sonra bağırsak mukoza epitelinde yaygın nekroz ve dökülme yanısıra bağırsak duvarında delinme tespit edilmiştir.

Kanda demir azalmasına neden olan *V. anguillarum*, bu çalışmada transferrin doygunluğunun azalmasına da neden olmuştur. Vibriozis enfeksiyonu sırasında transferrin gen anlatım farkını izleyebilmek için RNA örnekleri ile yapılan RT-PCR sonucunda anlatım farkını görmek mümkün olmamıştır. Northern blotlama deneyinde elde edilen transferrin geni anlatımı sonuçlarına göre; kandaki transferin doygunluğu düşmekte iken gen anlatımının da düştüğü saptanmıştır.

SUMMARY

PATHOGENESIS OF *VIBRIO ANGUILLARUM* IN SEA BASS (*DICENTRARCHUS LABRAX* L. 1758)

Vibriosis is one of the important bacterial disease of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758). Most important agent is *Vibrio anguillarum* which is a Gram (-), bacilliform motile bacteria. Infected fish shows haemorrhagic septicemia when infected by *V. anguillarum*. This pathogen destroys the fish's immune system by producing several toxins and virulence factors.

In this study, pathogenesis of *V. anguillarum* was researched in sea bass during experimental infection. Blood and tissue samples were taken daily from infected fish. Total erythrocytes, total leukocytes, hematocrite, blood smears, unsaturated iron binding capacity, serum iron levels, serum transferrin saturation levels, reisolation of bacteria, histopathological examination, transferrin gene expression were measured and analysed respectively.

The sea bass that are up to 30g were infected experimentally via holding in salt water contained 10^5 *V. anguillarum* cell/ml. Then they were sampled for daily. Moribund and newly dead fish samples have typically pathological external and internal signs. Internally the main feature is focal haemorrhages on the surface of the liver and accumulated yellow fluid in the intestine. Enlargement were seen of the spleen and liquefaction were also seen of the spleen and kidney.

After the second day of *V. anguillarum* infection, the number of unmaturation erythrocytes increased and reached to 50% of total erythrocytes in 3rd and 6th days. In this study, the number of total leucocytes increased in the first days of infection but in the continuous days, these numbers decreased. Acute haemorrhagic septicemia was progressed in infected fish with *V. anguillarum*. Liquefactive necrosis and haemorrhage in the spleen, kidney and liver tissues and cardiac myopathy were observed in histopathologically. After 4th day, necrosis and sloughed of the intestinal mucosa epithelium into the lumen and also perforation on the intestine wall.

During the infection, serum iron levels and transferrin saturation decreased. For gene expression analysis, RNA samples were isolated and analysed by RT-PCR and Northern blot. RT-PCR gave insufficient results but according to Northern blot results, it has been shown that the transferrin gene expression decreased.

1. GİRİŞ

Levrek (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) balıkları ülkemiz denizlerinde var olan ve yüksek kaliteli ete sahip olan bir balık türüdür. Su ürünleri yetiştirme teknolojisinin gelişimi ile beraber levrek kültürü üzerindeki çalışmalar 1980'den sonra artmış ve kafes balıkçılığı teknolojisinin gelişmesi yoğun üretim yapmaya olanak sağlamıştır. Günümüzde Levrek üretimimiz ile Avrupa'da ilk sırada yer almaktayız (FEAP Reports, 2008). Her ne kadar yoğun üretim ekonomik açıdan rahatlama sağlasa da hastalık ve çeşitli problemleri de beraberinde getirmektedir.

Levrek balıkları yetiştiriciliğinde yavru döneminde meydana gelen kayıplar ve bu kayıplar ile mücadele önemli bir problemdir. Kültürü yapılan balıklarda en önemli kayıplar aniden ortaya çıkan ve septisemik enfeksiyon oluşturan hastalıklar nedeni ile meydana gelmektedir (Kissil ve diğ., 2000). Balıklarda hastalık çıkışını engelleyebilmek için, hastalığın seyri ve etken patojenin karakteristik yapısının detaylı olarak bilinmesi önemlidir.

Vibriosis hastalığı, deniz balıklarında özellikle levreklerde çok sık ortaya çıkarak önemli kayıplara yol açmaktadır. Hastalığı oluşturan en önemli etken patojen *Vibrio anguillarum*' dur. *V. anguillarum* patojen özelliği yüksek bir bakteridir. Birçok toksin üretmesi nedeni ile meydana getirdiği enfeksiyonun tedavisi ve kontrolü zorlaşmaktadır (Actis ve diğ., 1999).

Septisemiye neden olan birçok bakteriyel enfeksiyonda olduğu gibi *V. anguillarum* enfeksiyonu sırasında da serbest demirin kanda zamanla eksildiği bilinen bir gerçektir. Demir canlılar için gerekli bir elementtir ve hücrel metabolizmada sayısız görev üstlenmiştir. Kandaki demir eksikliği tüm omurgalı canlılarda olduğu gibi balıklarda da anemiye neden olmaktadır. Bu olayın önlenmesi için canlı bağışıklık sisteminde transferrin adı verilen bir protein bulunmaktadır. Transferrin kanda serbest bulunan demiri bağlayarak bakterilerin üremelerini sınırlar. *V. anguillarum*' un kanda serbest

demir bulunmadığı zamanlarda yaşamını devam ettirmesini sağlayacak özel bir virülans faktörü vardır. Sahip olduğu pJM1 adlı plazmidinin ürettiği “siderofor” konak canlı kanında bulunan transferrine bağlı demiri koparabilme yeteneğine sahiptir. Böylece balık bağışıklık sisteminin önemli bir parçası etkisiz hale gelmektedir (Yano, 1996, Actis ve diğ., 1999, Bury ve diğ., 2003).

Omurgalılarda kandaki demirin çoğu eritrositlerdeki hemoglobine veya transferrine bağlı olarak bulunur. Bakteriler konak organizmada transferrin veya laktoferrin gibi demir bağlamış olan moleküllerden, sideroforlar aracılığı ile demir kazanırlar. Demirin eksik olduğu ortamlarda üremek zorunda kalan mikroorganizmalar, kendi hücre kuru ağırlıklarından daha fazla siderofor sentezleyip dış ortama bırakırlar ve demiri çözünür hale getirmeye çalışırlar. Sentezlenen ve sonra salgılanan sideroforların kaptığı demir hücre duvarındaki özel dış membran proteinleri aracılığı ile hücre içine alınır. Böylece bakterinin yaşamsal faaliyetleri için gereken demir sağlanmış olur (Crosa, 1984, Actis ve diğ., 1999).

Balık hastalıkları yetiştiricilik için önemli bir konudur. Üretim süresince hastalıklardan korunmak için işletmede optimum yetiştiricilik koşulları sağlanmalı, hijyen kurallarına dikkat edilmeli, aşı ve immunostimulanlar kullanılmalıdır. Aşıların kullanımı bakteriyel balık hastalıklarından korunmak için oldukça etkili bir yöntemdir. Günümüzde vibriosis, pasteurellozis, furunkulozis ve yersiniozis gibi bakteriyel hastalıklara karşı etkili aşılar ticari olarak üretilmiştir. Ancak hala önemli viral ve bazı bakteriyel hastalıklara karşı etkili aşılar geliştirilememiştir (Le Breton, 2003, Karataş Düğenci ve Candan, 2003). Aşılamaya rağmen hastalık görülmesi balıktaki doğal savunma mekanizması ile patojen ilişkisinin anlaşılmasını zorunlu kılmakta, bu konuda daha fazla bilgi sahibi olabilmek için araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Tüm bu koşulların sağlandığı durumlarda bile hastalık çıkışları ile karşılaşırsa yapılması gereken, olabildiğince çabuk hastalığın yayılmasını engellemek ve tedavi etmektir. Ülkemizde ve dünyada balık hastalıklarını tedavi etmek için çeşitli kemoterapötikler kullanılmaktadır. Bu kemoterapötiklerin uygunsuz ve kontrolsüz kullanımı ise dirençli bakterinin ortaya çıkışına ve giderek kullanılabilir etkili antibiyotik sayısının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca bazı antibiyotiklerin

balıkların bağışıklık sistemini baskılayıcı bir etkiye sahip olması ve çevre kirliliği gibi nedenlerden dolayı kullanımları her geçen gün kısıtlanmaktadır (Rodgers, 2003). Yanlış kemoterapötik kullanımını engellemek için hastalık etkenini kısa sürede, doğru ve hassas bir şekilde teşhis ederek, etkene uygun tedavi aşamasına geçmek bu açıdan son derece önemlidir.

Günümüzde organizmaların yapısal özelliklerinin ve işlevlerinin ayrıntılı incelenmesinde moleküler yöntemler kullanılmaktadır. DNA dizilerinin belirlenmesi, mRNA dizilerinden gen anlatım farklılıklarının izlenebilmesi, protein farklılıklarının gözlenebilmesi gibi yöntemler mevcuttur. Canlının yaşadığı ortamda herhangi bir değişiklik olduğunda örneğin sıcaklık artması, oksijen miktarı düşmesi, farklı besin içeriği kullanılmada veya enfeksiyona maruz kaldığında, yapısal birçok genin örneğin bağışıklık sistemi genlerinin anlatımındaki farklılık incelenerek canlı yapısındaki bilinmeyen yönler açıklığa kavuşmaktadır (Laing ve diğ., 1999, Low ve diğ., 2003, Bayne ve diğ., 2001, Chen ve diğ., 2006, Rodrigues ve diğ., 2006, Darias ve diğ., 2008, Neves ve diğ., 2009). Hastalık çıkışını engelleyebilmek için, hastalığın seyri ve etken patojenin enfeksiyon süresince balıkta meydana getirdiği bozuklukların zamanla nasıl geliştiğini öğrenmek gerekmektedir. Bu çalışmada da *Vibriosisin* primer etkeni olan *Vibrio anguillarum*' un levrek balıklarında deneysel enfeksiyonu oluşturularak hastalığın seyrinin gözlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada balıklardan alınan kan örneklerindeki transferrin miktarının *V. anguillarum* enfeksiyonu sırasında nasıl değiştiği serolojik olarak gösterilmeye çalışılmıştır. Aynı zamanda transferrin geninin enfeksiyon sırasındaki anlatım farklılıkları moleküler olarak gözlenmiştir. Bu şekilde transferrin proteininin miktar değişimi genomik olarak da takip edilebilmiştir. Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda *V. anguillarum*' un sahip olduğu sideroforun konak transferrinine bağlanmış olan Fe^{+3} iyonunu kopardığı ve yapısını bozduğu bulunmuş fakat enfeksiyon boyunca levrek balığının buna verdiği tepki henüz araştırılmamıştır. Yapılan bu çalışmada da *V. anguillarum* ile deneysel enfeksiyon oluşturulan levrek balıklarının karaciğerinde, transferrin gen anlatımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda laboratuvar ortamında deneysel olarak *V. anguillarum* bakterisi ile enfeksiyon oluşturulacak ve enfeksiyonun gelişimine bağlı olarak her gün hastalık belirtisi gösteren balıklar toplanacaktır. Bu balıklardan kan ile doku örneklere alınarak, kandan serolojik ve hematolojik testler, karaciğerden bakteriyel örnekleme ile RNA izolasyonu ve karaciğer, dalak, böbrek, kalp, bağırsak dokusundan histolojik çalışmaların yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. LEVREK BALIĞI HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Levrek balığı teleost balıkların Serranidae familyası *Dicentrarchus* genusuna mensuptur. Bu genus iki türden oluşmaktadır. *Dicentrarchus labrax* L. 1758' ı diğer türden ayıran özellik, genç bireylerinde fark edilmeyen, 1 yaş üstü bireylerinde dorsalde ve yan çizgi üzerinde bulunan beneklerdir (Barnabé, 1990).

Familya : Serranidae

Genus : *Dicentrarchus*

Species : *Dicentrarchus labrax*



Şekil 2.1: Levrek balığı (*Dicentrarchus labrax*)

Levrek balıkları, Atlantik okyanusunda Fas kıyılarından Baltık denizine kadar, geniş bir alanda yayılım göstermektedir. Akdeniz kıyılarında da var olan bu tür ülkemizin tüm sularında yaşamaktadır (Barnabé, 1990, Çelikkale ve diğ., 1999).

Demersal yaşayan levrek balıkları yazın sığ sularda, acı su lagünlerinde ve nehir ağzlarında bulunmaktadır. 40-50 m derinlikte trol ile avlanan bu balıkların bazen 90 m derinlikten de çıkarıldıkları bildirilmektedir. Kumlu, kayalık ve alg kaplı sedimanı sevmelerine rağmen bulanık ve kirli sulardan hoşlanmazlar. Karnivor olan bu balıklar doğada zooplankton, kabuklu, kafadan bacaklı ve balıklarla beslenir. Kültür ortamında

%45-55 proteinli pelet yem ile beslenmektedir. Doğada 1-3 kg arasında bulunan levrekler kültürde 0,3-0,6 kg arası büyüklüğe ulaştığında satışa çıkmaktadır (Barnabé, 1990, Çelikkale ve diğ., 1999, Memiş, 2009).

Levrek balıklarının sıcaklık ve tuzluluk değişimlerine karşı toleranslı oldukları bildirilmiştir. 2-32°C sıcaklıklar arasında yaşayabildikleri gibi, tuz toleransları da ‰ 0,5-40 arasındadır. Kültürde ideal çözünmüş oksijen değeri 5-8 mg/lt olmalıdır. Üreme dönemlerinde 12-16°C' lik suları tercih etmektedirler. Su sıcaklığının yaklaşık 12°C' ye düşmesiyle beraber yumurtlayan bireylerin sayısında artış gözlemlenmektedir. Levrek balıkları için optimum büyüme sıcaklığının yaklaşık 20-25 °C olduğu bildirilmiştir (Moretti ve diğ., 1999, Kissil ve diğ., 2000, Memiş, 2009).

Larva ve yavru döneminde 20-25 °C sıcaklıklar arasında 0,4-1 g arasında balıkları %6-8, 1-5 g arası %3-6, 5-20 g arası %3, 20-50 g arası %2,5 yemleme oranı ile beslenmektedir (Memiş, 2009). Tanklarda nitritin (NO₂) <0.5 mg/L, total amonyumun 0.5-1 mg/L arasında olması üretim için idealdir (Stickney ve Kohler, 1990).

Ön büyütme ünitesinde 16 saat ışıklandırma uygulanmaktadır. Tanklarda doğal deniz suyu tuzluluğu kullanılmaktadır. Su değişimi balık büyüklüğüne ve stok yoğunluğuna göre saatte % 80-150 arasında değişmektedir. Yaşama oranı hastalık çıkmadığı sürece %90-95 arasında değişim göstermektedir (Saka ve diğ., 2007, Moretti ve diğ., 1999).

Vibriozis, levrek (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) balıklarında özellikle larval dönemde çok sık görülen ve önemli kayıplara neden olan bakteriyel bir hastalıktır. Levrek yetiştiriciliğinde rapor edilen diğer bakteriyel hastalık patojenleri; *Aeromonas hydrophila*, *Mycobacterium marinum*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Pseudomonas anguillaseptica*, *Streptococcus iniae*, *Tenacibaculum maritimum*, *Vibrio ordalii*, *Piscirickettsia salmonis*, paraziter hastalık patojenleri; *Amyloodinium ocellatum*, *Caligus minimus*, *Cryptocaryon irritans*, *Ceratothoa oestroides*, *Diplectanum aequans*, *Diplectanum lauberi*, *Gyrodactylus spp*, *Sphaerospora testicularis*, *Sphaerospora dicentrarchi*, *Trichodina* sp., fungal hastalık patojenleri; *Ichthyophonus hoferi*, viral hastalık patojenleri; Nodavirüs (VEN)' dür (Barnabé, 1990, Bernardet ve diğ., 1994, Çağırğan ve Yüreklitürk, 1996, Moretti ve diğ., 1999, Šarušić, 1999, Timur

ve diğ., 1999, Kissil ve diğ., 2000, Şahrikoğlu ve Candan, 2002, Türk, 2002, Buller, 2004, Timur ve diğ., 2005, Austin ve Austin 2007).

2.2. VİBRİOZİS HASTALIĞI VE ETKENLERİ

Vibriozis, *Vibrio* cinsi bakterilerin neden olduğu, deniz ve acısu balıklarında çok sık görülen kronik veya akut bir hemorajik septisemidir (Inglis ve diğ., 1993, Actis ve diğ., 1999, Sniezsko ve Axelrod, 1971, Kent ve Poppe, 2002). 1718’de Bonaveri tarafından tanımlanmış olan bu hastalık, Avrupa literatürlerindeki ilk bakteriyel balık hastalığıdır. Etkenin izolasyonu 1893’te Canestrini tarafından yapılmış ve bakteri *Bacillus anguillarum* olarak isimlendirilmiştir. Bu hastalık 1956 yılında ülser hastalığı ve 1963 yılında tuzlu su furunkulozisi, çıban hastalığı isimleriyle de anılmıştır (Actis ve diğ., 1999, Austin ve Austin, 2007).

Hastalık etkenleri olarak Vibrionaceae familyasının *Vibrio* cinsi üyelerinden *Vibrio aestuarianus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. brasiliensis*, *V. campbellii*, *V. carchariae* (*V. harveyi*), *V. cholerae* non-O1, *V. coralliilyticus*, *V. damsela* (*Photobacterium damsela*), *V. ezurae*, *V. fischeri*, *V. fortis*, *V. furnissii*, *V. ichthyenteri*, *V. logei*, *V. kanaloaei*, *V. marinus*, *V. neptunius*, *V. nereis*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagius*, *V. piscium* var. *japonicus*, *V. proteolyticum*, *V. rotiferianus*, *V. salmonicida*, *V. splendidus*, *V. tapetis*, *V. trachuri*, *V. tubiashii*, *V. viscosus* (*Moritella viscosa*), *V. vulnificus*, *V. wodanis* ve *V. xuii* gösterilmektedir (Candan 1993, Reed ve Francis-Floyd, 2009, Bruno ve diğ., 1998, Austin ve Austin, 2007, Actis ve diğ., 1999, Gatesoupe ve diğ., 1999, Candan, 2000, Timur ve Timur, 2003, Akaylı ve Timur, 2004, Timur ve Korun, 2004).

Vibrio’ ların suda normal mikrofloranın bir parçası olduğu ve özellikle rotiferlerle beraber bulunduğu bildirilmiştir. Bazı *Vibrio* türlerinin ise insanda patojenik etkiye sahip olduğu ve özellikle deniz ürünlerinin çiğ tüketilmesi sonucu gastroenteritise neden olduğu rapor edilmiştir (Inglis ve diğ., 1993, Austin ve Austin, 2007). *V. vulnificus* biyogrup 1 denizde ve östarin sularda bulunan omurgalı ve omurgasız hayvanların iç organlarında ve yüzeylerinde kolonize olduğu bildirilen bir insan patojenidir. *V. vulnificus*’ un insanlarda infeksiyon oluşturduğu ve hasta yılan balıklarından veya bu

balıklarla temas halinde olan insanlardan izole edildiği bildirilmiştir (Arias ve diğ., 1998, Actis ve diğ., 1999). *Vibrio parahaemolyticus* ise çiğ karides tüketen insanlarda besin zehirlenmesine neden olmuştur (Austin ve Austin, 2007).

Vibrio türlerinin de tatlı sularda bulunan hareketli aeromonadlar gibi fırsatçı patojen olduğuna inanılır. Bu genus deniz balıkları için çok önemli bakteriyel patojenleri içerir. Özellikle organik kirliliğin yüksek olduğu sularda ve yumuşak bentosta yer alır. Bu bakterilerin sayısı kayalık kıyılarda ve bol oksijenli sularda düşer. Yalnızca bazı türler patojenik özellik taşır ve bir türün belli suşları patojenik iken diğerleri zararsız ve ya ikincil etken olarak rol oynarlar (Inglis ve diğ., 1993). Yetersiz beslenme veya su kalitesi, manipulasyonlar, aşırı stoklama, diğer hastalık patojenlerinin varlığı gibi stres etkenleri vibriozise yakalanma riskini arttırlar (Reed ve Francis-Floyd, 2009).

Bu bakteriler karakteristik olarak virgül şekilli, Gram (-) bakterilerdir. Denizde bulunan tüm *Vibrio* türleri %1-2 NaCl içeren Tryptic Soya Agar (TSA) besiyerinde kolaylıkla ürer, 20°C'de 48 saat sonunda düz, konveks, krem renkli koloniler oluştururlar. Aerobik veya fakültatif anaerobik olan *Vibrio*' lar karbonhidratları fermente ederek asit oluşturur, fakat gaz oluşturmazlar. 2,4-diamino -6,7- diisopropyl pteridine phosphate (O/129) vibriostat testine hassastırlar, bu madde üremelerini engeller. Thiocyanate Bile Salt Sukroz Agar (TCBS agar), diğer bakterilerin üremesine engel olan ve patojenik *Vibrio*' ların üremesini sağlayan seçici besiyeri olarak kullanılır. *Vibrio* türlerinin birbirlerinden biyokimyasal özelliklerine göre ayırt edilebildikleri bildirilmektedir (Inglis ve diğ., 1993, Actis ve diğ., 1999, Timur ve Timur, 2003, Austin ve Austin, 2007).

Vibrio infeksiyonlarında bulaşmanın kesin yolu açık olmamasına rağmen oral yolla (su ve besin yolu ile) bulaşmanın olduğu rapor edilmektedir. *Vibrio* türlerinin klinik olarak normal balığın intestinal sisteminden izole edilebilmesi mümkündür. Belirli koşullar altında bakteri intestinal duvarlara geçerek, konakta sistemik hastalık oluşturma yeteneğindedir. İnfekte bireyler ise dışkılarıyla ortama canlı bakteri verirler. Bir işletmede hastalık görüldüğünde çevrede infeksiyöz partiküllerin sayısı ve buna bağlı olarak balıkların hastalanma riski artar (Actis ve diğ., 1999, Reed ve Francis-Floyd, 2009).

Deniz balıkları, yetiştiricilik koşulları ve doğada strese maruz kaldığında *Vibrio* lar, deri ülserleri, kaslarda çıban benzeri lezyonlar ve anemi, yüzgeç diplerinde ve ağız etrafında hemorajiler; yüzgeç kenarlarında veya göz çevresinde nekrotik lezyonlar oluştururlar. Eğer lezyonlar deri altına ve kaslara kadar ulaşırsa beyaz kenarlı ve siyah merkezli hemorajik ülser oluşumu görülür. Bu genel kronik sendrom dışında *V. anguillarum*, *V. ordalii* ve *V. salmonicida*, kendilerine özgü klinik-patolojik sendromlar oluştururlar. Genç balıklarda mortalite oranı % 50 veya daha yüksek olmasına rağmen daha yaşlı balıklarda mortalite oranı azalmaktadır. Akut vakalarda mortalite 5-8 gün içinde %100'e ulaşabilir (Candan, 1993, Inglis ve diğ., 1993, Ackerman ve Iwama, 2001, Timur ve Timur, 2003).

2.3. *VIBRIO ANGUILLARUM*' UN GENEL ÖZELLİKLERİ

İlk kez 1893 yılında Canestrini adlı araştırmacı tarafından yılan balıklarından kızıl veba hastalığı etkeni olarak izole edilen patojen *Bacillus anguillarum* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra 1907 yılında Bergman adlı araştırmacı tarafından İsveç' teki yılan balıklarında meydana gelen vakanın araştırması yapılmış ve bu bakteri *Vibrio anguillarum* olarak isimlendirilmiştir (Austin ve Austin, 2007). Son yıllarda literatürlerde *Beneckea anguillara* biyotip I olarak da adı geçmektedir. 1985 yılında McDowell ve Colwell adlı araştırmacıların yapmış olduğu rRNA filogenetik çalışmaları sonucunda bu bakteri adının *Listonella anguillarum* olarak isimlendirilebileceği belirtilmiş olsa da, birçok araştırmacı bu bakterinin *V. anguillarum* olarak *Vibrio* genusu içinde yer almasını uygun bulmaktadır (Actis ve diğ., 1999, Austin ve Austin, 2007, Timur ve Timur, 2003).

V. anguillarum' un 1970'li yıllarda iki biyotipi bulunduğu kabul edilmiştir. Daha sonra biyotipler arasındaki morfolojik, biyokimyasal özellikleri ve DNA homolojileri incelenerek *V. anguillarum* biyotip II yeni bir tür olarak kabul edilmiş ve Erling J. Ordal onuruna *V. ordalii* olarak isimlendirilmiştir (Actis ve diğ., 1999).

Vibrio anguillarum Vibrionaceae familyasının halofilik grubuna ait, Gram (-), 0,5 x 2 µm büyüklükte çomak şeklinde morfolojiye sahip polar kirpiği ile hareket eden bir bakteridir. *V. anguillarum* % 1,5 NaCl içeren zenginleştirici besiyerlerinde 25-30°C

sıcaklıklarda kolaylıkla üreyebilmektedir. Katı besiyeri üzerinde yuvarlak, krem renkli koloniler oluşturur. Toplam Guanin+Sitozin içeriği % 43-46' dır (Actis ve diğ., 1999, Noga, 2000).

Vibriozis hastalığı etkeni *V. anguillarum* günümüzde 14' den fazla ülkede yaklaşık 48 tür deniz balığında hastalığa neden olmuş bir patojendir. Bu patojenin bazı tatlı su balıklarında hastalık çıkışına neden olduğu da bildirilmiştir. Denizde su sıcaklığı 10 °C üstüne çıktığında, çözülmüş oksijen yetersizliğinde, yoğun stok nedeniyle balıklarda stres geliştiğinde, hijyen yetersizliğinde görüldüğü rapor edilen bu patojenin tatlı suda ise 1-4 °C gibi düşük sıcaklıklarda görüldüğü bildirilmiştir (Sniezsko ve Axelrod, 1971, Horne, 1982, Eguchi ve diğ., 2000, Kent ve Poppe, 2002, Timur ve Timur, 2003, Timur ve Korun, 2004, Austin ve Austin, 2007).

V. anguillarum aynı zamanda deniz ortamında doğal olarak var olan bir bakteridir ve yaz ayları boyunca sağlıklı balığın mukus, solungaç ve bağırsağından olduğu kadar sudan, sedimentten ve planktondan da bol miktarda izole edilmiştir. Bununla beraber bu çevresel izolatların çoğunlukla balık için patojen olduğu ve denizde 50 aydan daha uzun süre hayatta kalabildiği ve çoğalabildiği bildirilmiştir (Actis ve diğ., 1999, Pedersen ve diğ., 1999a, Noga, 2000).

O'toole ve diğ. (2004)'nin yapmış oldukları çalışmada *V. anguillarum*' un enfeksiyon yollarını incelemiştir. Yeşil fluoresan protein (GFP) içeren mutant *V. anguillarum* ile zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarında deneysel enfeksiyon gerçekleştirmiştir. 10^6 - 10^8 hücre/ml bakteri içeren suda bekletilen balıklardan 2 saat ve 6 saat sonra örnek alıp konfokal mikroskop altında incelediklerinde, bakterinin 2 saat sonunda gastrointestinal sistemde, 6 saat sonunda ise baş üzerinde ve vücut yüzeyinde de kolonileştiği belirlenmiştir (O'toole ve diğ., 2004).

V. anguillarum ile enfekte olmuş balıklarda klinik tabloda hemorajik septisemi gözlenir. Enfekte olan balıklarda türe bağlı olarak farklı klinik ve otopsi bulguları bildirilmiş olmasına rağmen bu bakterinin karakteristik klinik bulgularında; vücut renginde koyulaşma, yüzgeç diplerinde ve anüs etrafında kanamalar, solungaç lamellalarında şişkinlik, anemi ve erimeler, damakta noktasal kanamalar, uyuşukluk, internal olarak

kaslarda ve viseral peritonda peteşiyal kanamalar ve derin lezyonlar, peritonda kanlı eksudat birikimi, bağırsak içinde beyaz mukoid madde oluşumu, bağırsağın temiz vizkos bir sıvı ile dolu ve şişkin olması, dalakta büyüme ve erime, böbrekte erime, karaciğer, dalak ile böbrekte nekroz, kalp yüzeyinde fokal hemorajiler ve korneal lezyonlar gözlenmiştir. Balığın hematopoetik dokularında ve kanda bol miktarda bakteri bulunmaktadır. Akut epizootiklerde balıklarda hiçbir klinik bulgu gözükmezsiniz ölümler gözlenmektedir (Ellis, 1989, Inglis ve diğ., 1993, Actis ve diğ., 1999, Austin ve Austin, 2007, Kent ve Poppe, 2002, Leong ve Colorni, 2002).

Pedersen ve diğ. (1997)' nin *V. anguillarum*'un patojenitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada 18 farklı suş kullanmışlardır. LD₅₀ değerleri farklı bulunan bu suşlarda yüksek virülansa sahip suşların 24 saatte ölümlere neden olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada genellikle ilk 24 saat içinde ölen balıklarda çok az patolojik değişiklikler bulunmuştur. İlerleyen saatlerde patolojik değişiklikler şiddetlenmiştir. Deride ve kafada, operkulum, göz çevresi, ağız çevresi ve yüzgeç diplerinde hemorajiler dışında iskelet kaslarında hemoraji, anüsün dışarı çıkması gözlenmiştir. Ölümler orta şiddette virülansa sahip suşlarda 1-2 gün içerisinde, en düşük virülansa sahip suşlarda ise 14 güne kadar çıkmıştır (Pedersen ve diğ., 1997). Yongjuan ve diğ. (2002)' nin yaptıkları aşı etkinliği çalışmasında oluşturdukları deneysel enfeksiyonda $1,2 \times 10^{10}$ cfu/ml *V. anguillarum* hücrelerini alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon ile vermişlerdir. Aşılınmayan kontrol grubu balıkların enfekte olarak 7 gün içerisinde tamamının öldüğü gözlenmiştir (Yongjuan ve diğ., 2002).

Histopatolojik olarak hastalığın üç sistemik formuna göre değişik bulgular gözlenmektedir. Perakut formda kalpte sarkoplazmik vakuolizasyon ile kardiyak myopati, böbrek ve dalakta nekrozlar, periorbitalde ödem, akut formda karaciğerde fokal nekroz, böbrekte hematopoetik dokunun boşalmasını takiben renal tübüllere hatta renal dokular arası endokrin hücrelere kadar yayılan nekroz, dalakta hematopoetik dokuda boşalma şeklinde tanımlanan nekroz, kalpte daha az şiddetli lezyonlar ve kaslara kadar ilerleyen deri lezyonları, kronik formda ise bakterinin ürettiği hemolizinden ötürü meydana geldiği düşünülen melanomakrofaj merkezlerinde yüksek miktarda hemosiderin birikmesi önemli bulgulardır (Roberts, 1978, Inglis ve diğ., 1993, Actis ve diğ., 1999, Noga, 2000). Ransom ve diğ. (1984) *V. anguillarum* etkenli bir vibriosis

vakasında salmonlarda gözlenen histopatolojik değişiklikleri rapor etmişlerdir. Balıklarda lökosit sayısında azalma, vücut renginde kararma ve yüzgeç diplerinde peteşiyel hemoraji gözlenmiştir. Kan damarları ve hemorajik bölgelerde bakteriye rastlanmış, böbrek ve dalak ağır bir şekilde enfekte olmuştur. Karaciğerde, visceral peritonda, kalp kasında ve gevşek bağ dokuda yüksek oranda bakteriye rastlanmıştır. Kas, solungaç ve bütün sindirim sistemi kanalında hemorajiler gözlenmiştir. Dalağın ve böbreğin bağ dokusunun her yerinde nekroz ve ödem mevcuttur. Sinüzoitlere ve karaciğer hepatik venalara çok yakın yerlerde küçük çapta nekrozlar bulunmuştur. Sindirim sisteminin mukozasında, pH derecesi nedeni ile rektumdan, kanalın ön bölgesine doğru daha yaygın ve şiddetli nekroza neden olmuştur. Solungaçlarda ödem gözlenmiş fakat nekroz yada hiperplazi saptanmamıştır (Ransom ve diğ., 1984).

Nelson ve diğ. (1985)' nin yaptıkları çalışmada gökkuşağı alabalıklarında *V. anguillarum* enfeksiyonu sırasında bakterinin yerini histolojik kesitlerle incelemişler ve bakterinin başlangıçta dalakta ortaya çıktığı, hücrelerin sayısının artması ile enfeksiyonun ilerleyen aşamalarında böbrekte de bakteri hücreleri gözlendiğini rapor etmişlerdir. Balıklarda ölüm gerçekleştiğinde ise bir çok doku septik olup makrofajlar tarafından fagositoz saptanmamıştır (Actis ve diğ., 1999).

V. anguillarum suşları hem fenotipik hem serotipik karakterleri açısından heterojen özellik göstermektedir. Biyokimyasal özelliklerin suşlara göre değişiklik gösterdiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Breuil ve Haffner, 1989, Whitman, 2004, Austin ve Austin, 2007). Karşılaştırmalı çalışmalarda patojenik, çevresel ve referans suşların benzer oldukları fakat antijenlerin çapraz reaksiyon vermedikleri görülmüş, serolojik metotların *V. anguillarum* sınıflandırılmasında uygun olduğu kanıtlanmıştır. "Termostabil O antijeni" temel alınarak yapılan serotip sistemlerinin farklı ülkelerde farklı isimler altında anılmasının yarattığı karışıklığı düzeltmek için 1995 yılında Grizes ve Ollevier, *V. anguillarum* serolojisini karşılaştırmış ve toplam 16 farklı O serotipinin bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada aynı zamanda *V. anguillarum* O2 serotipi ile *V. ordalii*' nin antijenik yapılarının oldukça benzer olduğunu ve *V. ordalii*' nin, *V. anguillarum* O2 antiserumu ile çapraz-reaksiyonlar oluşturduklarını göstermişlerdir. Daha sonraları, Pedersen ve diğ. (1999) tarafından serotip çalışmaları ilerletilmiş ve *V.*

anguillarum O-serotip sayısı 23' e çıkmıştır (Grizes ve Ollevier, 1995, Pedersen ve diğ., 1999b).

Yapılan çalışmalarda serotip O2'nin 2 alt grubu olduğu bulunmuş ve O2a ve O2b olarak adlandırılmıştır. O2a grubu içeren bakteriler salmonid ve salmonid olmayan balıklardan izole edilmiş, O2b grubu içeren türler ise sadece salmonid olmayan balıklardan izole edilmiştir (Actis ve diğ.,1999). İrlanda'da yapılan Atlantik morinası yetiştiricilik işletmesi ağ kafeslerinde klinik bulguları taşıyan *V. anguillarum* etkenli doğal bir vibriosis vakası ile karşılaşmıştır. Bu rapor, İrlandadaki morinalarda ortaya çıkmış *V. anguillarum* O2b serotipinin neden olduğu ilk vakadır (Rodger ve Colquhoun, 2008).

Finlandiya, İsveç ve Danimarka'nın Baltık Denizi kıyı şeridini içine alan bölgede *V. anguillarum*' un önemli bir balık patojeni olduğu, Finlandiya ve İsveç' te yetiştirilen salmonlarda aşılama yapılmasına rağmen hala ani hastalık çıkışına neden olduğu gözlenmiştir. Finlandiya'da vibriosisin tuzluluğun % 0'a yakın olduğu Bothnia Körfezinin kuzey kısmının birçok bölgesi hariç tüm acı sularda enzootik olduğu ve *V. anguillarum*' un her yıl Bothnia Körfezi, Baltık Denizi ve Finlandiya Körfezinde hasta kültür balıklarından izole edildiği rapor edilmektedir. Bu bakteri İsveç ve Danimarka'da balık çiftliklerinde önceleri büyük problem oluşturmuştur. Ancak 1990' lı yıllarda başarılı aşılama çalışmaları ve profilaktik önlemlerin alınması ile hastalık çıkışında azalma olduğu bildirilmiştir (Pedersen ve diğ., 1999a).

Norveç'te 1980' li yıllarda bu patojen hem gökkuşağı alabalığı hemde salmonlarda önemli kayıplara neden olmuştur. Daha sonraki yıllarda yapılan başarılı aşı uygulamaları sayesinde patojenin etkisi azalmıştır. Ancak hastalık son yıllarda kültürü yapılan morina balıklarında da önemli kayıplara neden olmaya başlamıştır. Morina balıkları için aşı çalışmaları olmasına rağmen aşının koruması sınırlı kalmıştır. Bu hastalığa karşı ne aşı formülasyonu nede aşılama stratejisi hala yeterli düzeyde değildir (Mikkelsen ve diğ., 2007). Çin'de kalkan bireylerinde ortaya çıkan bir vibriosis vakasında, dış bakıda sadece yüzgeç erimeleri görülmüş fakat % 90-100'e varan mortalite ile sonuçlanmıştır (Austin ve Austin, 2007). Japonya' da ise kültürü yapılan tatlı su ayu (*Plecoglossus altivelis*) balıklarının en ciddi hastalığının, *V. anguillarum* etkenli vibriosis olduğu tespit edilmiştir (Hirono ve diğ., 1996). Türkiye'de *Vibrio*

anguillarum infeksiyonu ilk kez Candan (1993) tarafından kafeslerde kültürü yapılan çipura balıklarında bildirilmiş ve daha sonra Karadeniz’de üretimi yapılan Atlantik Salmonlarda da yoğun mortaliteye neden olduğu rapor edilmiştir (Candan, 2000). Muğla ili çevresinde yapılan başka bir çalışma ile vibriosis hastalığı belirtileri gösteren, yetiştiriciliği yapılan levrek balıkları ve kafeslerin etrafında bulunan kefal balıklarından *Vibrio anguillarum* izole edilmiştir (Demircan ve Candan, 2006).

V. anguillarum hastalık oluşturduğunda balık çiftliklerinde ani kayıplara yol açabildiğinden, balık kayıplarını azaltmak için hızlı teşhis zorunludur. Teşhisi klinik bulgular göz önüne alınarak, hedef dokulardan bakterinin izole edilmesi ile başlamaktadır. Biyokimyasal olarak seçici kültür vasatlarında üreme, O/129 filtre disklerine duyarlılık, nitrat indirgemesi, oksidaz ve katalaz üretimi, arjinin dekarboksilasyonu; serolojik olarak monoklonal antikorlar ile reaksiyonu (ELISA, FITC, vb.); moleküler olarak ise 16S rRNA problemleri ile hibridizasyon ve spesifik genlerinin çoğaltımı (PCR, RT-PCR) ile yapılmaktadır (Actis ve diğ., 1999, Austin ve Austin, 2007).

Candan (1993), Çipura balıklarından, Blanch ve diğ. (1997) kalkan larvalarından, Benediktsdóttir ve diğ. (1998) yaptıkları çalışmada deri lezyonları gözlenen salmonlardan izole ettikleri bakterilerin biyokimyasal testler ile *Vibrio anguillarum* olarak tanısını yapmışlardır. *Vibrio anguillarum* tanısında ayrıca, API 20E ve BIONOR Mono aglütinasyon hızlı tanı kitleri de kullanılmaktadır (Santos ve diğ., 1993, Romalde ve diğ., 1995, Blanch ve diğ., 1997, Benediktsdóttir ve diğ., 1998).

Bu biyokimyasal ve immünolojik metodların çoğu balıktan enfeksiyon etkeni bakterinin izolasyonuna ve kültürüne gereksinim duyar. Fakat moleküler tekniklerin saf kültüre gereksinimi yoktur. Martinez-Picado ve diğ. (1994) *V. anguillarum*’ un identifikasyonu için özgün prob olarak kullanılacak sentetik oligonukleotidleri tasarlamıştır. Bu oligonukleotidler, bir çok *V. anguillarum* suşundan izole edilen 16S rRNA dizileri karşılaştırılarak dizayn edilmiştir. Radyoaktif işaretli nukleotidlerin kullanıldığı bu çalışmada izole edilmiş DNA örneğinin yanı sıra homojenize edilmiş balık dokuları da kullanılmış ve başarılı sonuç alınmıştır. Ayrıca yine dokudan, kandan ve balıktan izole edilen saf kültürlerde PCR yöntemi kullanılarak bakterinin özgün *rpoN* geni çoğaltılmış

ve kısa sürede *V. anguillarum* teşhis edilebilmiştir (Martinez-Picado ve diğ., 1994, Gonzales ve diğ., 2003, Demircan ve Candan, 2006). Moleküler tekniklerin kullanımı *V. anguillarum*' un 24 saat içinde identifikasyonuna olanak sağlamaktadır (Actis ve diğ., 1999, Austin ve Austin, 2007).

Vibriozis stres kaynaklı hastalıklara klasik bir örnektir. Yüksek yoğunlukta bakıra (>30µg/ml) veya demire (>10µg/ml) maruz kalma Vibriozise olan hassasiyeti arttırmaktadır (Austin ve Austin, 2007, Noga, 2000). *V. anguillarum*' un kontrolü antibiyotik kullanımı, aşılama ve diğer bakteri kültürlerinin *V. anguillarum*' un üremesini inhibe etmesi özelliğini kullanarak yapılabilmektedir. Antibiyotikler ve diğer kemoterapetik maddeler vibriozisin tedavisinde yem içinde kullanılabileceği gibi direkt su içine de karıştırılabilmektedir. 1970' li yıllarda Japonya'da amfisilin, kloramfenikol, nalidiksik asit bileşikler, nitrofuranlı bileşikler, sülfonamidler ve trimetoprim rutin olarak vibriozis tedavisinde kullanılmıştır. Fakat bu bileşiklerin kullanımı ilaca dirençli suşların gelişmesine yol açmıştır. Moleküler genetik analizler ile antibiyotik direncini sağlayan genlerin plazmidlerde olduğu ve plazmidlerin bazı durumlarda konjugasyon ile başka bakterilere de geçebildiği bulunmuştur (Actis ve diğ., 1999).

Geleneksel aşılama formülle öldürülmüş *V. anguillarum* yada bakteriyel membran bileşenlerini içermektedir. Bu aşılama karın içi enjeksiyon şeklinde uygulanması ile immersiyon yada oral yoldan uygulanmasından daha verimli sonuçlar alınmaktadır. 1980' li yılların sonunda avirulent mutantlar kullanılarak canlı aşılama geliştirilmiştir. Avirulent türler modifiye edilmiş pJM1 plazmidini taşımaktadırlar. Bu plazmidin demiri kullanma genleri çıkartılmış, diğer türlere geçebilen bölgeleri mutasyona uğrattırılmış ve ya yeni bölgeler eklenmiştir (Actis ve diğ., 1999).

Vibriozis ile mücadelede önerilen diğer bir strateji ise normal bağırsak florası bakterilerinin ürettiği inhibitör maddelerin kullanılmasıdır. Kalkan balığı bağırsağında bulunan 400' den fazla izolat ile çalışılmış ve bunların %28'inin *V. anguillarum*' a karşı inhibitör etkiye sahip oldukları bulunmuştur (Actis ve diğ., 1999).

V. anguillarum çeşitli toksinler ve virülans faktörleri üreterek balığın savunma mekanizmasını çökertmektedir. Bu toksinler hemolizin, sitotoksin, proteaz, amilaz,

kazeinaz, jelatinaz, elastaz lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, tripsin, hemaglutinin ve ekstraselüler toksinlerdir. Virülans faktörleri ise hareketi sağlayan flagella, hücre yapıştıran faktörler, yüzey antijeni, pJM1 plazmidi, siderofor (anguibaktin) ve demiri tutan hücre zarı reseptörüdür (Kodama ve diğ., 1984, Mazoy ve diğ., 1992, Santos ve diğ., 1992, Hirono ve diğ., 1996, Actis ve diğ., 1999, Austin ve Austin, 2007, Rodkhum ve diğ., 2006). Demiri bağlı olduğu moleküllerden koparan siderofor (anguibactin) ve demirin bakteri tarafından kullanılmasını sağlayan genler en çok çalışılanlardır (Crosa, 1984, Actis ve diğ., 1986, Actis ve diğ., 1988, Wertheimer ve diğ., 1999, Welch ve diğ., 2000, Liu ve diğ., 2004).

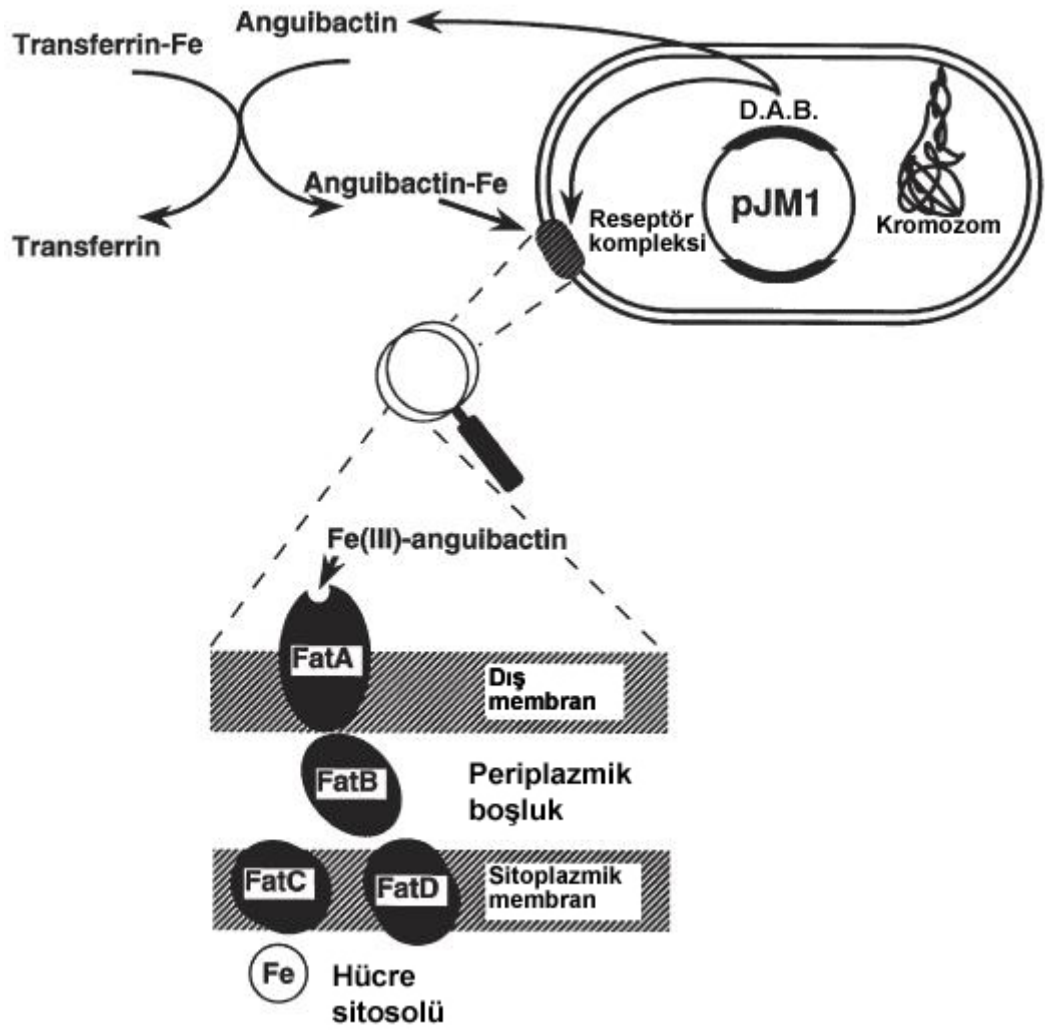
2.4. *VIBRIO ANGUILLARUM*' UN DEMİR BAĞLAMA ÖZELLİĞİ

Sideroforlar, bakterilerin demir yakalamak için ürettikleri düşük molekül ağırlıklı fakat demir ile çok yüksek bağlanma eğilimi gösteren bileşiklerdir. Sideroforların kateşol ve hidroksimat isimli iki farklı çeşidi bulunmaktadır. *V. anguillarum*' un sahip olduğu siderofor anguibactin ise bu iki çeşidin bir karışımı şeklindedir. (Crosa, 1984, Jalal ve diğ., 1989, Salyers and Whitt, 1994, López ve Crosa, 2007).

V. anguillarum' un sahip olduğu demir yakalama, bağlama ve kullanma mekanizması çok karmaşıktır. Önceleri bakterinin 65 kb uzunluğunda pJM1 plazmidi vasıtası ile demir tutma özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir (Crosa, 1984, DiLorenzo ve diğ., 2003). Daha sonra yapılan çalışmalarda plazmid taşımayan suşların da kromozom vasıtası ile sentezlenen, demir bağlama sistemlerinin (vanchrobactin vb.) yüksek bağlanma eğilimine sahip olabildiği bildirilmiştir. Demir bağlama sistemi, pJM1 plazmidinin kodladığı; demir taşınmasını sağlayan dört düzenleyici gen *fatA*, *fatB*, *fatC* ve *fatD*, bu demir taşınması genlerinin anlatımından sorumlu RNA α ve RNA β genleri, anguibactinin sentezlenmesinden sorumlu *angR* ve *angT* genlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.2). Ayrıca kromozomdan kodlanan Fur proteininin bu sentezlenmeyi durdurucu görevi vardır. Bu protein dışında henüz çok az bilinen kromozom kaynaklı birçok genin de bu görevi paylaştığı düşünülmektedir (Salinas ve diğ., 1989, Chen ve Crosa, 1996, Crosa, 1997, Welch ve diğ., 2000, Welch ve Crosa, 2005, López ve Crosa, 2007, Stork ve diğ., 2007).

Anguibactin, bakterinin bulunduğu ortamdaki demir azlığı ile pJM1 plazmidinin demir alım bölgesinden sentezlenmeye başlanır ve bakteri hücresi dışına salınır. Bu anguibactin konak transferrinine bağlanmış olan Fe^{+3} iyonunu koparıp bakteri hücresine taşır. Bu şekilde konak transferrinleri konak hücrelerine taşıyacakları Fe^{+3} iyonunu kaybederler. Balıkta bulunan transferrine bağlı demir, anguibactine bağlandıktan sonra dış membran reseptörü FatA tarafından tanınır ve FatB tarafından periplazmik boşluğa alınır. Sitoplazmik membran proteinleri FatC ve FatD, anguibactin-demir kompleksinin bakteri hücresi içine geçişini sağlar (Şekil 2.2) (Crosa, 1984, Jalal ve diğ., 1989, Köster ve diğ., 1991, Chen ve Crosa, 1996, López ve Crosa, 2007).

Pedersen ve diğ. (1997) *V. anguillarum* O1 serotipinin patojenitesi üzerine yaptıkları çalışmada pJM1 plazmidi varlığının ve siderofor üretiminin patojeniteye etkisini araştırmışlardır. 10^3 - 10^8 hücre/ml yoğunlukta bakteriyi enjeksiyon yöntemi ile intraperitoneal olarak balıklara uygulamış ve LD₅₀ değerlerini bulmuşlardır. 18 farklı suşun kullanıldığı çalışmada her suşun farklı LD₅₀ değeri olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada siderofor üreten suşlar karşılaştırılarak, patojenitenin siderofora bağlı olmadığı, ancak 67kb büyüklüğündeki pJM1 plazmidi içeren suşların daha yüksek virulansa sahip olduğu saptanmıştır. Örneğin iki siderofor üreten suştan birinin LD₅₀ değeri 10^8 ' den büyük iken diğerinin 10^5 bulunmuştur. Ayrıca 65 kb plazmid içermeyen 3 suşun da patojenitesinin düşük olduğu saptanmıştır (Pedersen ve diğ., 1997).



Şekil 2.2: pJM1 plazmidinin kodladığı demir alımı düzen şeması, D.A.B.: Demir Alım Bölgesi, (Actis ve diğ. 1999)

2.5. TELEOST BALIKLARDA KAN

2.5.1. Kanın Yapısı

Balıklarda kanın hacmi diğer omurgalılardan daha az olup, 2-17 ml/100 g arasındadır. Balık kanı diğer vertebralılarda olduğu gibi plazma ve içerisindeki katı cisimler yani kan hücrelerinden ibarettir. Berrak sarımsı renkli bir sıvıdan oluşan plazmanın %90'ından fazlası sudur. Geriye kalan kısmında erimiş halde anorganik iyonlar, kan proteinleri (ozmotik basıncı kontrol eden albümin, lipitleri taşıyan lipoproteinler, hemoglobin pigmentini taşıyan globülinler, bakırı bağlayan seruloplazmin, demiri taşıyan transferrin, kanın pıhtılaşmasını sağlayan fibrinojen ve anorganik iyodu bağlayan iyoduroforin), glikoz, lipoitler, amino asitler, vitaminler, atılacak maddeler,

erimiş gazlar, hormonlar ve enzimler bulunur (Hibiya, 1982, Demir, 2006, Timur, 2008).

Kan hücreleri, eritrosit, lökosit ve trombositler olmak üzere üç tiptir. Eritrositler, genellikle nukleuslu ve yassılaşımiş oval biçimdedir. Büyüklükleri 8,5-36 mikron çaplı olabilmekte ve türlere göre değişmektedir. Genellikle eritrositlerin büyüklüğü ile sayısı arasında ters bir orantı vardır. Farklı tür balıklarda farklı sayılarda bulunmakta ve $0,5-6 \times 10^6$ adet/mm³ kan olarak değişiklik göstermektedir (Roberts, 1978, Hibiya, 1982, Demir, 2006).

Eritrositlerin renginin kırmızı oluşu, renksiz bir protein olan globin ve sarı-kırmızı renkli hemden oluşan hemoglobinden ileri gelmektedir. Eritrositlerin en önemli görevi dokulara oksijen taşımak ve dokulardan çıkan karbondioksiti vücut dışına atmaktır. Kanın oksijen taşıma kapasitesi hemoglobinin miktarına, o da eritrositlerin sayısına göre değişir. Kanın oksijen bağlama gücünü arttıran hemoglobin, balıkların çoğunda kandaki oksijenin %90' dan fazlasını bağlayarak taşımaktadır. Az bir kısım oksijen ise kanda eriyik halde taşınmaktadır (Roberts, 1978, Hibiya, 1982, Demir, 2006, Timur, 2008).

Lökositler kanda eritrositlerden daha az sayıdadır. 1mm³ kanda 20-150 x10³ adet lökosit bulunmaktadır. Bu kan hücreleri oval veya yuvarlak şekillidirler. Beyaz kan hücreleri sitoplazmalarında granüllerin bulunmasına göre iki gruba ayrılır. Bunlar granülü bulunan granülosit ile granülü bulunmayan agranülositlerdir (Demir, 2006, Timur, 2006).

Granülositler tüm lökositlerin %4-40' ını oluşturur. Çapları 10 mikron dolayındadır ve içerdikleri granüllerin boyanma yeteneğine göre nötrofil, eozinofil ve bazofil olmak üzere üç tipe bulunmaktadır. Nötrofiller bağışıklıkta rol oynayan fagositik hücrelerdendir. Balıklar bakteriyel enfeksiyona maruz kaldıklarında sayılarında artış olabilmektedir (Roberts, 1978, Demir, 2006).

Bazofiller balıklarda ender olarak bulunur ve fonksiyonları henüz net olarak bilinmemektedir. En fazla bulunanlar ise nötrofillerdir. Nötrofiller ikinci önemli

fagositik hücre grubudur fakat kısa ömürlüdürler, partikülleri sindirdikten sonra ölürleri (Houston, 1990, Demir, 2006).

Agranüositler de monositler ve lenfositler olarak ikiye ayrılmaktadır. Monositler vücuda giren bakterileri ve diğer yabancı maddeleri fagosite ederek enzimleri ile imha edebildikleri için bunlara aynı zamanda fagositler de denilmektedir. Monositler sayıları az olan makrofaj rolündedirler (Roberts, 1978, Demir, 2006, Timur, 2006).

Lenfositler görevleri açısından ikiye ayrılmaktadır. Bir kısmı hücresel bağışıklıkta rol alırken, diğer önemli bir bölümü antikorları üreterek mikroorganizmaların üremelerini inhibe ederler. Çapları 4-12 mikron arasında değişmekte olan bu hücrelerin fagositik etkisinin de olduğu düşünülmektedir (Roberts, 1978, Houston, 1990, Demir, 2006).

Trombositler ise tüm lökositlerin neredeyse yarısını oluştururlar. İğ biçimine sahip bu hücreler kanın pıhtılaşmasında rol oynarlar. Bu hücrelerin çok düşük fagositik etkileri vardır (Roberts, 1978, Houston, 1990, Timur, 2006).

Mikroorganizmalar vücuda girdiğinde, spesifik olmayan immün sistem yanıt olarak hücresel ve humoral faktörleri harekete geçirir. Hücresel faktörler yani lökositler, mikroorganizmalara karşı vücutta bir inflamasyon geliştiğinde damarların dışına çıkarak dokulara göç ederler. Monositler makrofajlara dönüşerek nötrofiller ile birlikte, inflamasyon bölgesinde zedelenen, parçalanmış veya ölen hücre artıklarını ve mikroorganizmaları fagosite ederek ortadan kaldırırlar (Anderson, 1974, Timur ve Timur, 2003).

Enfeksiyonda önemli rolü olan kan hücrelerinin incelenmesi enfeksiyon hakkında bilgi vermektedir. Vücutta anemi varlığını gösteren testler; hemoglobin düzeyi, eritrosit sayısı, hematokrit değeri ve boyanmış kan frotilerinin incelenmesidir. Toplam lökosit ve farklılaşmış lökosit sayıları organik yada enfeksiyöz hastalık varlığını veya şüphesini göstermektedir (Blaxhall ve Daisley, 1973).

Sağlıklı levrek balıkları için bildirilen normal değerler eritrosit sayısı için $2,31-4 \times 10^6$, hematokrit değeri için % 34-43 olduğu rapor edilmiştir (Alvarez-Pellitero and Pintó, 1987, Başusta, 2005). Sağlıklı bir balıkta olgunlaşmamış eritrosit miktarı, toplam eritrosit miktarının % 1'i kadar olmalıdır (Roberts, 1978). Kan örneklerinde yüksek miktarda olgunlaşmamış eritrosit bulunması kendini yenileyen anemi göstergesidir (Stoskopf, 1993).

2.5.2. Kan Hücrelerinin Oluşumunda Görev Alan Organlar

Balıklarda kan hücrelerinin oluşumunda omurgalılarınkinden daha farklı ve fazla sayıda organ bulunmaktadır. Omurgalıların aksine balıklarda kemik iliği ve lenf düğümleri yoktur (Demir, 2006). Balığın embriyo döneminde kan hücreleri, kan damarlarından oluşur. Ergin pek çok balıkta farklı olmasına rağmen kemikli balıklarda dalak ve böbreklerin özellikle ön kısmında oluştururlar. Dalak böbreğe oranla daha az hematopoetik ve lenfoid hücre içerir (Timur, 2008)

Böbrek; Kemikli balıklarda böbrek temel hematopoetik (kan üreten) organdır. Hem anterior hem de posterior bölgesinde hematopoetik bölgeler mevcuttur. Posterior bölge aynı zamanda renal işlev görmektedir. Teleost balıklarda böbrek morfolojik yönden değişiklikler gösterse de, genel olarak farklı olgunluktaki kan hücreleri, endokrin ve salgısal fonksiyonları olan endotelial hücreleri içerir. Ayrıca böbrekteki hematopoetik kısmın içinde melano-makrofajların dağınık bir yapıda bulunduğu söylenmektedir. Melano-makrofajlar (melanin, lipofuksin ve hemosiderin pigmentleri içeren makrofajlar) diğer teleost türlerinde de böbrek, dalak ve karaciğerde toplu olarak bulunurlar. Pigment içeren melano-makrofaj merkezlerinin teleost balıkların immün sistemindeki rolleri henüz kesin olarak saptanamamış olsa da, bu merkezlerin kuşlarda ve memelilerdeki lenf nodüllerinin ilkel benzerleri olarak düşünülmektedir (Hibiya, 1982, Ferguson, 1989, Agius ve Roberts, 2003).

Timus; Genel olarak gelişmekte olan lenfosit hücrelerini içerir. Timus T hücrelerinin farklılaşması ve olgunlaşması için ana organdır ve yüksek miktarda lökosit içerir. Kemikli balıklarda dalak eritropoetik ve sekonder lenfoid bir organ iken, timus primer lenfoid organdır (Ferguson, 1989, Anonim, 2008).

Karaciğer; Balık karaciğerinin immün sistemde küçük bir rolü olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte dalak ve böbrek kadar olmasa da temizleyici bir görevi olduğu bilinmektedir. Levrek balıklarında pankreas, karaciğer içerisinde yer alır (Hibiya, 1982).

Bağırsak; Gastro intestinal kanal mikrobik invazyona karşı başarılı bir bariyer oluşturur. Bağırsakların sindirim faaliyeti için ortamdaki düşük pH, sindirim enzimleri ve safra nedeniyle potansiyel patojenler için oldukça zor bir ortam oluşturur. Teleost balıklarda lamina propria'da eozinofilik granüler hücreler ve intraepitelial lenfositler ile makrofajlar birlikte bulunurlar (Ferguson, 1989).

Dalak; kemikli balıklarda lenf düğümüne benzeyen tek bir organdır ve rengi koyu kırmızı ya da siyahtır. Dalağın beyaz pulpasında lökositler üretilirken, kırmızı pulpasında ise eritrosit ve trombositler üretilir. Kırmızı pulpa ve beyaz pulpa arasında kesin bir ayrılma olmayıp, birbirine içine girmiş bölgeler olarak bulunurlar. Dalağın büyük bir kısmını oluşturan kırmızı pulpa sinusoidleri destekleyen retikular hücre ağından oluşmaktadır. Beyaz pulpa ise melanomakrofaj yığınları ve elipsoidlerden oluşmaktadır. Teleostlarda dalağın kan üretimi, makromoleküllerin temizlenmesi, antijenlerin indirgenmesi ve antikör üretimi gibi fonksiyonları vardır. Dalağın spesifik ve spesifik olmayan immün sistemdeki rolü anterior böbreğe göre ikinci derecededir (Hibiya, 1982, Ferguson, 1989, Timur, 2008).

2.6. DEMİRİN CANLILAR İÇİN ÖNEMİ

Bakır, çinko, demir, kobalt, selenyum, mangan vb. gibi taşınır metaller, birçok organizmanın sağlığı için esansiyeldir. Balıklar, metal kazancını iki yoldan yani hem yemden hem de sudan alması özelliği olan tek omurgalı grubudur (Bury ve diğ., 2003).

Demir hemen hemen tüm organizmalar için gerekli bir elementtir. Çok hücreli organizmalarda, hemoglobinin **hem** kısmındaki demirin görevlendirilmesi, oksijen bağlama ve taşınma kapasitesini, tüm dokulara oksijen transfer edilebilirliği arttırmaktadır. Demirin anahtar hücre fonksiyonlarından biri, aerobik koşullarda elektron değişimi kabiliyetinden dolayı sitokromlara redoks aktivitesi vermektir. Aynı

zamanda dehidrojenaz, peroksidaz, katalaz gibi enzimlerin ko-faktörü olarak da görev almaktadır. Demirin negatif bir etkisi de aşırı miktarda serbest halde bulunduğu hücreler için toksik etki yapmasıdır. Ayrıca fazla miktardaki demir nötrofillerin ve monositlerin kemotaktik ve fagositik aktivitelerini de azaltmaktadır. Böyle durumlarda konak canlı bakteriyel enfeksiyonlara karşı daha hassas durumdadır (Salyers and Whitt, 1994, Colquhoun, 2002, Bury ve diğ., 2003).

Balıkların yaşadıkları sudan aldıkları demirin yanı sıra diyetle eklenen demirin büyüme etkilediği bildirilmiştir (Noga, 2000). Fakat demirin fazla olduğu ortamlarda *Vibrio anguillarum* ve *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* ile enfeksiyonun balığı daha kolay etkilediği bilinmektedir (Austin ve Austin, 2007, Noga, 2000, Rodrigues ve Pereira, 2004).

2.7. TRANSFERRİN

Savunmanın ilk tabakası olan epitel yüzeyler (deri, solungaç ve bağırsak) mukus tabakası ile kaplıdır. Mukusun en önemli görevi bakteri, mantar veya parazitlerin epitel yüzeye tutunmalarını önlemektir. Mukozal bariyerlere ilave olarak pekçok serum faktörü bulunmuştur. Transferrin demir bağlama özelliği ile en önemlilerinden birisidir. Bu glikoprotein kan dolaşımındaki serbest demir miktarını sınırlar. Memelilerde 77 kDa molekül ağırlığına sahip olan transferrinin balıklarda farklı molekül ağırlığa sahip değişik biçimleri izole edilmiştir. Kemikli balıklarda 61-87 kDa arasında değişen biçimleri bulunmaktadır (Yano, 1996).

Serum transferrin demir bağlayan proteinler ailesinin önemli bir üyesidir. Laktoferrin ve ovotransferrin de bu ailenin diğer üyeleridir. Bu üç protein de yapısal olarak birbirlerine çok benzemektedir fakat farklı fonksiyonları vardır. Transferrin, demirin ferrik iyonlar olarak kan aracılığı ile taşınmasını, yükseltgenmesini, kullanılmasını ve depolanmasını sağlar. Laktoferrin gözyaşında, sütte ve diğer vücut sıvılarında bulunur. Bu protein demire transferrinden daha sıkı bağlanır ve bakteriyostatik ajan görevi görür. Bakterilerin gelişimlerine yardımcı olan demirin ortamda serbest bulunmamasını sağlar. Ovotransferrin de kuş yumurta beyazlarında bulunur ve öncelikli olarak bakteriyostatik ajan olarak görev görür. Demir, kanda iki tane Fe^{+3} bağlayabilen transferrin proteini

tarafından taşınırken, dokularda ferritin adı verilen protein ile kompleks oluşturarak depolanır. Özel dokulara demir dağıtımını sağlayan, transferrin reseptörleri tarafından tanınan ferröz-transferrin (transferrin+Fe⁺³) kompleksleridir (Salyers and Whitt, 1994, Harris, 1998, Keha ve Küfrevioğlu, 2007).

Transferrin yüksek omurgalılarda biyolojik sıvılar yoluyla gerekli alanlara Fe⁺³ taşınmasını sağlayan ana proteindir. Bu protein esas olarak kan plazmasında, salgı sıvılarında örneğin sütte bulunmaktadır. Transferrin çoğunlukla demir bağlayan bir protein olarak bilinse de aslında çok işlevli bir proteindir. Antioksidatif ve antimikrobiyal koruma, farklılaşma ve hücre koruma aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır (Wojtczak ve diğ., 2007). Kandaki serbest demiri bağlayarak, bakteriyel patojenlerin ihtiyacı olan demiri almalarını engeller diğer bir deyişle bakteriyostatik bir ortam yaratır. Balıklarda da aynı görevleri üstlenmiştir. Oysa ki *V. anguillarum* sentezlediği siderofor (anguibaktin) sayesinde transferrinin bağladığı demir iyonlarını kopararak kendisi için kullanabilmektedir (Crosa, 1984, Actis ve diğ., 1986, Actis ve diğ., 1999, Ellis, 1999).

Transferrin öncelikli olarak karaciğer hücrelerinde sentezlenmektedir ama aynı zamanda beyin, kemik iliği ve testis gibi birçok değişik dokuda da anlatım yapmaktadır. Bu nedenle transferrinin demir bağlamaktan başka birçok biyolojik fonksiyonu da bulunmaktadır. Örneğin enzimlerin aktivasyonunda rol aldığı gibi son çalışmalarda balık makrofajlarının aktivasyonunda da başlıca görev aldığı bulunmuştur (Ekblom ve diğ., 1983, Idzerda ve diğ., 1986, Stafford ve Belosevic, 2003, Wojtczak ve diğ., 2005, Neves ve diğ., 2009).

Sistemik bakteriyel enfeksiyonlarda konağın immün yanıtı olarak kanda bulunan transferrin konsantrasyonu yükselmektedir. Bu yanıt bakterilerin kullanımını engellemek için serbest demir miktarını düşürmeye yarayan bir yanıt olarak saptanmıştır. Konak kanında bulunan transferrin miktarı patojene maruz kalan konağın belirlenmesinde önemli bir parametredir (Salyers and Whitt, 1994, Yano, 1996).

İmmünolojik olarak, *Onchorynchus keta* ve salmonid olmayan 12 farklı tür balığın antikorlarının kullanıldığı bir çalışmada salmonid transferrinlerin iki balık haricinde

çapraz reaksiyon verdiği gözlenmiştir (Yano, 1996). Atlantik salmonlarda yapılan bir çalışmada ise serum transferrin miktarını ölçmek için oluşturulan poliklonal transferrin antikorunun 10^{-1} oranında sulandırılan alabalık serumu ile düşük miktarda çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır (Røed ve diğ., 1995).

Neves ve diğ. (2009)' nin levrek balıkları ile yaptıkları *Photobacterium damsela* spp. *piscicida* deneysel enfeksiyon çalışmasında transferrin düzeyinin ve gen anlatımının nasıl değiştiğini tespit etmişlerdir. 96 saat (4 gün) süren enfeksiyon denemesinde hematokrit ve eritrosit sayıları da takip edilmiştir. Transferrinin kandaki miktarını tespit için likid-ferrozin metodunu, gen anlatımı tespiti için ise real time RT-PCR metodunu kullanmışlardır. 96 saat sonunda tüm kan değerlerinin en düşük seviyeye ulaştığı, kandaki transferrin doygunluğunun zamanla düştüğü, gen anlatımının ise ilk gün arttığı sonraki günler ise azaldığı saptanmıştır (Neves ve diğ., 2009).

2.8. GEN ANLATIMI VE ANALİZİ

Genlerin fonksiyonel yapısı canlı ile ilgili birçok bilgiyi sunmaktadır. Çevresel modifikasyonlar (kimyasallar, fizyolojik ve patolojik koşullar) transkriptom düzeyinde tepkilerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Farklı stok yoğunluğundaki balık popülasyonları üzerinde yapılan gen anlatım modifikasyon çalışmaları, stok yoğunluğu nedeni ile oluşan stresin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Aynı zamanda hayvanın durumunu belirlemek için moleküler biyomarkırlar güvenilir ve kolayca uygulanabilmektedir (Gornati ve diğ., 2005).

Bir gendeki bilginin anlatımı bir DNA kalıbından kopyalanan (transkripsiyon) bir RNA molekülünün sentezi ile gerçekleştirilir. Tüm RNA molekülleri DNA'da sürekli depolanmış bilgiden (bazı virüslerin RNA genomları dışında) oluşturulur. Transkripsiyon sırasında bir enzim sistemi, DNA zincirlerinden biriyle tamamlayıcı baz dizisi oluşturarak, çift zincirli bir DNA bölgesindeki genetik bilgiyi RNA zincirine aktarır. Başlıca üç tip RNA oluşturulur Haberci RNA (mRNA), taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribizomal RNA (rRNA). Gen anlatımı analizlerinde yararlanılan mRNA, bir gen yada gen takımı tarafından saptanan bir yada birkaç polipeptidin amino asit dizilerinin şifresini taşır. mRNA' ların içerdiği bilginin aminoasit dizilerine çevrilmesine

translasyon (protein sentezi) denir. mRNA hücredeki toplam RNA'ların yaklaşık % 5' ini oluşturur fakat büyüklük açısından en heterojen RNA tipidir (Tokullugil ve diğ., 1997, Turner ve diğ., 2000, Kılıç, 2005).

Belirli hücrel koşullarda veya gelişimin çeşitli evrelerinde değişik gen ürünlerine (protein) ihtiyaç duyulması ve ihtiyacı kadar gen ürünü sentezlenmesi için her bir genin anlatımı özenle yapılır. Proteinler bilgi akış yollarının çoğunda son üründür. Belirli bir anda, bir hücre binlerce proteine ihtiyaç duyar. Bu proteinler, hücrenin o andaki ihtiyacına göre sentezlenmeli, hücre içindeki uygun yerlere taşınmalı ve ihtiyaç kalmadığında yıkılmalıdır (Kılıç, 2005).

Bir türün ya da organizmanın her bir hücresinde her zaman gerekli olan ürünlerin genleri, neredeyse değişmeyen düzeyde anlatım yapar. Temel metabolik yolların enzimlerinin genleri housekeeping (internal kontrol) genler olarak tanımlanır (Sharkey ve diğ., 2004, Kılıç, 2005).

2.8.1. RNA İzolasyonu ve Saflaştırılması

Nükleik asitlerin temel rolü, genetik bilginin (bireyin canlılıkla ilgili tüm karakterlerinden sorumlu bilginin) saklanması ve dölden döle geçişinin sağlanmasıdır. Genetik bilginin önemli kısmının anlatımı (Gen anlatımı) proteinler biçiminde ortaya çıkar. Buna göre, genetik materyal görevini yüklenen nükleik asitler bireyin oluşumunu ve türüne özgü karakterleri kazanmasını proteinler aracılığıyla yönetirler. Nükleik asitlerden deoksiribonükleik asit (DNA) canlıların tümüne yakın kısmında genetik bilginin ana deposudur. Bu bilgi ribonükleik asit (RNA) molekülleri biçiminde kopyalanır (transkripsiyon) ve daha sonra protein biçimine çevrilir (translasyon). Protein sentezi nükleotid dizisindeki şifreye göre yapılır (Temizkan, 2008).

Hücrelerdeki total RNA bakterilerde toplam hücre ağırlığının %6' sını, gelişmiş yapılı canlılarda %1,1' ini kapsamaktadır. Parçalanmamış ve temiz RNA izolasyonu, gen anlatımı analizi çalışmalarında önemli bir aşamadır. İzolasyon sırasında en fazla karşılaşılan problem, aktivitesini uzun süre koruyan, ribonukleaz (RNaz) kontaminasyonudur. Bu tür sorunlardan kurtulmak için bütün çözümler, cam ve plastik eşyalar özel yöntemlerle hazırlanmalı ve steril edilmelidir. RNaz özellikle çalışanların

ellerinden bulaştığı için çalışma sırasında eldiven giyilmeli ve kirli maddelere dokunulduğunda eldivenler değiştirilmelidir. İzolasyonda kullanılacak çözeltiler RNaz'ın aktivitesini yok eden dietilpirokarbonat (DEPC) ile hazırlanmalıdır. Cam eşyalar, içinde %0,1 oranında çözünmüş DEPC bulunan su ile doldurularak 2 saat 37°C' de bekletilir. Daha sonra birkaç kez distile su ile çalkalanır ve 15 dakika otoklavlanır. Otoklavlama DEPC'nin uzaklaştırılması için gereklidir. Elektroforez tankı ve aparatları da DEPC içeren su ile yıkanmalıdır (Sisk, 1997, Sarıkaya, 2008)

RNA izolasyonu protokollerinin tümünde ilk aşama önce hücre çeperinin ve membranının parçalanmasıdır. Daha sonra hücre lizatının santrifüjlenmesi ile RNA diğer hücresel makromoleküllerden ayrılır. Son yıllarda üretilen ticari RNA izolasyon kitlerinin kullanımı RNA'nın parçalanmadan izole edilmesinde büyük kolaylık sağlamaktadır (Sarıkaya, 2008).

2.8.2. RNA' nın Analizi

2.8.2.1. Spektrofotometre

Işık enerjisine dayanılarak yapılan bir optik ölçüm yöntemidir. Spektrofotometre özellikle nicel çalışmalarda moleküler biyolojide en fazla kullanılan yöntemdir. Bir solüsyondaki makromoleküllerin miktar tayinlerinde yararlanılır. Bir molekül saf olduğu zaman belirli bir dalga boyundaki ışığı maksimum derecede emme özelliğine sahiptir. Bu özelliğe bağlı olarak geliştirilmiş absorpsiyon spektrometresi ile bir karışımdaki maddelerin nitel ve nicel analizlerini yapmak mümkün olur (Turner ve diğ., 2000, Temizkan, 2008).

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliği taşıdığından, bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsüdür. Buna göre, RNA' nın miktarı spektrofotometrede 260 nm dalga boylarında elde edilecek değerden belirlenebilir. 1 optik dansite (OD) tek zincirli RNA için 40 µg/ml' ye karşılık gelmektedir. Miktar belirlemek için kullanılan formül ise; RNA (µg/ml)= $A_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times 40$ 'dır. (Turner ve diğ., 2000, Sharkey ve diğ., 2004, Sarıkaya, 2008).

2.8.2.2. Elektroforez

Elektroforez, moleküllerin elektrik yüklerindeki farklılıklarına göre geliştirilmiş bir tekniktir. Bir elektriksel alanda çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızda hareket (göç) etmeleri prensibine dayanır. Elektroforezin bir homojenattaki farklı molekülleri ayırma kapasitesi genellikle sınırlıdır. Buna karşılık, az miktardaki protein ya da nükleik asitleri saflaştırmakta ve analizini yapmakta geniş çapta kullanılır (Temizkan, 2008).

Nükleik asitlerin ve proteinlerin çeşitli tiplerini ayırmakta genellikle jel elektroforezinden yararlanılmaktadır. Jel elektroforezi saflaştırılmış nükleik asit ve proteinlerin molekül ağırlığı, miktarı ve alt tiplerinin saptanmasında geniş ölçüde kullanılmaktadır (Turner ve diğ., 2000, Temizkan, 2008).

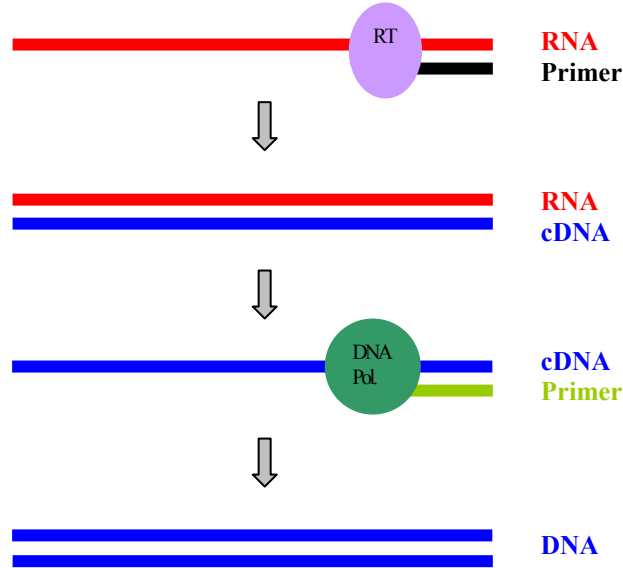
RNA analizinde farklı tipte jeller kullanılabilir. Formaldehit/agaroz jel kullanımı yükleme hacminin fazla olması ve çözünme gücünün yüksek olması nedeni ile tercih edilmektedir. Ayrıca gözenek özelliği nedeni ile Northern melezleme tekniği sırasında kapiler transfer ile RNA'nın membrana geçişi sağlanabilir (Sambrook ve diğ., 1989, Sarıkaya, 2008).

RNA, DNA agaroz jelinde olduğu gibi etidyum bromür ile boyanır. Parçalanmamış total RNA, agaroz jel üzerinde oldukça belirgin 28S (veya 23S) ve 18S (veya 16S) rRNA bantlarına sahiptir. RNA eğer elektroforez öncesi denatüre edilmemişse sekonder yapısını korumaktadır. Bu nedenle jelde farklı boyutlarda RNA görüntüsü oluşur. Agaroz jele eklenen formaldehit RNA'nın doğrusal şekilde kalmasını sağlar (Sambrook ve diğ., 1989, Sarıkaya, 2008).

2.8.3. Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

PCR yöntemi DNA dizisinin spesifik bir bölgesini *in vitro* olarak, bir çift oligonükleotid primer ve DNA polimeraz enzimi yardımıyla çoğaltmayı sağlamaktadır. RT-PCR ise, RNA PCR olarak da adlandırılan iki aşamalı bir PCR yöntemidir. Tek iplikli RNA örneklerinin "reverse transcriptase" enzimi yardımı ile geri transkripsiyonu yapılarak kopya DNA (cDNA) elde edilir. Çift iplik haline gelen bu örneklerden istenilen gen dizisinin PCR yöntemi ile çoğaltımı yapılır (Şekil 2.3.). Bu aşamalar tek bir tüpte tek bir

aşama olarak da gerçekleştirilebilmektedir. RT-PCR, transkripsiyonun yani gen anlatımının belirlenmesi için kullanılan yarı kantitatif bir yöntemdir (Sharkey ve diğ., 2004, Arı, 2008).



Şekil 2.3: RT-PCR' in işleyiş mekanizması ve bileşenleri, RT: Reverse transcriptase, cDNA: tamamlayıcı DNA, DNA Pol.: DNA polimeraz.

2.8.4. Northern Emdirimi (Blot)

Nükleik asit melezleme (hibridizasyon) yöntemleri; tek iplikli nükleik asit moleküllerinin tamamlayıcı dizileri ile uygun koşullar altında kendiliğinden eşleşerek çift iplikli melez moleküller oluşturma özelliğine dayanır. Bu melezleme reaksiyonları hem RNA hem de DNA molekülleri üzerindeki belirli nükleotid dizilerini tayin etmek için kullanılır. Araştırılan nükleik asit dizisine tamamlayıcı olan probların, radyoaktif veya radyoaktif olmayan bir belirleyici ile işaretlenmesi gereklidir. Melezlemede kullanılacak probun uzunluğu melezlemenin etkinliğini belirler. (Yılmaz ve diğ. 2008).

Northern emdirimi (blot), belirli dokular veya hücrelerden izole edildikten sonra jel elektroforezi ile ayrılan ve nitrosellüloz veya naylon membranlara transfer edilen özgün RNA dizilerinin saptanması ve analizi için uygulanan bir yöntemdir. İlgilenilen genin transkripsiyon ürünü olan RNA'nın analizinin yapılması bu yöntemde DNA-RNA melezlemesi ile mümkün olmaktadır (Yılmaz ve diğ. 2008).

Northern emdiriminde temel olarak prob hazırlama, denatürasyon, RNA'nın membrana aktarımı, fiksasyon, melezleme, yıkama ve belirleme aşamaları bulunmaktadır.

2.8.4.1. Prob Hazırlanması, Digoksinin (DIG) Sistemi

Digoksinin işaretleme sisteminde DNA, RNA ve oligonükleotidlerin işaretlenmesinde *Digitalis* bitkisinden elde edilen bir kardenolid steroid haptan olan "digoksinin", bir nükleotid trifosfat analogu olan urasil bakiyesine bağlı olarak DIG-11-dUTP yapısında bulunmaktadır. *In vitro* DNA sentezi reaksiyonu şeklinde gerçekleşen prob hazırlanması sırasında ortama 4 çeşit dNTP'nin yanısıra DIG-11-dUTP'de eklenir. Bu şekilde yeni sentezlenen prob, kalıp DNA zincirindeki her adenin nükleotidinin karşılığı olarak ya dTTP, ya da DIG-11-dUTP taşımaktadır. Yeni sentezlenen DNA'da her 20-25 nükleotidde DIG dUTP bağlanmaktadır (Yılmaz ve diğ., 2008).

Digoksinin (DIG) sistemi radyoaktif madde gerektirmeyen ama onlar kadar duyarlı olabilen bir sistemdir. Ayrıca hazırlanan problemlerin 1 yıl gibi uzun bir süre saklanabilmesi ve birden fazla melezleme reaksiyonunda kullanılabilmesi en önemli avantajlarından biridir (Yılmaz ve diğ., 2008).

2.8.4.2. Denatürasyon

DNA/RNA melezleme için prob ve hedef dizilerin tek iplikli hale getirilmeleri gerekmektedir. Denatürasyon adı verilen bu işlem, asit, ısı veya alkali uygulamasıyla yapılabilmektedir. Isı ile denatürasyon, uygulamanın basitliği ve daha etkili oluşu gibi nedenlerden ötürü daha fazla tercih edilen bir yöntemdir. Denatürasyon işlemi genelde morfoloji kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle bu işlem sırasında dikkatli olunması gerektiği ifade edilmektedir (Yılmaz ve diğ., 2008).

2.8.4.3. RNA'nın Membrana Aktarımı

Denatüre edilen RNA Glyoxal/DMSO içeren veya formaldehit içeren jel elektroforezi ile doğrusal RNA moleküllerinin birbirinden ayrılması sağlanır. Ardından jelin membrana aktarımı gerçekleştirilir. RNA'nın membrana aktarımında 3 farklı yöntem kullanılabilir; vakum transfer, elektro-emdirim veya kapiler aktarım.

RNA melezlemede nitroselüloz membranlar daha iyi bağlanma etkisi gösterse de melezleme ve yıkama aşamalarında sorun yaratmaktadır. Bu sorunun giderilmesi pozitif

yüklü naylon membranların kullanımı ile sağlanabilmektedir. Fakat bu membranlarda da çeşitli tipte arka planda melezlenmeler meydana gelmektedir (Sambrook ve diğ., 1989).

2.8.4.4.Fiksasyon

RNA molekülleri membrana aktarıldıktan sonra, membrana fikse edilmeleri yani pozitif yüklü membrane amine grupları ile RNA moleküllerinin bazıları arasında çapraz bağlar oluşturulması gerekmektedir. Bu işlem için birkaç yöntem kullanılmaktadır. Ya membran 254nm dalga boylu UV ışınına maruz bırakılmalı, ya 80°C'de vakum altında 30-120 dak. fırınlama yapılmalı yada 120°C'de 30 dak. normal fırınlarda tutulmalıdır (Sambrook ve diğ., 1989).

2.8.4.5.Melezleme (Hibridizasyon) Öncesi İşlemler

Melezleme işlemi sırasında problemlerin membrana ve kullanılan RNA populasyonunda özgül olmayan bölgelere bağlanmasını indirmek amacıyla ön melezleme işlemi gerçekleştirilmektedir. Hibridizasyon sıcaklığı kullanılan gene bağlı olarak aşağıdaki formülde belirtilen şekilde hesaplanarak belirlenmektedir.

$$T_m = 49,82 + 0,41 (\%G+C) - (600/l) \quad (l = \text{baz çifti biriminde hibrid uzunluğu})$$

$$T_{opt} = T_m - (20-25^\circ\text{C})$$

Isıya dayanıklı ve ağız kapaklı hibridizasyon tüpüne yerleştirilen membranın üzerine melezleme standart solüsyonu eklenerek, hesaplanan sıcaklıkta 30 dakika süreyle hibridizasyon fırınında inkübe edilmesi ile membranın ön hibridizasyonu gerçekleştirilmektedir (Roche, 2004, Yılmaz ve diğ., 2008).

2.8.4.6.Melezleme

Bu işlemde, prob olarak kullanılan işaretli ve hedef diziye tamamlayıcı olan DNA parçasının, tamamlayıcısı olduğu dizilerle bağlanması gerçekleştirilmektedir. İşaretlenmiş nükleik asit problemleri melezleme solüsyonuna aktararak önceden formül ile belirlenen sıcaklık derecesinde gece boyu melezlemeye alınmaktadırlar (Yılmaz ve diğ., 2008).

2.8.4.7.Melezleme Sonrası Yıkama İşlemleri

İşaretli prob hedef dizi dışında homoloji gösteren başka dizilerle özgül olmayan eşleşmeler yapabilmektedir. Bu şekilde oluşan melezler doğru eşleşme gösterenlere göre

daha dayanıksızdır. Bu nedenle zayıf eşleşmiş olanlar çeşitli yıkama işlemleriyle çözülebilmektedir. Yıkama işlemleri ile zayıf bağlanan prob membrandan uzaklaştırılarak, doğru eşleşme gösterenler membran üzerinde bırakılmaktadır. Probun uzun olması yanlış eşleşmelerin azalmasını sağlar (Yılmaz ve diğ., 2008).

2.8.4.8. İşaretli Probların Belirlenmesi

Radyoaktif olmayan prob işaretlerinin çoğu immünojeniktir. En çok kullanılan radyoaktif olmayan işaretler olan biotin ve digoksinin, kendilerine karşı oluşturulan antikor ile saptanabilmektedirler. Digoksinin, alkalik fosfataz enzimi bağı olan anti-digoksinin antikoruna ile belirlenmektedir.

Digoksinin siteminde, melezlenen problemlerin yapısında bulunan DIG-11-dUTP'lerin taşıdığı digoksinine özgül digoksinin antikoruna eklenerek antijen-antikor kompleksi oluşturulmaktadır. Bu kompleksin oluşumunu takiben alkalik fosfataz enziminin substratları olan NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat) ortama katıldığında enzim aktivite göstermektedir. Aktivasyon sonucunda mavi renkli ürün oluşumu ile hedef RNA belirlenmektedir. DIG ile işaretlenmiş DNA problemleri tüm hibridizasyon yöntemlerinde kullanılabilir (Sambrook ve diğ., 1989, Roche, 2004, Yılmaz ve diğ., 2008).

2.9. BALIKLARDA GEN ANLATIM ÇALIŞMALARI

Günümüzde organizmaların yapısal özelliklerinin ve işlevlerinin ayrıntılı incelenmesinde moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Canlıların yaşadığı ortamda herhangi bir değişiklik olduğunda örneğin sıcaklık artması, oksijen miktarı düşmesi, farklı besin içeriği kullanımında veya enfeksiyona maruz kaldığında, yapısal birçok genin, örneğin bağışıklık sistemi genlerinin anlatımındaki farklılık incelenerek canlı yapısındaki bilinmeyen yönler açıklığa kavuşmaktadır. Bu amaçla, levrek balıklarının larval gelişim döneminde hangi proteinlerin sentezlendiği Darias ve diğ. (2008)' nin "Microarray" tekniğini kullanarak yaptıkları gen anlatım modelleri çalışması ile saptanmıştır. Larvaların 7-43. günleri arasında bütün vücutta 6.626 ayrı genin anlatım yaptığı rapor edilmiştir (Darias ve diğ., 2008).

Başka bir çalışmada düşük dozda kadmiyum tuzuna maruz bırakılan Antarktika balığı (*Chionodraco hamatus*)' nin gen anlatım değişimleri “mRNA differential display” tekniği kullanılarak saptanmıştır. Alınan sonuçlar doğrultusunda karaciğerde iki grup genin kadmiyumla etkilendiği bildirilmiştir (Carginale ve diğ., 2002).

Low ve diğ. (2003)' nin yapmış oldukları çalışmada ise nükleotid destekli yemler ile beslenen kalkan balıklarında immün sistemde rol oynayan proteinlerden, IgM (immüoglobulin), RAG-1 (rekombinaz aktive edici gen-1), lizozim, transferrin, IL-1 β (interleukin-1 β), TGF β 1 (büyüme faktörü β 1)' in gen anlatım değişikliklerini incelemişlerdir. Balıkların solungaç, böbrek ve dalak dokusundan izole ettikleri RNA örneklerini kullanarak 35 döngülük RT-PCR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jelde yürütülmesi ile gen anlatımı farklılıklarını tespit etmişlerdir. Bulunan sonuçlara göre, IgM ve RAG-1 anlatımının solungaçta ve dalakta arttığı aksine böbrekte azaldığı, lizozim anlatımının böbrek ve dalakta azaldığı solungaçlarda değişmediği, IL-1 β anlatımının böbrekte arttığı diğer dokularda değişmediği, TGF β 1 ve transferrin anlatımındaki değişimlerde istatistiki bir fark olmadığı görülmüştür (Low ve diğ., 2003).

Enfeksiyona maruz bırakılan canlıların yapısının incelenmesi ve anlaşılması için de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin; kırmızı mercan balıklarının *V. anguillarum* ile enfeksiyonu sırasında, MHC Sınıf IIB gen anlatımının karaciğer, dalak, böbrek ve bağırsakta ilk 5-72 saatte arttığı, 96 saat sonrasında ise normal düzeye indiği belirlenmiştir (Chen ve diğ., 2006). Benzer bir çalışmada da alabalıkların akut IHNV (İnfeksiyöz hemapoetik nekrozis virüsü) enfeksiyonunda, MHC Sınıf IIB gen anlatımının dalak ve ön böbrekte 72 saate kadar anlatımının azaldığı 192 saat sonrasında kısmi olarak normale döndüğü tespit edilmiştir (Hansen ve La Patra, 2002).

Neves ve diğ., (2009) yaptıkları çalışmada ise *Photobacterium damsela* spp. *piscicida* deneysel enfeksiyon çalışmasında transferrin ve ferritin genlerinin anlatım farklılığını incelemişlerdir. Real time PCR yönteminin kullanıldığı çalışmada transferrin geni en çok karaciğerde anlatım yapmıştır (1.500.000 kopya). Diğer dokularda (dalak, karaciğer, böbrek, bağırsak, solungaç ve beyin) ise normal şartlarda çok az anlatım yapmıştır. İlginç bir bulgu olarak beyinden transferrin sentezlendiği ve anlatımının bu

dokuda artarken esas sentezlendiği yer olan karaciğerde anlatımın azaldığını saptamışlardır. Ferritin geni anlatımının ise tam tersi şekilde değiştiği tespit edilmiştir (Neves ve diğ., 2009).

Bayne ve diğ. (2001), yapmış oldukları çalışmada, bakteriyel enfeksiyon oluşturulan alabalıklarda akut faz yanıt oluşturan genleri araştırmışlardır. *V. anguillarum* ile intraperitoneal olarak enfekte edilen balıklardan dört gün boyunca örnekleme yapılmıştır. Transferrin proteininin akut faz proteini olduğu bulunmuş ve gen anlatımının arttığı rapor edilmiştir Fakat çalışmada kullanılan bakteri yoğunluğundan, balıkların enfeksiyon düzeyinden veya ölüm oranından bahsedilmemiştir (Bayne ve diğ., 2001).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEME

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Balıklar ve Sistem

Çalışma sırasında kullanılan tüm levrek balıkları Çanakkale İDA Gıda AŞ.'den temin edilmiştir. Strafor kutularda etrafına buz konulmuş içi hava dolu çift katlı naylon torbalar içerisinde pilot enfeksiyon denemesi için 13 Şubat 2007' de 200 adet, enfeksiyon denemesi için ise 02 Şubat 2008' de 105 adet levrek balığı, İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü deneysel balık hastalıkları laboratuvarına ulaştırılmıştır.

Deneysel balık hastalıkları laboratuvarında, toplam su kapasitesi 7000 L olan kapalı devre çalışan bir sistem mevcuttur. Bu sistem, biyolojik ünite, protein skimmer, UV dezenfeksiyon üniteleri ve 6 adet fiberglas tanktan (Ø90 cm, h:100 cm) oluşmaktadır (Şekil3.1.). Her tank, 50 L/dak su debisine sahip sirkülasyon pompaları ile beslenmektedir.

Gelen balıkların tuzlu su kapalı devre sisteminin sıcaklığına ve tuzluluğuna alıştırlarak tanklara aktarılması sağlanmıştır. 0,5 g ağırlığında gelen balıklar denemede kullanılabilmesi için >30 g ağırlığa ulaşana kadar yaklaşık 6 ay besiye alınmıştır. 22-24 °C sıcaklıklar arasında tutulan balıklar 5 g' a kadar % 6, 5 g' dan örnekleme yapılmaya kadar % 3 yemleme oranı ile beslenmişlerdir. % 68 proteine sahip toz yem, % 55 protein içeren 1 mm, % 53 protein içeren, 1,5 mm, % 50 protein içeren 2 mm, % 48 protein içeren 3 mm Aqualex marka ekstrude yemler ile balıklar beslenmiştir.

Deneme sırasında tankların vanaları kapatılarak, içlerindeki su miktarı 200 L olacak şekilde sabitlenmiş ve atmosferik hava ile oksijenlendirilmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan sistem, a) filtreler b) tanklar

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşları

V. anguillarum ATCC 14181 (CEFAS Weymouth laboratory., UK) referans suş olarak kullanılmak üzere Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu suşun patojenik özelliğinin olmadığı yapılan ön denemelerde belirlenerek esas deneme için Vibriosis hastalığı görülen, Muğla iline bağlı levrek balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerden *V. anguillarum* suşu izole edilmiş ve çalışmada kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Oksijenmetre (WTW oxy 330), pHmetre (WTW pH 330), Otoklav (Hirayama HL85), İnkübatör (Nüve), ELISA plak yıkama aparatı (Nunc 47017), Spektrofotometre (μ Quant), Melezleme Fırını (Thermo Hybaid Mini-dual 14), Mikrotom (LEICA RM2125 RT), Termal Döngü Cihazı (Biometra T-Personal), Elektroforoz (Thermo Mini Gel), Güç Kaynağı (Thermo), UV Transilluminator (Vilber-Lourmat), Çalkalamalı inkübatör (Barstead/LabLine), Soğutmalı santrifüj (Hettich), Masaüstü santrifüj (Eppendorf)

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Besiyerleri ve Kitler

Su Analizi için; Nitrit kiti (Merck 114658), Amonyum kiti (Merck 114657) ve Demir kiti (Sera Fe).

Bakteriyolojik örnekleme için kullanılan malzemeler; 2-Phenoxyethanol (Sigma P1126), Tryptic Soya Agar (Fluka 22091), Nutrient Broth (Merck 105443), Oksidasyon/Fermentasyon Besiyeri (Merck 110282), D+Glukoz (Merck 108337), Thiocyanate Bile Salt Sukroz Agar (Merck 110263), O/129 diskler (Oxoid DD014A), Maya Özütü (Oxoid LP021B), Ampisilin (Sigma A-9518), Safra Tuzları (Oxoid LP055J), D-Sorbitol (Fluka 85532), Agar agar (Merck 101613), NaCl (Riedel-de Haën 13423), NaOH (Riedel-de Haën 06203), Gliserin (Merck 104091), PIPES (Sigma P6757), FeCl₃ (Sigma 15774) MgCl₂.6H₂O (LaChema 30390), Chrome azurol S indikatör (Riedel-de Haën 33108), API 20E (Biomeri \square ux, Fransa), Mono-Va aglütinasyon kiti (BIONOR, Norveç).

Serolojik deneyler için kullanılan malzemeler; Giemsa (Merck 109204), May-Grünwald (Isolab), Methanol (Merck 6008), Phosphate Buffered Saline (PBS) tablet (Sigma P4417), Carbonate-Bicarbonate capsule (Sigma C3041), Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma A3803), Tween 20 (Merck S22164), HRP (Horseradish peroxidase) işaretli anti-rabbit Ig (Sigma A-2074), TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) (Sigma T0440), HCl (Riedel-de Haën 07102), UIBC/TIBC kit (Bilimsel Tıbbi Ürünler, İzmir, UIBC-50400).

Histolojik incelemeler için kullanılan malzemeler; Harris Hematoxylen Solution (Sigma HHS16), Eosin-Y %0,05 aqueous solutions (Merck 109844), Xylen (Riedel-de Haën 16446), Ethanol (Riedel-de Haën), neutral red, fast green FCF (Merck), Tek kullanımlık mikrotom bıçağı (Sakura 4689 Low Profile), Entellan (Merck 107961), Pul parafin (Isolab 56-58°C).

RNA izolasyonu ve analizi için kullanılan malzemeler; Ultraclean Tissue RNA Isolation Kit (MOBIO 15000-50), Trizma base (Sigma T-6791), Na₂EDTA (Sigma E-5134), Agarose (Sigma A5093), Riboruler RNA ladder, high range (Fermentas #SM1821), Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 99% (Sigma D5758), Formaldehit (Fluka 47630), Formamid (Merck 104008), MOPS (Sigma M5162), Filtreli Mikropipet Uçları (Finntips, Axygen), RNase free miktotüpler (Axygen MCT-150-C).

RT-PCR tekniğı için kullanılan malzemeler; Titan One Tube RT-PCR Kit (ROCHE 11939823001), Primerler (BioBasic), Etidyum bromid (Sigma E-1510), Glacial asetik asit (Merck 101056), 100 bp DNA ladder (Fermentas #SM0371).

Northern Blot tekniğı için kullanılan malzemeler; High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE 11732668001), DIG DNA Labeling and Detection Kit (ROCHE 11093657910), Tween-20 (Serva 39796), Maleik asit (Merck 800408), SDS (Sigma L-4390), Sodyum sitrat (Fluka 71402), NaH₂PO₄.2H₂O (Merck 106345), DIG Easy Hyb Granules (ROCHE 11796895001), Naylon membran, pozitif yüklü (ROCHE 1209299) Whatman 3MM CHR (3030-861).

Çalışmanın başında anti-levrek transferrin antikorunun TÜBİTAK bünyesinde yapılmasına karar verilmiştir. Levrek transferrin proteininin ticari olarak satılmaması ve

TÜBİTAK' ın levrek kanından transferrini saflaştırılamaması nedeni ile antikor üretilmemiştir. Çalışmada kullanılmak üzere Kanada Alberta Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümünde görev yapan Prof. Dr. Mike Belosevic' in tavsiyesi üzerine anti-sazan transferrin antikorunu kendisinden temin edilmiştir.

3.1.5. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

Natt-Herrick Solüsyonu

3,88 g	NaCl
2,50 g	NaSO ₄
1,74 g	Na ₂ HPO ₄
0,25 g	KH ₂ PO ₄
0,10 g	Metil menekşesi
7,5 ml	Formaldehit

Distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Whatmann kağıdı ile süzülerek kullanılmıştır (Noga, 2000).

PBS (Phosphate Buffered Saline) - %0,5 Tween

1 adet PBS tablet, 200 ml su içinde karıştırılarak eritilmiş ve otoklav yapılmıştır.

1 ml Tween 20 eklenip iyice karıştırılmış ve ELISA yönteminde yıkama solüsyonu olarak kullanılmıştır.

BSA (Bovine Serum Albumin)

PBS-%0,5 Tween içeren solüsyonda %0,5-1-3 yoğunlukta olacak şekilde BSA tartılmış ve 3 farklı solüsyon hazırlanmıştır.

% 10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)

10 g. SDS

90 ml su içinde çözdürülmüş, 68 °C' ye ısıtılıp distile su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır.

50X TAE(Tris Acetic Acid EDTA) Tamponu

242 g Tris base

57,1 ml Glasiyel asetik asit

37,2 g Na₂EDTA.2H₂O (pH 8,5)

Distile su ile 1 L' ye tamamlanmıştır.

% 1,5 Agaroz Jel

100 ml 1X TAE içine 1,5 g. Agarose eklenip eritilmiştir. 50-60 °C' ye kadar soğuyan jel içine 2-3 µl Etidyum bromid (10 mg/ml) eklenmiştir.

5X MOPS (4-Morpholinepropanesulfonic acid) Tamponu

0,1 M MOPS (pH 7)

40 mM Sodyum asetat

5 mM EDTA (pH 8)

Diethyl pyrocarbonate (DEPC) ile muamele edilmiş suda hazırlanmıştır.

% 7 Formaldehit % 1 Agaroz Jel

37,5 ml 1X MOPS

0,4 g Agarose mikrodalgada eritilmiştir. 45-50 °C'ye kadar soğutulan jel içine;

2,5 ml Formaldehit

1-2 µl Etidyum bromid (10 mg/ml) eklenmiştir.

Yıkama Tamponu

0,1 M Maleik asit

0,15 M NaCl

800 ml DEPC ile muamele edilmiş suda çözülmüştür.

5 M NaOH ile pH 7,5'a ayarlanmış,

DEPC ile muamele edilmiş su ile 1 L' ye tamamlanıp otoklav yapılmıştır. Kullanılacağı zaman içine %0,3 oranında Tween 20 eklenmiştir.

Deteksiyon Tamponu

0,1 M Tris-HCl

0,1 M NaCl

800 ml DEPC ile muamele edilmiş suda çözülmüş,

%37 HCl ile pH 9,5'a ayarlanmıştır.

DEPC ile muamele edilmiş su ile 1 L' ye tamamlanıp, otoklav yapılmıştır.

20x SSC

175,3 g NaCl

88,2 g Sodyum sitrat,

800ml DEPC ile muamele edilmiş suda çözülmüş,

5 M NaOH ile pH 7,0' ye ayarlanarak 1 litreye tamamlanıp, otoklav yapılmıştır.

20x SSPE

175,3 g NaCl

27,6 g NaH₂PO₄·H₂O

7,4 g EDTA

800ml DEPC ile muamele edilmiş suda çözülmüş,

5M NaOH ile pH 7,4'e ayarlanarak 1 L' ye tamamlanıp, otoklav yapılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1 Balıkların Bakımı ve Beslenmesi

Balıkların sisteme adaptasyonu tamamlandıktan sonra *Vibrio anguillarum* suşunun enfeksiyon oluşturabilme yeteneği ve LD₅₀ değerleri saptanmıştır. Her doz için 25 adet levrek balığı kullanılarak LD₅₀ değeri saptanan suş ile 2007 yılında pilot enfeksiyon denemesi yapılmıştır.

Enfeksiyon denemesi için 2008 yılında getirtilen balıkların adaptasyon süreci bittikten sonra enfeksiyon denemesi yapılmıştır. 100 adet levrek balığı ile paralelli deney grupları oluşturularak, balıklar iki kontrol ve iki deney tankına bölüştürülmüştür.

Balıklara deneme başlayana kadar yemleme yapılmıştır. 5 g ağırlığa ulaşınca kadar günde beş-altı kez, 5-20 g arası günde üç kez, 20 g üstü balıklar da günde bir kez yemlenmişlerdir. Enfeksiyon denemesi sırasında yemleme yapılmamıştır. Balıklara 12 saat gece/gündüz olacak şekilde fotoperiyot uygulanmıştır. Levreklerin yaşam koşullarına bağlı olarak buldukları suyun tuzluluk oranı ‰ 30 olarak sabitlenmiştir.

Çalışma süresince tanklardan hergün su örneği alınıp kitler yardımı ile NO₂, NH₄ ve Fe değerleri ölçülerek, NO₂ değerlerinin <0,5 mg/L, NH₄ değerinin <1 mg/L olmasına dikkat edilmiştir (Stickney ve Kohler, 1990). Demir değeri enfeksiyon boyunca kontrol grubu ve enfekte balık grubu sularında 0 mg/ml ölçülmüştür. Suyun O₂ değerleri oksijenmetre ile ölçülmüş ve deney boyunca >5 mg/ml olması için su havalandırılmıştır.

3.2.2. Bakteri İzolasyonu ve Üretimi

Çalışmada hem *V. anguillarum* ATCC 14181 referans suşu hem de Muğla iline bağlı bir işletmedeki hasta balıklardan izole edilen bakteri örnekleri kullanılmıştır. Örnekleme yapılan işletmeden, hastalık belirtisi gösteren levreklerin karaciğer, dalak ve böbreklerinden steril öze ile alınan örnekler %1,5 NaCl içeren Triptik Soy Agar (TSA) besiyerine inoküle edilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri laboratuvara getirilerek 23-25 °C' de 24 saat inkübasyonu yapılmıştır. Üreme olan besiyerlerinden saf koloniler elde edebilmek amacıyla %2 NaCl içeren TSA besiyerlerine azaltma yöntemiyle yeni ekimler yapılmış, 23-25°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda elde

edilen bakteri kolonileri morfolojik yapıları açısından incelenmiştir. Karışık olduğu belirlenen kültürlerden krem renkli, yuvarlak ve şeffaf *Vibrio* şüpheli koloniler alınarak %2 NaCl içeren TSA besiyerine ekilmiş ve yeniden aynı koşullarda inkübe edilmiştir.

3.2.2.1. Biyokimyasal Testler

Bakterilerin izolasyonu ile birlikte morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyonu için yapılan testler İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Gram boyama, hareket testi (asıllı damla metodu), sitokrom oksidaz, katalaz, O/F, O/129 testleri yapılmış ve tür adı belirleyebilmek için hızlı tanı kiti API 20E kullanılmıştır (Austin ve Austin, 2007, Çotuk, 2003, Timur ve Timur, 2003, Whitman, 2004). İzole edilen bakteri *V. anguillarum* kesin tanısı için ek olarak seçici besiyeri olan *Vibrio anguillarum* Medium (VAM, Alsina ve diğ., 1994) ve TCBS besiyerlerine ekilmiştir. Bakterinin tür tespiti için ayrıca BIONOR Mono-Va aglütinasyon kiti de kullanılmıştır.

3.2.2.2. Siderofor Üretiminin Belirlenmesi

İzole edilen *V. anguillarum* suşunun demir bağlama özelliğinin yani siderofor üretiminin belirlenmesi için Chrome Azurol S (CAS) agar kullanılmıştır (Podschun ve diğ., 1992, Pérez-Miranda ve diğ., 2007). Bu deneyde pozitif kontrol olarak kullanılan bakteri *Bacillus cereus*, İşleme ABD. koleksiyonundan temin edilmiştir. Petrilere dökülen CAS agar donduktan sonra üzerine sıvı besiyerinde üretilmiş *V. anguillarum* suşu ve pozitif kontrol *B. cereus* kültüründen 5 µl damlatılması ve aynı zamanda agarda üretilmiş bu suşların öze yardımı ile agara dokundurulması sonucu iki farklı yöntem ile deneme gerçekleştirilmiştir. Bakteri üremesi ve etrafında turuncu zon oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. Deneysel Enfeksiyon Oluşturma

3.2.3.1. LD₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

V. anguillarum olarak tanımlanan suşlar ve ATCC 14181 referans suşu ile iki ayrı deneme yapılmıştır. Bakteriler TSA'dan 250 ml NB içeren sekiz erlen içerisine ekilmiştir. 24 saat 24 °C'de çalkalamalı inkübatörde üretilen bakteriler santrifüjlenerek toplanmış ve PBS ile iki kez yıkanmıştır. PBS içinde toplanan bakteriler spektrofotometre ile 600 nm dalga boyunda 1 (~10⁹ ml⁻¹ bakteri) olacak şekilde ayarlanmıştır (Ellis, 1988, Colquhoun ve Sörum, 1998, Corripio-Miyar ve diğ., 2007). Hazırlanan bakterin 25 adet balık içeren dört adet deney grubu suyuna inoküle edilerek

10^3 , 10^4 , 10^5 , ve 10^6 ml⁻¹ yoğunluklarda *V. anguillarum* içeren tuzlu su oluşturulmuştur. Bu suşların LD₅₀ değerleri belirlenerek, kronik enfeksiyon oluşturan bakteri yoğunluğu enfeksiyon denemelerinde kullanılmıştır (Reed ve Muench, 1938, Salyers and Whitt, 1994).

Ayrıca üretilen bakteriler ile enjeksiyon yöntemi ile enfeksiyon oluşturma denemeleri de yapılmıştır. Bu denemelerde her iki suşun 10^3 ve 10^5 hücre/ml yoğunluğunda bakteri içeren PBS solüsyonu hazırlanmış ve 0,1 ml karın içine (intraperitoneal) enjeksiyonu yapılmıştır.

3.2.3.2. Pilot Enfeksiyon Denemesi

Levrek yetiştiren işletmeden izole edilen ve *V. anguillarum* olarak tanımlanan suş TSA'dan 250 ml NB içeren dört erlen içerisine ekilmiştir. 24 saat 24 °C'de çalkalamalı inkübatörde üretilen bakteriler santrifüjlenerek toplanmış ve PBS ile iki kez yıkanmıştır. PBS içinde toplanan bakteriler spektrofotometre ile OD₆₀₀=1 olacak şekilde ayarlanmıştır (Ellis, 1988, Colquhoun ve Sörum, 1998, Corripio-Miyar ve diğ., 2007). Bakteri içeren PBS solüsyonları iki adet deneme tank suyuna inoküle edilerek son hacmin 10^5 ml⁻¹ yoğunluğunda *V. anguillarum* içermesi sağlanmıştır. Bu denemede elde edilen örneklerin yetersiz olması nedeni ile ikinci bir deneme gerçekleştirmek zorunda kalmıştır.

3.2.3.3. Enfeksiyon Denemesi

2008 yılında getirtilen levrek balıkları ile esas enfeksiyon denemesi gerçekleştirilmiştir. *V. anguillarum* olarak tanımlanan suş TSA'dan 250 ml NB içeren dört erlen içerisine ekilmiş, 24 saat 24 °C'de çalkalamalı inkübatörde üretilmişlerdir. Üreyen bakteriler santrifüjlenerek toplanmış ve PBS ile iki kez yıkanmıştır. PBS içinde toplanan bakteriler spektrofotometre ile OD₆₀₀=1 olacak şekilde ayarlanmıştır (Ellis, 1988, Colquhoun ve Sörum, 1998, Corripio-Miyar ve diğ., 2007). Bakteri içeren PBS solüsyonları pilot enfeksiyon denemesinde uygulandığı gibi iki adet 25' er balık içeren tank suyuna, son hacim 10^5 ml⁻¹ yoğunluğunda *V. anguillarum* hücresi içerecek şekilde hesaplanıp inoküle edilmiştir. Denemede iki adet kontrol tankına deneme tanklarına eklenen bakterin miktarında steril PBS eklenmiştir. Balıklar deneme süresince durgun su içerisinde tutulmuşlardır.

3.2.4. Balıkların Örneklenmesi

Enfeksiyon oluşturulduktan sonra her gün ölmek üzere olan balıklar kepçe yardımı ile toplanarak incelenmiştir. Kontrol balıklarından ise paralel iki tanktan hergün birer adet balık örneklenmiştir. Ayrıca ölen balıklar da toplanmış fakat histolojik örnekleme haricinde hiçbir yöntem için incelemeye alınmamışlardır. Örneklenen tüm balıkların sayısı tablo 3.1.' de verilmiştir.

Tablo 3.1.: Günlük örneklenen canlı balık ve ölü balık sayısı

Örneklenen balık sayısı (adet)		
	Kontrol	Hasta
1. gün	2	2
2. gün	2	2
3. gün	2	3
4. gün	2	5
5. gün	2	3
6. gün	2	8
7. gün	0	0

Ölü balık sayısı (adet)		
	Kontrol	Hasta
1. gün	0	0
2. gün	0	2
3. gün	0	2
4. gün	0	6
5. gün	0	6
6. gün	0	6
7. gün	0	5

Anestezik madde olarak kullanılan 2-Phenoxyethanol, 0,2 ml/L konsantrasyonda olacak şekilde suya karıştırılmış ve balıklar bayıltılmıştır (Summerfelt and Smith, 1990, Çetinkaya ve Şahin, 2005). Balıkların enfeksiyon denemesinden önce strese girmemeleri için ağırlıkları ölçülmemiş, bu işlem balıkların hergün örneklenmesi sırasında gerçekleştirilmiştir. Ağırlıkları ortalama 31 g olan ve hastalık belirtileri kaydedilen balıkların ölmeden kan örnekleri alınmıştır.

3.2.5. Hematolojik Örnekleme

Bayıltılmış balık örneklerinden kaudal venadan enjektör yardımı ile heparinli ve heparinsiz tüplere yaklaşık 1,5 ml kan alınmıştır. Heparinli tüp, eritrosit, lökosit sayımı ve hematokrit ölçümleri için kullanılmıştır. Heparinsiz tüplerdeki kan örnekleri ise serumu ayrılarak transferrin ölçümü için kullanılmıştır.

Hematokrit ölçümleri mikrohematokrit yöntemi ile yapılmıştır. Kapiller tüplere alınan kan örneği 10.500 rpm hız ile 5 dk santrifüj edildikten sonra dereceli cetvel yardımı ile yüzde oranı hesaplanmıştır (Blaxhall ve Daisley, 1973). Lam üzerine alınan bir damla kan ile sürtme preparat hazırlanmıştır. Kanın şekilli elemanlarının tespit edilebilmesi için preparatlar May Grünwald-Giemsa boyama yöntemi ile boyanmıştır (Rowley, 1990, Başusta, 2005, Anonim, 2008).

Kan hücre sayımları hemositometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem için alınan kan örneklerinden 20 µl alınıp 4 ml Natt-Herrick solüsyonu içine karıştırılmıştır (Houston, 1990, Noga, 2000,). 5 dak. oda sıcaklığında bekleyen örneklerden Neubauer sayım kamarası yardımı ile hem eritrosit hem lökosit sayımları yapılmıştır. Eritrosit sayımları ortadaki küçük kareleri içeren büyük kareden beş orta boy kare içindeki eritrositlerin sayılması, lökosit sayımları ise ortadaki büyük karenin çaprazlarında bulunan büyük karelerden dört orta boy (toplam 20) karenin içindeki lökositlerin sayılması şeklinde yapılmıştır. 1 mm³' deki toplam hücre sayıları aşağıdaki formüllerde belirtilen şekilde hesaplanmıştır (Noga, 2000, Anonim, 2008).

Toplam eritrosit sayısı = sayılan hücre x 50 x 200 (sulandırım oranı)

Toplam lökosit sayısı = sayılan hücre x 10 x 200 (sulandırım oranı)

3.2.6. Bakteriyel Örnekleme

Balıkların diseksiyonundan sonra hızlı hareket edilerek karaciğer dokusundan RNA izolasyonu için örnek alınmış, karaciğerin dokunulmayan kısmından ise bakteriyel ekim yapılmıştır. Dalak ve böbrek boyut olarak küçük olduğundan histolojik örnekleme için kullanılmış, bakteriyel örnekleme için bu organlardan ekim yapılmamıştır. Ekimlerden üreyen bakterilerin biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. *V. anguillarum* şüpheli bu izolatlar ek olarak VAM ve TCBS besiyerlerine de ekilmiştir.

3.2.7. Histolojik Örnekleme

Bakteriyel ekim bitiminde geriye kalan kullanılmamış karaciğer dokusu ve diğer iç organların (dalak, böbrek, bağırsak, kalp) dokularından örnekler alınıp yaklaşık 0,5 cm³ boyutunda kesilerek %10'luk tamponlu formol içinde tespit edilmiştir. Standart doku işleme yöntemi izlenerek dokular önce suda yıkanmış daha sonra alkol serileri ve

kloroformdan geçirilerek ve parafine gömülmüştür. Parafin bloklar içerisindeki dokular mikrotomda 5 µm kalınlığında kesilmiştir. Kesitlerin parafinden temizlenmeleri için 3 ksilen serisi, etanol serileri (%90, %70 ve %50) uygulanmış ve akan su altında bekletilmişlerdir. Kesitler hematoksilin-eozin boyama yöntemi ile boyandıktan sonra etanol ve ksilende temizlenerek, entellan yardımı ile sabitlenmiş ve mikroskop altında incelenmiştir (Culling, 1963, Hinton, 1990). Gram negatif bakterilerin gösterilmesi için Ollett' in modifiye ettiği Twort Boyama Metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre suya kadar standart yöntemle göre getirilen kesitlerin boyanması gerçekleştirilmiştir. Örnekler asetik asit-alkolde boya akmayıncaya kadar bekletilmiştir. Ksilende temizlenen örnekler entellan ile sabitlenerek incelenmiştir. Metodun sonucunda pembe renkli bakterilerin gözlenmesi amaçlanmıştır (Culling, 1963).

3.2.8. Serolojik Örnekleme ve Transferrin Miktar Ölçümü

Balıklardan alınan kan örneklerinden serum ayrılarak sandwich-ELISA yöntemi ile transferrin miktarının enfeksiyon sırasındaki değişimi saptanmaya çalışılmıştır. Bu amaç için kullanılan anti-sazan transferrin antikorunu konsantrasyonunu hesaplamak için Warburg-Christian yöntemi kullanılmıştır (Arda ve Ertan, 2008). Konsantrasyonu belirlenen antikorun deneme için 3 farklı yoğunluğu (0,1; 1; 10 µg/ml) kullanılmıştır. 96 kuyulu plaklar anti-sazan transferrin Ig ile kaplanmış 1 gece +4°C'de bekletilmiştir. Ertesi sabah 5 kez PBS-%0,5 Tween solüsyonu ile yıkanan plaklar PBS ile 3 farklı oranda (%0,5; 1; 3) sulandırılan BSA ile kaplanarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. 3 kez PBS-%0,5 Tween solüsyonu ile yıkanan plaklar çalışmada elde edilen ve 3 farklı oranda (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) sulandırılan levrek serumları ile kaplanmıştır. 1 saat oda sıcaklığında bekletilen ve 3 kez PBS-%0,5 Tween solüsyonu ile yıkanan plaklara ilk kaplanan miktarda anti-sazan transferrin Ig eklenmiştir. Tekrar 1 saat oda sıcaklığında bekletilen plaklar 3 kez PBS-%0,5 Tween solüsyonu ile yıkanmıştır. 5 farklı yoğunlukta (10^{-1} - 10^{-5}) HRP işaretli anti-tavşan IgG eklenen plaklar 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 3 kez PBS-%0,5 Tween solüsyonu ile yıkanmıştır. En son olarak eklenen kromojen TMB ile 20 dk. Bekleyen plaklar üzerine 1 M HCl eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve spektrofotometre yardımı ile OD₄₆₀ nm'de yoğunluk ölçümleri yapılmıştır (Arkoosh ve Kaattari, 1990).

Bu çalışma ile kan örneklerinden ayrılarak -20°C 'de saklanan enfekte ve kontrol balıklarının serum örneklerinden ELISA yöntemi ile transferrin miktarının kandaki değişimine bakılmıştır. Ancak bu yöntemde kullanılan anti-sazan transferrin antikoru negatif örneklere yanlış pozitif reaksiyon verdiği için sonuçlar değerlendirilememiş ve bu yöntemin kullanımından vazgeçilmiştir.

Levrek balığına karşı özgül anti-transferrin antikorunun üretilmesi için denemeler yapılmıştır. Levrek kanından transferrin saflaştırma deneyleri İ.Ü. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde, sepharose dolgu maddeli kolon (CL-40B) kullanılarak yapılmış, elde edilen örneklerde transferrin proteinine rastlanmamıştır. Kullanılan kan miktarının düşük olması ve bu metodun ilk kez denenmesi sonucu transferin saflaştırması deneyinde başarısız olduğu düşünülmüştür. Ayrıca alınan serum örneklerinin -20°C ' de saklama sürelerinin dolması nedeni ile başka bir yöntemle geçme zorunluluğu doğmuştur.

Dolaylı olarak kandaki transferrin miktarını belirleyebilmek için ferrozine yöntemi ile kandaki doymamış demir bağlama kapasitesi (UIBC) ölçülmüştür. Bu yöntem için UIBC kit temin edilmiş ve serumlardan bu kit yardımı ile fotometrik olarak ölçüm yapılmıştır. Bu kitin işleyiş prensibi; bilinen bir miktar Fe^{+2} iyonu alkali pH' taki bir seruma ilave edilir. Fe^{+2} iyonları doymamış demir içeren transferrine bağlanır. İlave bağımsız Fe^{+2} iyonları ferrozin reaksiyonu (renk değişimi) kullanılarak ölçülür. İlave edilen Fe^{+2} iyonlarının miktarı ile ölçülen bağımsız iyonların arasındaki fark Doymamış Demir Bağlama Kapasitesi (UIBC)' dir. Bu da transferrin miktarının yaklaşık sonucunu vermektedir. Bu kit ile ölçülebilecek en yüksek değer ($500 \mu\text{g/dL}$) kit içerisindeki standart yoğunluğudur (BT Products, 2008).

Ayrıca İ.Ü. Mediko Sosyal Biriminde otoanalizatör kullanılarak 3. ve 6. gün serum örneklerinin demir miktarları da ölçülmüştür. Otoanalizatör için 1 ml serum örneği gerektiğinden her gün örnekleri için ayrı ayrı demir miktarı ölçümü yapılamamıştır. Transferrin doygunluğu (TD); kandaki demirin toplam demir bağlama kapasitesine oranı olarak tanımlanmaktadır. Formül olarak şu şekilde belirtilmektedir;

$$\% \text{TD} = \left[\frac{\text{serum demir miktarı}}{\text{serum demir miktarı} + \text{UIBC}} \right] \times 100 \quad (\text{McLaren, 2001})$$

3.2.9. Dokudan RNA İzolasyonu

Balıkların diseksiyonundan sonra hızlı hareket edilerek karaciğer dokusundan RNA izolasyonu için 10-30 mg alınmıştır. Doku örneklerinin total RNA izolasyonu hazır kit (MO BIO Ultraclean Tissue RNA Isolation Kit) kullanılarak günlük olarak yapılmıştır. Doku örnekleri RNaz içermeyen mikrotüplere konularak ağırlıkları ayarlanmış daha sonra pestle yardımı ile ezilmiştir. Önce lizis tamponu ile dokuların parçalanması sağlanmış, daha sonra filtrelili kolon içeren tüpler yardımı ile RNA örneklerinin kolonda tutunması sağlanmıştır. Yıkama solüsyonu ile temizlenen RNA örnekleri elüsyon tamponu ile kolondan ayrılarak temiz tüplerde biriktirilmiştir. İzole edilen RNA örnekleri 10 µl hacimlerde tüplere ayrılarak -20 °C' de saklanmıştır (MOBIO Laboratories, 2005).

Kontrol ve deney balıklarından izole edilen RNA örnekleri 1/500 oranında sulandırılmış ve absorpsiyon değerleri spektrofotometrede 260 nm dalgaboyunda ölçülmüştür. Ayrıca 280 nm dalgaboyundaki absorpsiyon değerleri ölçülerek saflıkları kontrol edilmiştir. RNA örneklerinin miktarları aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Turner ve diğ., 2000, Sarıkaya, 2008).

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times 40$$

Örnekler %1' lik agaroz, %7' lik formaldehit jel elektroforezinde 5 V/cm akım ile 45 dakika yürütülerek UV altında analiz edilmiştir (Sisk, 1997, Sambrook ve diğ., 1989).

3.2.10. RT-PCR (Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Elde edilen RNA örneklerinden transferrin geninin anlatımındaki değişikliklerin takibi RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Çalışma başladığı tarihte levrek balığı transferrin geninin tüm dizisi bilinmediğinden Chini ve diğ. (2006)' nin yaptıkları çalışmada bulunmuş levrek transferrin genine ait 29 EST (expressed sequence tag - anlatım yapan dizi etiketi), yakın diğer deniz balığı türlerinin (kırmızı mercan, siyah mercan vb.) transferrin genleri ile karşılaştırılmıştır. Bu diziler içerisinde uzunluğuna göre en yüksek homolojiye sahip CX535550 Genbank numaralı 815 bp uzunluğundaki EST (Şekil 3.4.) seçilerek, çoğaltılması için uygun primer tasarlanmış ve BIOGEN firmasına sentezlettirilmiştir.

1 caccaccgtt gattgccaga atgccccac agttgaggag tgcctcaaaa agattatgcg
 61 taaagaggct gacgcaatgg cagtggattg aggacnggtg ttccccttg aaagtntgg
 121 cnetggttcc tgttatggtg gagcagatg acgaacaaag tgcgccaacc ctggagagge
 181 ctctcttac tatgctgtg ctgtggtaaa gaagaattcg ggggtgacct gggacacact
 241 **gaagggcaag aggtcttgc** acacaggcct tggcagaaca gctggetgga acatccccat
 301 gggtcacatc catagtataa ctaatgactg tgacttcaact aagtcttca gtaggcggac
 361 tgtgccccg gagecanacc cagctcttcc ttctgacact cagtgtgccg gcagtggcaa
 421 agctgtggcg aatgagtcc aagtctctg ccagtgctat agagatacta cggtacact
 481 gaagctcaa tgtcttgta ggtgccggca ttttccttc atcaacaac acaattttc
 541 taaaacagc cgatggtcct gntccaccg tggccaagta gcttgaatt ccttatgact
 601 tccaactatt ttgccttaa agaaccctgg tgccagtct gataaacctt tgcacctg
 661 gtcttntcc cgaaccctg tagatcttcc gaaaacagta atttcgctc tcccagcac
 721 cgcaatttn gacacggcc ccangannc ctcaagagaa acnctcatn cnttgcagg
 781 ggaacacatt ggcganaata taggcatant tcata

Şekil 3.2.: CX535550 Genbank numaralı Levrek balığı transferrin gen EST dizisi

Primer 3 (2007) programı kullanılarak yapılan bu seçim sonucu EST'nin 183 bç'lik kısmını çoğaltabilecek primerler tablo halinde aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.2. Transferrin geni EST çoğaltımı için kullanılan primer dizileri

İleri primer	5'-AATGGCAGTGGATTGAGGAC-3'
Geri primer	5'-CAAGACCTCTTGCCCTTCAG-3'

Bu çalışmada transferrin gen EST'sinin çoğaltılması yanında korunmuş internal gen dizisi olarak 541 bç uzunluğunda β -aktin geni de çoğaltılmıştır. β -aktin geni çoğaltımı için Laing ve diğ. (1999)' nin yaptıkları çalışmada kullanılan primerler BİOGEN firmasına sentezlettirilmiştir (Tablo 3.)

Tablo 3.3. β -aktin geni çoğaltımı için kullanılan primer dizileri

İleri primer	5'-ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC-3'
Geri primer	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

RNA örneklerinin hepsi aynı konsantrasyonda olacak şekilde sulandırılarak ROCHE Titan One Tube RT-PCR Kit yardımı ile RT-PCR yapılmış ve beklenen bantlar %1' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV altında analiz edilmiştir (Sisk, 1997, Sambrook ve diğ., 1989).

RT-PCR kiti firmanın tavsiyesi doğrultusunda kullanılmıştır. İki farklı karışım buz içerisinde hazırlanmış tek bir tüpte karıştırılarak ısı döngü cihazına yerleştirilmiştir. 42°C' de 50 dk ön bekletmeye tabi tutulan örnekler, ilk döngü için 94°C' de 5 dk, sonraki 35 döngü için 94°C' de 45 sn, 57°C' de 45 sn, 72°C' de 45 sn, en son olarak da 72°C' de 10 dk tutulmuş, reaksiyon bitiminde +4°C' de saklanmışlardır. Her iki gen için de aynı koşullar kullanılmıştır (Laing ve diğ., 1999). Jelde gen anlatım farkını görebilmek için RNA örnekleri 1 ng, 100 pg ve 10 pg/μl yoğunlukta kullanılmıştır.

RT-PCR' da kullanılan maddeler

Master mix 1:

steril su	14,5 μl
dNTP mix	4 μl
DTT solüsyonu	2,5 μl
RNaz inhibitörü	1 μl
primer F (100 pmol)	1 μl
primer R (100 pmol)	1 μl
kalıp RNA	1 μl

Master mix 2:

steril su	14 μl	
5X RT-PCR tamponu	10 μl	
Enzim karışımı	1 μl	(ROCHE, 2005)

3.2.11. Northern Emdirimi

Northern emdirimi yönteminde öncelikle kullanılacak DIG (digoxigenin-dUTP) işaretli prob hazırlanmıştır. Problar transferrin geni ve β-aktin geninin RT-PCR yöntemi ile çoğaltılması sonucu elde edilmiştir. DNA örnekleri, PCR ürünü saflaştırma kiti (ROCHE) kullanılarak saflaştırılmış ve ROCHE firmasından temin edilen "DIG DNA Labeling and Detection Kit" kullanılarak DIG ile işaretlenmesi sağlanmıştır. DNA

örneklerinden 10,5 µl alınarak (2 µg) üzerine 4,5 µl dH₂O eklenerek toplam hacim 15 µl'ye ayarlanmıştır. 10 dakika süre ile kaynayan su içerisinde tutulmuştur. Ardından 5 dakika süre ile buzda bekletilmiş ve üzerine kit içerisinde yer alan hekzanükleotid karışımından 2 µl, dNTP işaretleme karışımından 2 µl ve Klenow enziminden 1 µl eklenmiş ve gece boyu (16 saat) 37°C'de inkübe edilmiştir. Takip eden gün örnekler üzerine 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) eklenerek 65°C'de 10 dakika süresince tutulmuştur. Protokolde belirtildiği şekilde sulandırmalar yapılarak melezleme sırasında kullanılabilir DIG işaretli prob miktarı belirlenmiştir (ROCHE, 2004).

Transferrin ve β-aktin gen problemleri için aşağıda belirtilen formül kullanılarak melezleme sıcaklığı hesaplanmıştır (ROCHE, 2004, Yılmaz ve diğ., 2008).

$$T_m = 49,82 + 0,41 (\%G+C) - (600/l) \quad (l = \text{baz çifti biriminde hibrid uzunluğu})$$

$$T_{opt} = T_m - (20-25^\circ\text{C})$$

İki genin ortak olduğu 50°C sıcaklık melezleme için kullanılmıştır. Bu çalışmada İ.Ü. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümüne ait melezleme fırını kullanılmıştır.

Total RNA örneklerinden 15 µg yoğunlukta alınarak formaldehit agaroz jele yüklenmiştir. 5 V/cm akım ile 45 dakika yürütülen RNA örnekleri UV altında bakılarak sağlam örneklerin melezlemeden önceden belirlenmesi sağlanmıştır. Blotlama yapılacak tank 10x SSPE tamponu ile doldurulmuştur. İki adet Whatmann kağıdı ve bir adet naylon membran agaroz jelin boyutlarında kesilmiştir. Uzunca kesilen bir adet Whatmann kağıdı ise iki ucu da tampona değecek şekilde yerleştirilmiş, üzerine RNA örneklerinin bulunduğu jel yerleştirilmiştir. Jel üzerine aynı boyutlarda kesilen membran ve onun üzerine de Whatman kağıtları konulmuştur. En üste jel boyutunda kesilmiş emici kağıt havlular konularak, ~300 g ağırlık yardımı ile sabitlenmiştir. Şekil 3.5'te görüldüğü gibi kapiler transfer sistemi oluşturularak gece boyu bekletilmiştir. Ertesi sabah jel atılarak naylon membran 2x SSC'de ıslatılmıştır. Membran 120°C'lik etüvde 30 dk tutularak RNA'nın membrana tutunması sağlanmıştır. Daha sonra naylon membran 50°C'ye ayarlanmış hibridizasyon fırınında 12 ml melezleme solüsyonu (Hibridizasyon solüsyonunun miktarı membranın boyutuna göre hesaplanmıştır) içeren

steril falkon tüplerde 30 dakika süreyle tutulmuştur. Önceden hazırlanan DIG ile işaretlenmiş transferrin probu membranın bulunduğu şişeye eklenerek gece boyu melezlemeye alınmıştır. Aynı anda aynı örnekleri içeren başka bir membran da diğer bir tüp içinde β -aktin probu ile melezlemeye tabi tutulmuştur (Yılmazer ve diğ., 2008).

Ertesi gün, probalar -20°C 'ye kaldırılmıştır. Membran ise 2x SSC ve %0.1 SDS içeren yıkama solüsyonu ile iki kez 5'er dakika süreyle yıkanmıştır. Daha sonra hibridizasyon fırınında $65-68^{\circ}\text{C}$ 'de 0.5x SSC ve %0.1 SDS içeren yıkama solüsyonunda iki kez 15'er dakika süreyle yıkanmıştır. Membran RNaz içermeyen ağzı kapaklı bir kaba alınarak 1-5 dakika süreyle yıkama tamponunda, 30 dakika 50 ml bloklama solüsyonunda ve iki kez 15'er dakika süreyle 40 ml yıkama tamponunda çalkalayıcıda yıkanmıştır. 2-5 dakika süreyle 10 ml deteksiyon tamponunda hareketsiz tutularak bu sürenin sonunda taze hazırlanmış olan 10 ml BCIP-NBT substrast solüsyonunda karanlıkta 6-12 saat süreyle tutularak renklenmeleri beklenmiştir (Sambrook ve diğ., 1989, ROCHE, 2004).

Melezlemenin oluşumu, probaların yapısında bulunan dUTP'lerin taşıdığı digoksisenin ile alkali fosfataz enzimine bağlı anti-digoksisenin antikoru arasındaki immünolojik reaksiyona göre belirlenmiştir. Meydana gelen kompleksdeki alkali fosfataz ile substrat bir araya geldiğinde mor renk oluşturmuştur. Elde edilen renklerin yoğunluğuna göre değerlendirmeler yapılmış, kontrol balıkları ile enfekte balıklar arasında gen anlatım farklılığı gözlenmiştir. Transferrin geni anlatımının miktarı ile kontrol geni β -aktin' in anlatımının melezleme sonucu oluşan farklar birbiri ile kıyaslanmıştır (Sambrook ve diğ., 1989).



Şekil 3.3.: Kapiler aktarım sistemi

4. BULGULAR

4.1. BAKTERİYOLOJİK BULGULAR

İzole edilen *V. anguillarum* suşu ile ATCC 14181 referans suşunun morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin hemen hemen aynı olduğu, izole edilen suşun sadece API 20E kitinde indol testine negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Yapılan standart biyokimyasal testler sonucunda bu suşların yuvarlak, krem renkli koloniler oluşturduğu, Gram (-), hareketli kıvrık basiller olduğu gözlenmiştir.

Daha önceki dönemde izole edilmiş *V. anguillarum* suşlarından farklı olan bu izolat ek olarak seçici besiyeri olan VAM ve TCBS besiyerlerine ekilmiştir. Seçici besiyeri TCBS’ de üreyen sarı koloniler (Şekil 4.1), VAM’ da üreyen sarı koloniler ve etrafında bulunan hidroliz zonu bakterinin *V. anguillarum* olduğunu doğrulamıştır (Şekil 4.2). *V. anguillarum* teşhisi için yapılan testlerin sonuçları ve API 20E profili tablo halinde verilmiştir (Tablo 4.1, 4.2).

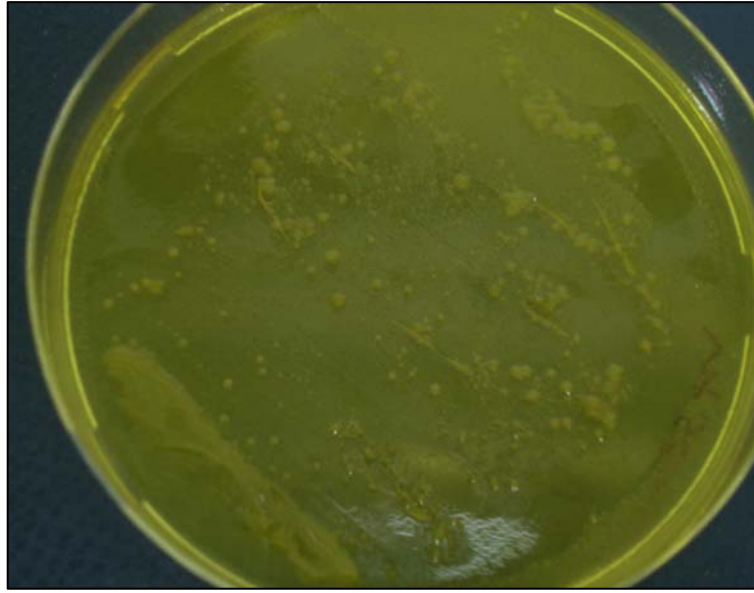
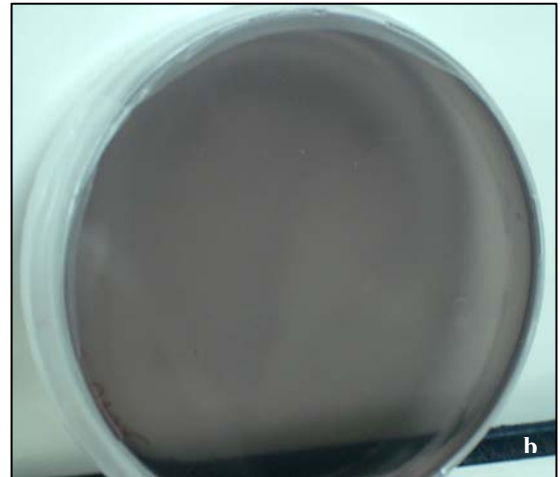
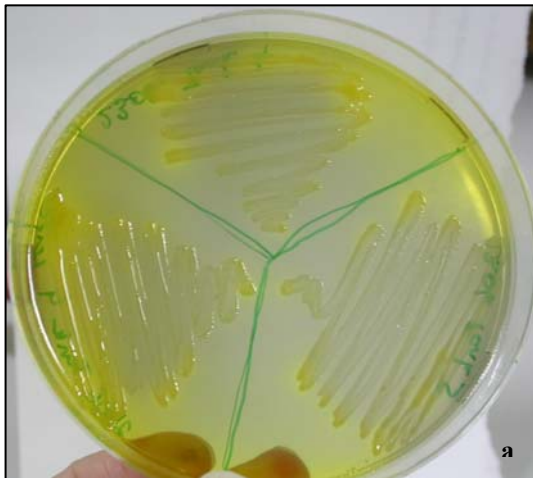
Tablo 4.1: İzole edilen *Vibrio anguillarum* suşunun fenotipik özellikleri

Test isimleri	<i>V. anguillarum</i> ATCC 14181	<i>V. anguillarum</i> (hasta balıktan izole edilen suş)
Gram	-	-
Hareket	+	+
Sitokrom oksidaz	+	+
O/F	F	F
O/129 (10 ve 150 µg)	H	H
VAM’ da üreme	+	+
TCBS Agarda üreme	+	+
BIONOR Mono-Va Aglütinasyon	+	+
-: negatif +: pozitif F: Fermentatif H: Hassas		

Tablo 4.2: *V. anguillarum* suşlarının API20E Profilleri

SUŞ ADI	ONP	ADH	LDH	ODH	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
ATCC 14181	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>V. anguillarum</i> suşu	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+

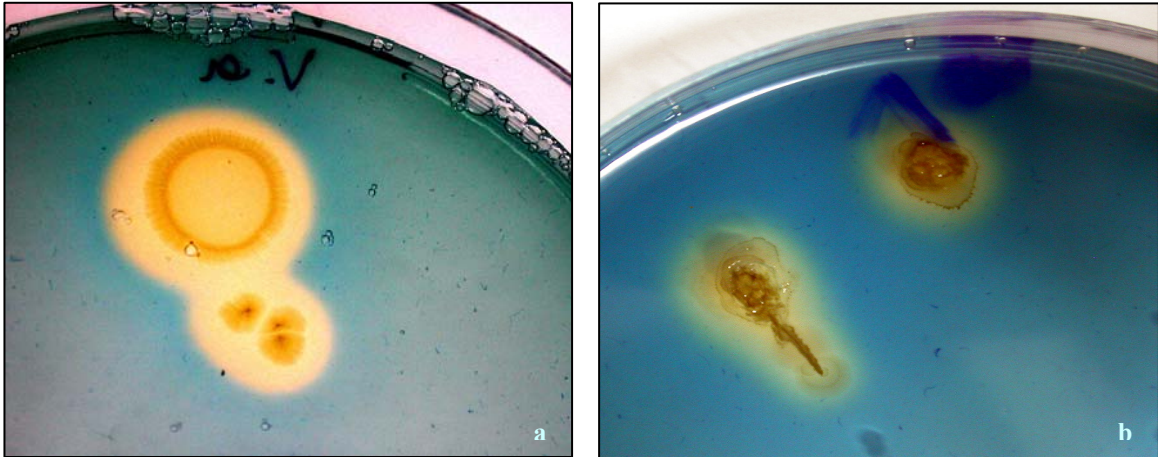
ONPG: , ADH: Arjinin dihidrolaz, LDH: Lizin Dihidrolaz, ODH: Ornitin dihidrolaz, CIT: Sitrat kullanımı, H₂S: Sülfür oluşumu, URE: Üre kullanımı, TDA: , IND: İndol oluşumu, VP: Voges-Proskauer, GEL: Jelatin kullanımı, GLU: Glukoz kullanımı, MAN: Mannitol kullanımı, INO: İnozitol kullanımı, SOR: Sorbitol kullanımı, RHA: Rhamnoz kullanımı, SAC: Sakkaroz kullanımı, MEL: Melibiyoz kullanımı, AMY: Amygdalin kullanımı, ARA: Arabinoz kullanımı, OX: Oksidaz üretimi

Şekil 4.1: TCBS besiyerinde üremiş *V. anguillarum* kolonileriŞekil 4.2: a) VAM besiyerinde üremiş *V. anguillarum* kolonileri
b) Ekim yapılmamış VAM besiyeri

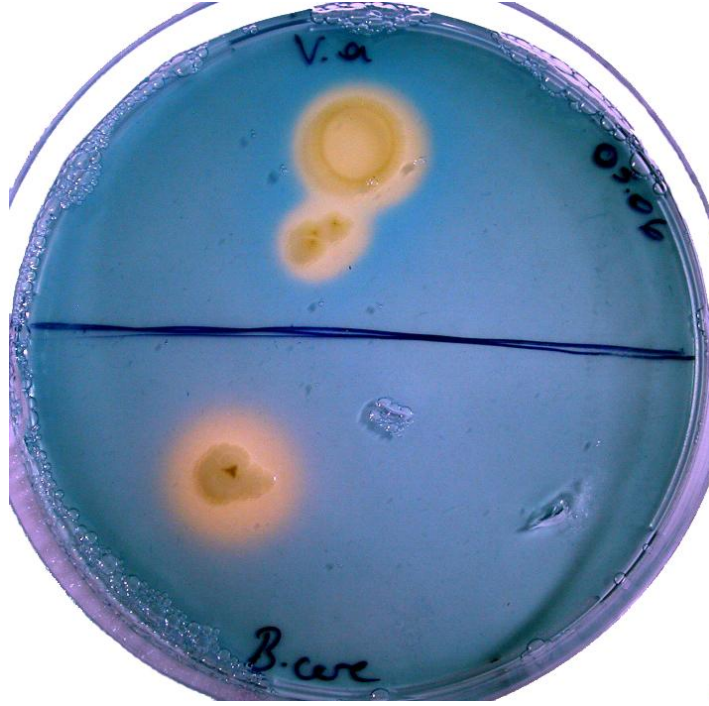
Çalışmada ilk olarak *V. anguillarum* ATCC 14181 referans suşu ile suya inokulasyon yöntemi kullanılarak 4 ay süren bir enfeksiyon denemesi yapılmıştır. Fakat bu suşun patojenitesinin düşük olduğu ve enfeksiyon oluşturmadığı gözlenmiştir. Enjeksiyon yöntemi ile yapılan denemelerde ise enfeksiyon akut formda gelişmiştir. Akut enfeksiyon nedeni ile bu denemede kullanılan balıklar 2-7 gün içerisinde ölmüş ve bu kadar kısa zamanda detaylı bir enfeksiyon takibi yapılamayacağına karar verilmiştir.

4.1.1. Siderofor Üretimi Bulguları

İzole edilen *V. anguillarum* suşunun siderofor üretimi deneyi sonucunda CAS Agar' da üreyerek oluşturduğu turuncu renkli zon ile siderofor ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Pozitif kontrol olarak kullanılan *B. cereus* suşu da siderofor üretmiştir (Şekil 4.4). Siderofor ürettiği tespit edilen *V. anguillarum* suşu ile suya inokulasyon yöntemi kullanılarak enfeksiyon oluşturma çalışmalarına başlanmıştır.



Şekil 4.3: CAS besiyerinde üremiş *V. anguillarum* kolonileri; a) Sıvı besiyerinden damlatma yöntemi ile yapılan deneme sonucu üreme b) öze ile ekim sonucu üreme



Şekil 4.4: CAS besiyerinde üremiş *V. anguillarum* kolonileri ve pozitif kontrol *Bacillus cereus* kolonileri

4.1.2. Deneysel Enfeksiyon Bulguları

10^3 ve 10^4 hücre/ml yoğunluklardaki *V. anguillarum* ile enfekte edilen levrek balıklarında 4 aylık deneme süresi boyunca ölüm gözlenmemiştir. 10^5 hücre/ml yoğunluğundaki *V. anguillarum* ile enfekte edilen levrek balıklarının 3 hafta sonunda %75' i, 10^6 hücre/ml yoğunluğunda enfekte edilenlerde ise 4 gün sonunda tüm balıklar ölmüştür. Bu sonuçlara göre enfeksiyonun takibi için sudaki en uygun bakteri yoğunluğunun 10^5 hücre/ml olduğuna karar verilmiş ve başlanan esas denemede bu yoğunluk kullanılmıştır.

4.2. KLİNİK BULGULAR

Enfeksiyon oluşturulan 30 g üstü ağırlıklı levrek balıkları 1 hafta boyunca her gün örneklenmiştir. Denemenin 7. gününde elektrik kesintisi nedeni ile balıklar oksijen yetersizliğine maruz kalmış ve 5 enfekte balık ile 38 kontrol balığı ölmüştür. Bu nedenle ölen balıklar çalışmaya dahil edilmemiştir.

2-phenoxyethanol ile bayıltılan balıkların dış ve iç bakılarında hastalık belirtileri gözlenmiştir. Enfekte balıklarda genel olarak dış bakıda; çene altı, ağız içi, yüzgeç dipleri, göz çevresi, operkulum, baş üzerinde ve solungaçlarda hemorajiler (Şekil 4.5), eksoftalmus, iç bakıda; karaciğer, dalak ve viseral organların yüzeyinde hemorajiler, bağırsakta sarı renkli sıvı toplanması ve beyaz mukoid madde varlığı (Şekil 4.6), dalakta büyüme saptanmıştır. Enfeksiyonun son günlerinde ise dalak ve böbrekte erime olduğu dikkati çekmiştir.



Şekil 4.5: Enfekte olmuş levreklerde görülen belirtiler; a) baş üzerinde ve yüzgeç diplerinde hemorajiler, b) gözde ve ağız çevresinde hemorajiler



Şekil 4.6: Enfekte olmuş levreklerde görülen belirtiler; a) karaciğerde peteşiyal hemoraji ve ekimozlar, b) bağırsakta sarı renkte sıvı toplanması ve beyaz mukoid madde birikimi

Enfekte balıklardan yeniden izole edilen bakterilerin biyokimyasal özellikleri, Seçici besiyeri TCBS' de sarı koloniler, VAM' da sarı koloniler ve etrafında hidroliz zonu oluşturması enfeksiyon etkeninin *V. anguillarum* olduğunu doğrulamıştır. Balıklardan tekrar izole edilen bakterinin, biyokimyasal özelliğinin enfeksiyon için suya inoküle edilen *V. anguillarum* ile aynı olduğu saptanmıştır.

4.3. HEMATOLOJİK BULGULAR

Pilot enfeksiyon denemesinde enfeksiyon oluşturulan 18-28 g ağırlıklı levrek balıklarından 3 hafta boyunca gün aşırı örnekler alınmış ama kan örneklerinin az miktarda olması nedeni ile serolojik deneylerin yapılabilmesi için esas enfeksiyon denemesinde balık ağırlıkları 30 g üstünde tutulmuştur.

Pilot enfeksiyon denemesinde hasta balıklarda hematokrit değerlerinin deney süresinin başında ve bitişinde kontrol balıklarında %34-28 olarak değişirken hasta balıklarda %24-18 olarak değiştiği bulunmuştur.

Asıl enfeksiyon denemesi sonuçları hergün örnekleri için ayrı ayrı değerlendirilmiş, günlük sonuçların ortalaması hesaplanarak tablo 4.3' te verilmiştir.

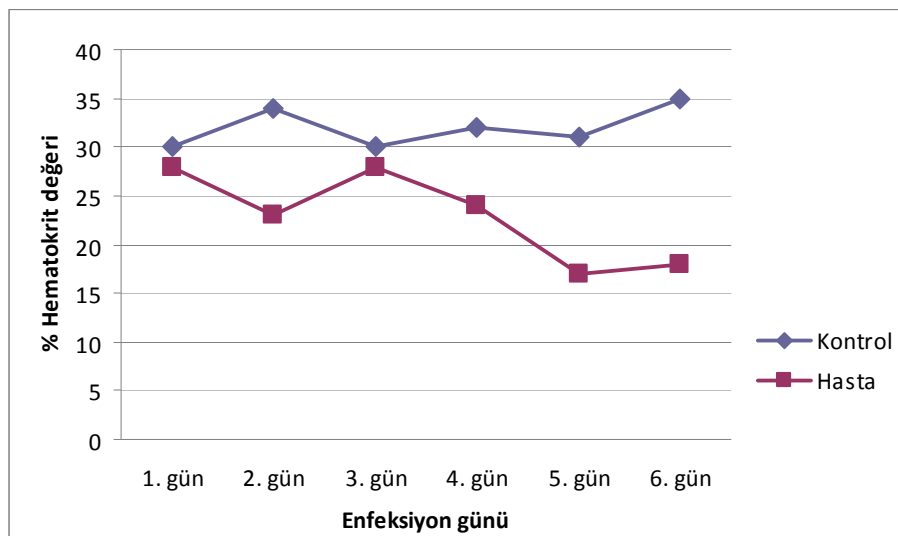
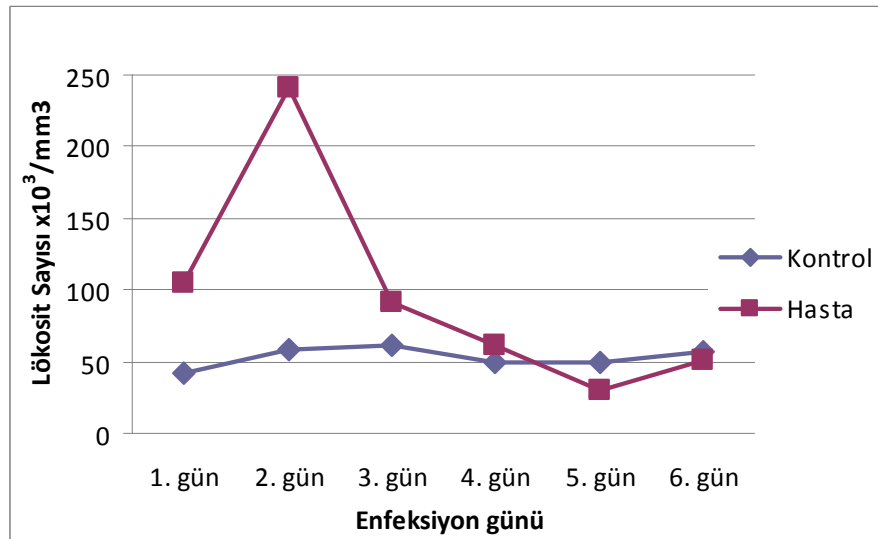
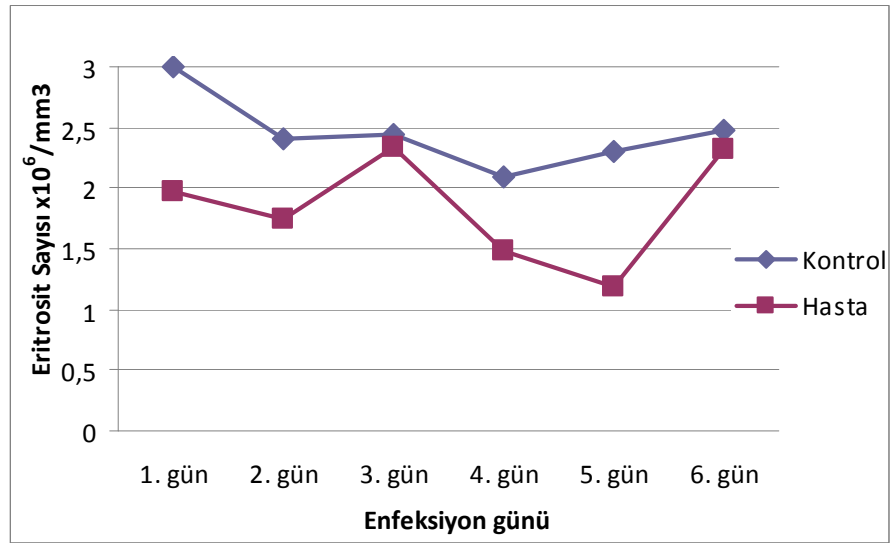
Tablo 4.3: Toplam Eritrosit, Toplam Lökosit Sayıları ve Hematokrit Değerleri

Eritrosit Sayısı ($\times 10^6/\text{mm}^3$)		
	Kontrol	Hasta
1. gün	3	1,975
2. gün	2,415	1,75
3. gün	2,45	2,335
4. gün	2,1	1,475
5. gün	2,3	1,19
6. gün	2,47	2,32

Lökosit Sayısı ($\times 10^3/\text{mm}^3$)		
	Kontrol	Hasta
1. gün	42	105
2. gün	59	240,67
3. gün	62	90,67
4. gün	49	61
5. gün	50	30
6. gün	57	50,4

Hematokrit Değeri (%)		
	Kontrol	Hasta
1. gün	30	28
2. gün	34	23
3. gün	30	28
4. gün	32	24
5. gün	31	17
6. gün	35	18

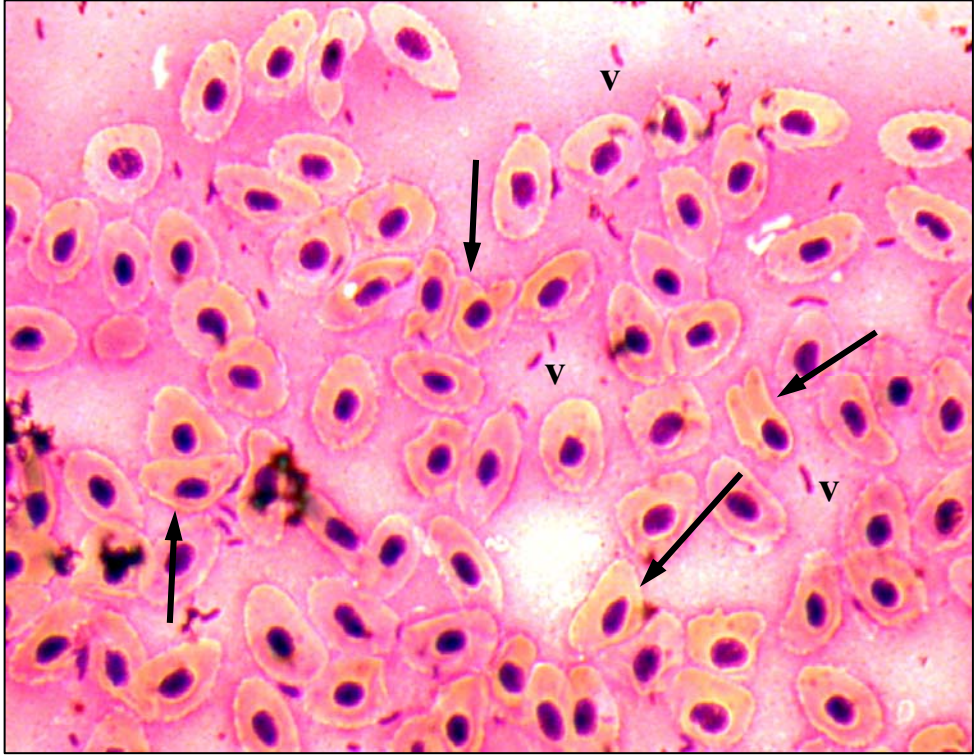
Eritrositlerin hasta balıklarda günden güne düştüğü, enfeksiyonun 3. ve 6. günlerinde sayısının azaldığı fakat olgunlaşmamış eritrosit sayısının arttığı saptanmıştır. Lökosit sayısında ise bir dalgalanma tespit edilmiştir. Enfeksiyonun ilk iki günü bağışıklık sisteminin tepki vermesi ile lökositlerin önemli bir artış gösterdiği fakat daha sonra bakterinin lökosit sayısında azalma meydana getirdiği saptanmıştır. Hematokrit değerleri de günden güne azalmış, balıklarda genel olarak bir anemi durumu ortaya çıkmıştır (Şekil 4.7).



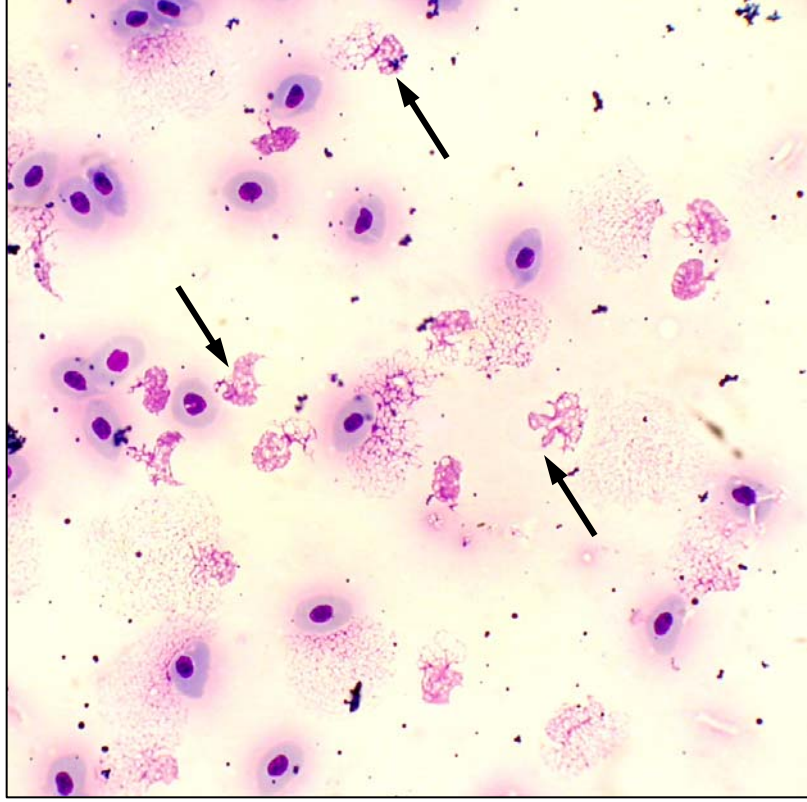
Şekil 4.7: Eritrosit, Lökosit Sayıları ve

Hematokrit Değerleri Değişim Grafikleri

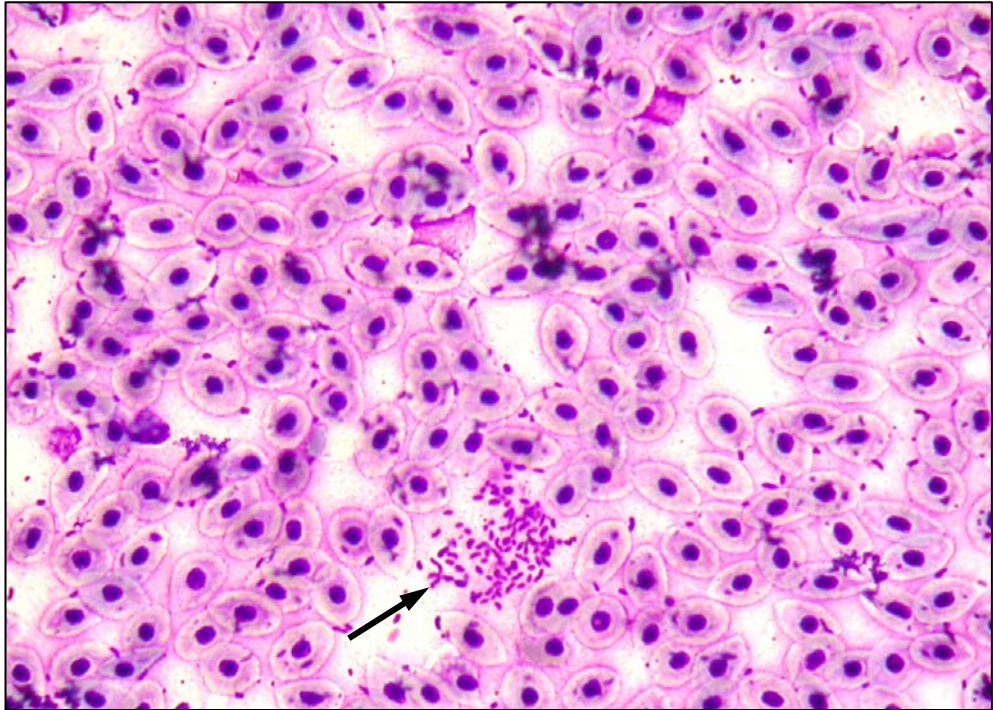
MayGrünwald-Giemsa ile boyanan kan preparatlarının incelenmesi sonucunda; enfekte balıklarda eritrositlerin enfeksiyonun 3. ve 6. günlerinde olgunlaşmamış eritrosit sayısının arttığı, enfeksiyonun 3. gününden sonra eritrositlerin hücre şekillerinin yuvarlaklaştığı yada poligonal şekil aldığı gözlenmiştir (Şekil 4.8). Enfeksiyonun 5. günü kan hücrelerinin eridiği gözlenmiştir (Şekil 4.9). Enfeksiyonun ilk gününden itibaren kanda *V. anguillarum* hücrelerine de rastlanmıştır (Şekil 4.10). Enfeksiyonun ilk 2 günü nötrofil ve monositlerin sayısının arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.11).



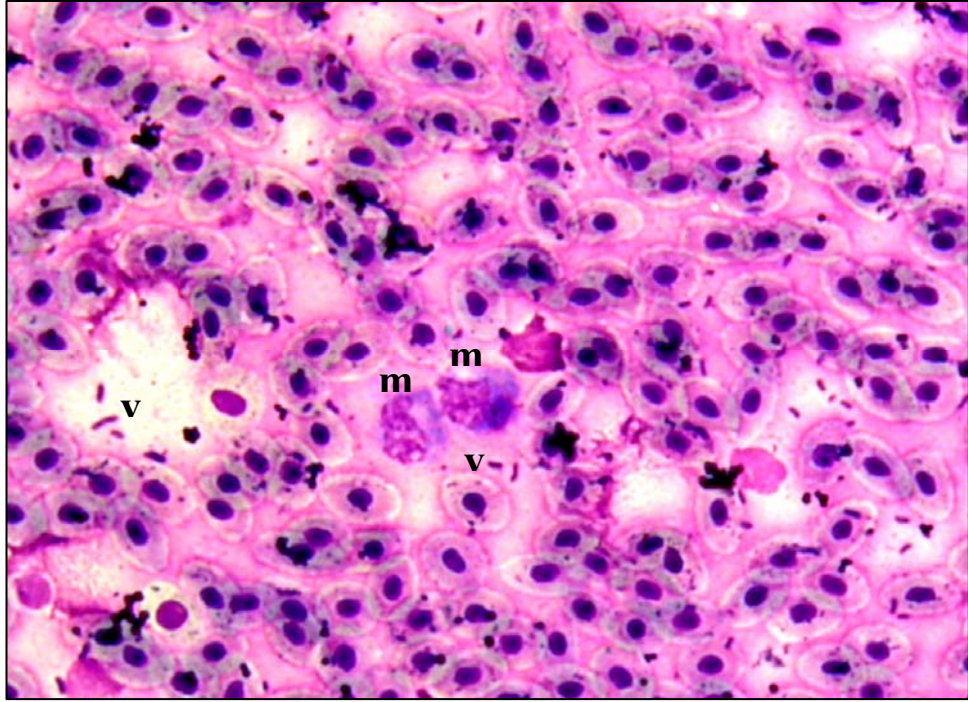
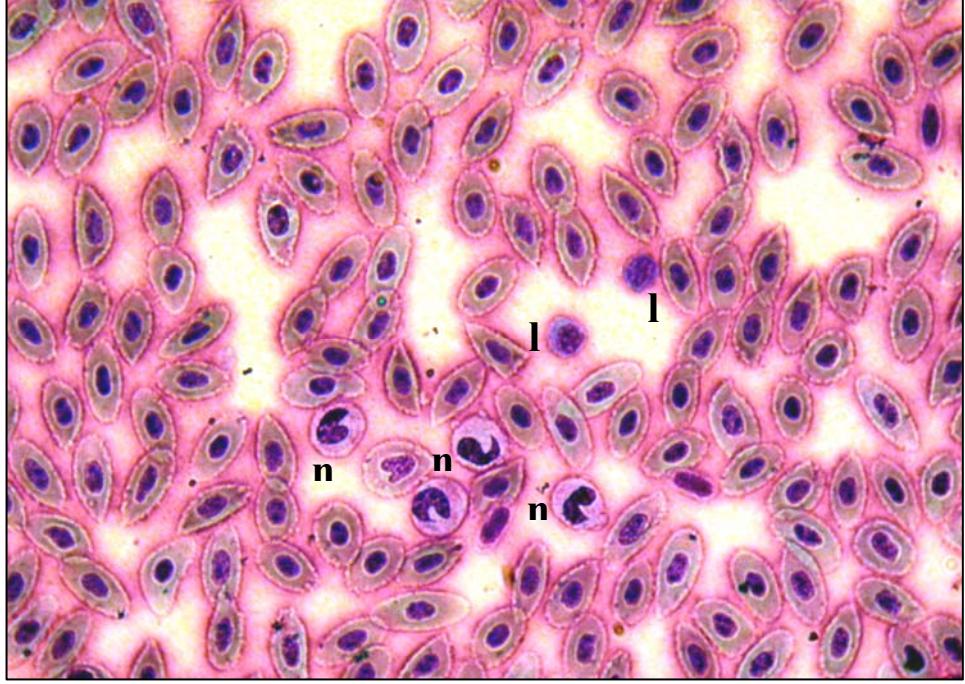
Şekil 4.8: Enfekte balık kan örneklerinde eritrositlerin poligonal şekil alması (okla gösterilmiştir), v: *V. anguillarum* hücreleri MayGrünwald-Giemsa x1000



Şekil 4.9: Enfekte balık kan örneklerinde kan hücrelerinin erimesi (okla gösterilmiştir), MayGrünwald-Giemsa x1000



Şekil 4.10: Enfeksiyonun 2. günü kan örneklerinde *V. anguillarum* hücreleri (okla gösterilmiştir), MayGrünwald-Giemsa x1000



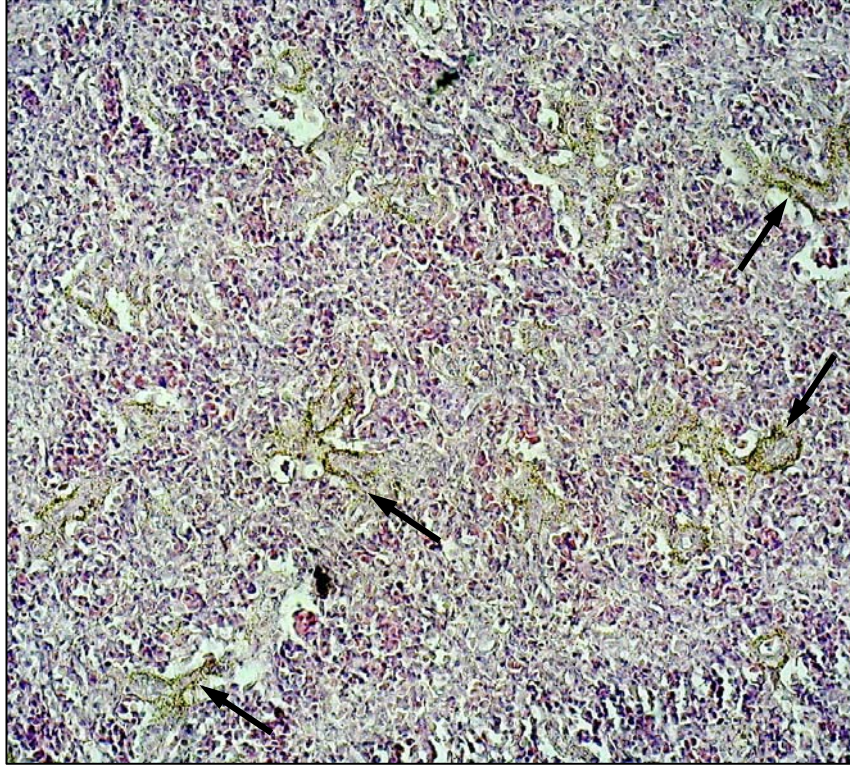
Şekil 4.11: Enfekte balık kan örnekleri, l: lenfosit, m: monosit, n: nötrofil, v: *Vibrio anguillarum* hücreleri, MayGrünwald-Giemsa x1000

4.4. HİSTOLOJİK BULGULAR

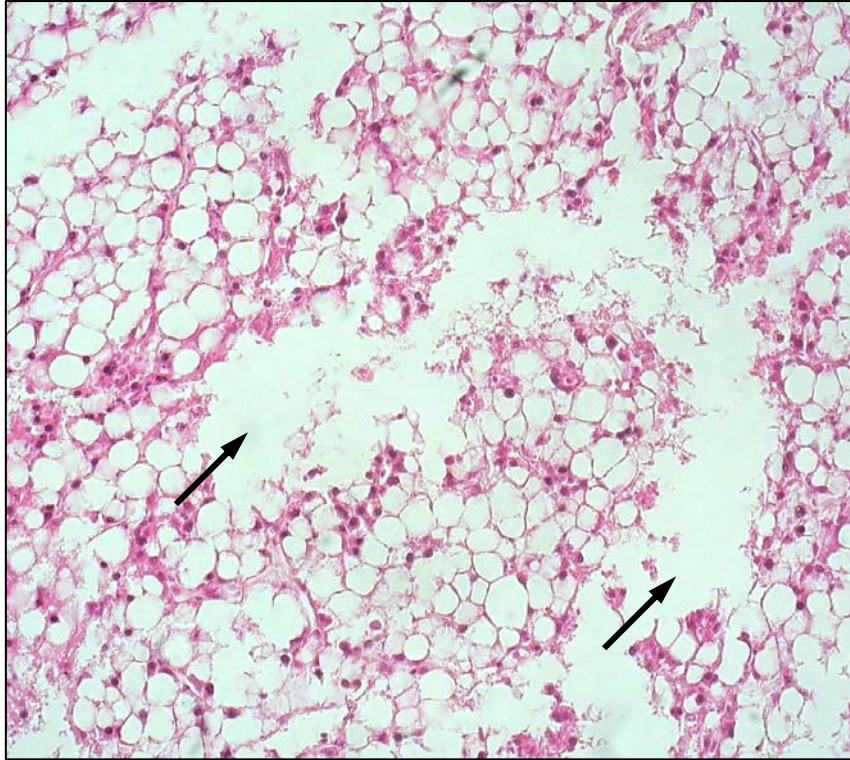
Yapılan histolojik örnekleme sonucunda enfeksiyon ilerledikçe meydana gelen histopatolojik değişikliklerin arttığı gözlenmiştir. İlk gün; dalak dokusu örneklerinde hemosiderin birikmesi (Şekil 4.12), yer yer liquefactive nekroz ve hemoraji odakları saptanmıştır. Ayrıca yer yer hemapoyetik hücrelerin boşaldığı ve retiküler bağ dokunun görülebildiği tespit edilmiştir.

İkinci gün; dalak dokusunda beyaz ve kırmızı pulparların boşaldığı tespit edilmiştir. Karaciğerde hiperemi, parankim hücrelerinde vakuoler dejenerasyon ve multifokal nekrotik erime odakları gözlenirken (Şekil 4.13), pankreasta hiperemi (Şekil 4.14) ve acinar hücrelerde nekroz saptanmıştır. Solungaç filamentlerinin nekrotik olduğu, epitel hücrelerinin döküldüğü saptanmıştır (Şekil 4.15). Kalp dokusunda ventrikülde miyopati tespit edilmiştir (Şekil 4.16, 4.17). Ön böbrekte liquefactive nekroz tespit edilmiş, üretimi yapılan eritrositlerin piknotik olduğu gözlenmiştir.

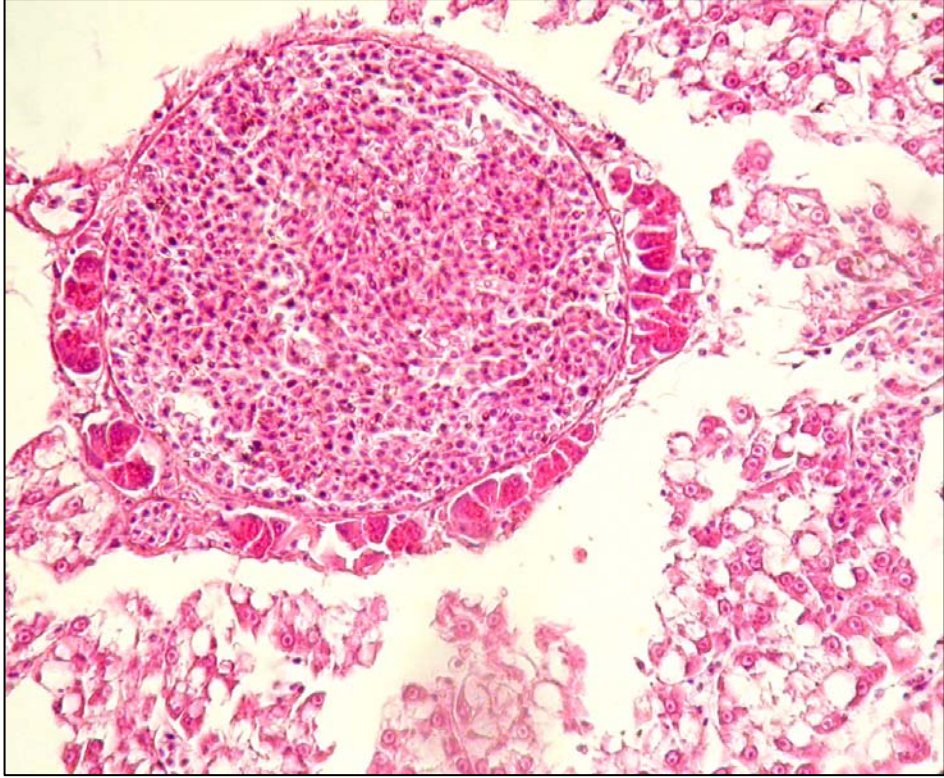
Üçüncü gün; dalak dokusunda liquefactive nekroz, böbrek tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon, nekroz, peritübüler ödem ve hemoraji odakları ile böbrek tübüllerinde ve interrenal haemopoyetik dokuda liquefactive nekroz gözlenmiştir (Şekil 4.18). Karaciğer parankim hücrelerinde ilerlemiş vakuoler dejenerasyon, ince bağırsaklarda ise mukoza epitelinde nekroz ve lümen dökülme saptanmıştır (Şekil 4.19).



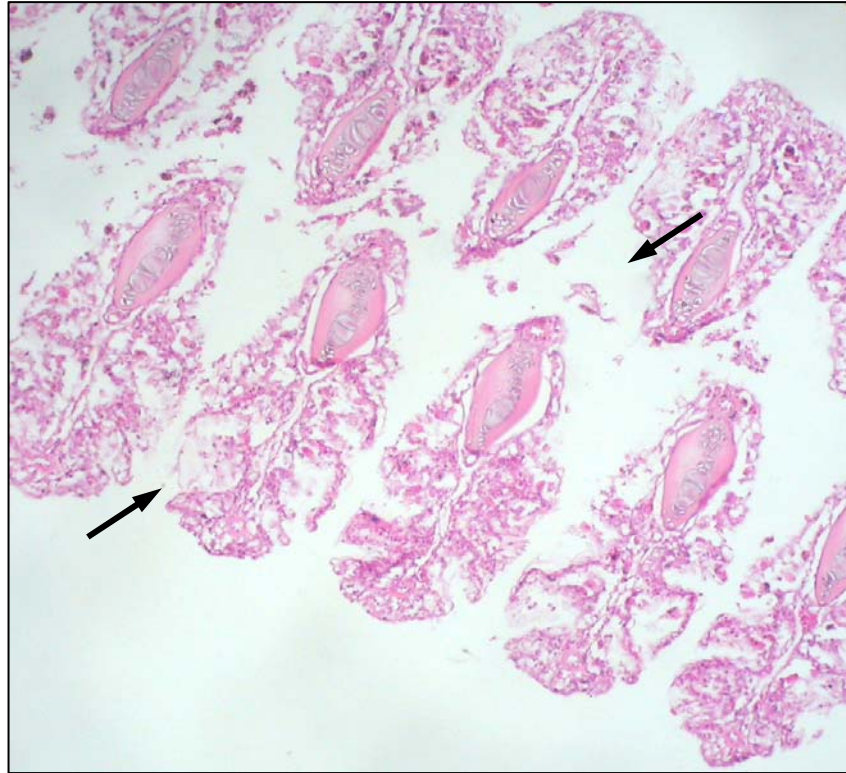
Şekil 4.12: Enfeksiyonun 1. günü örnekleri dalak dokusunda hemosiderin birikimi (okla gösterilmiştir), H+E x400



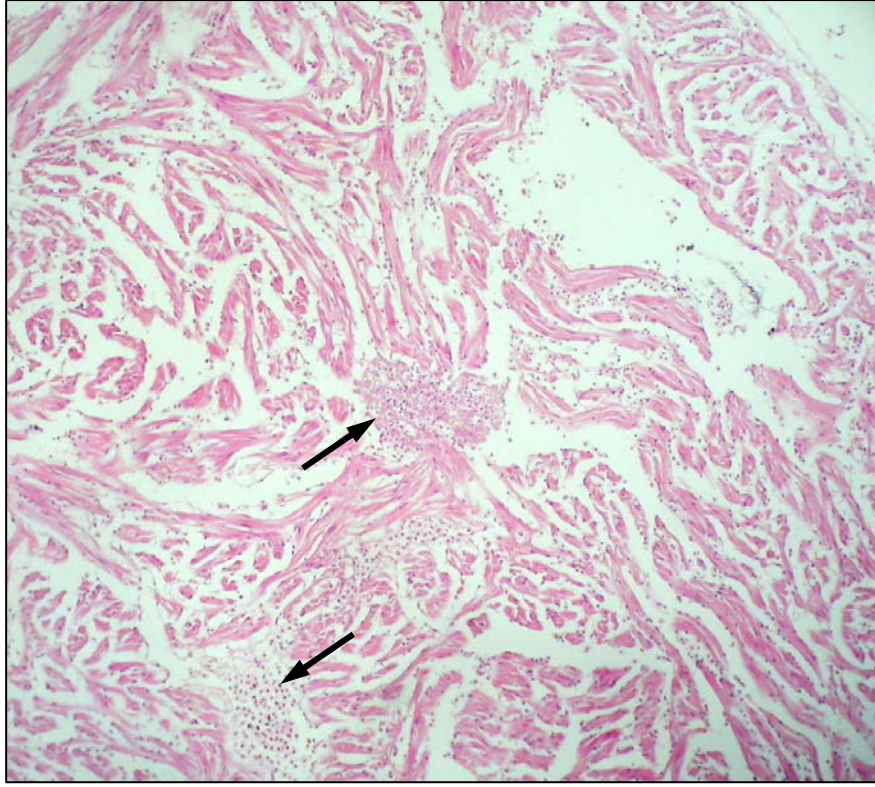
Şekil 4.13: Enfeksiyonun 2. günü örnekleri karaciğer dokusunda nekrotik odaklar (okla gösterilmiştir), H+E x400



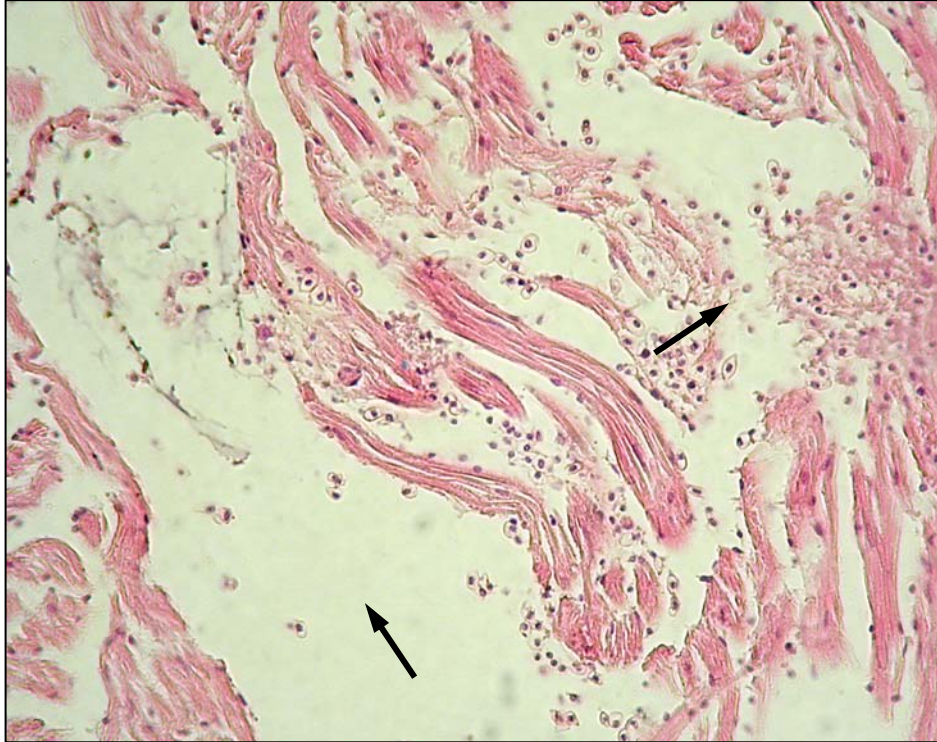
Şekil 4.14: Enfeksiyonun 2. günü örnekleri pankreas dokusunda hiperemi, H+E x400



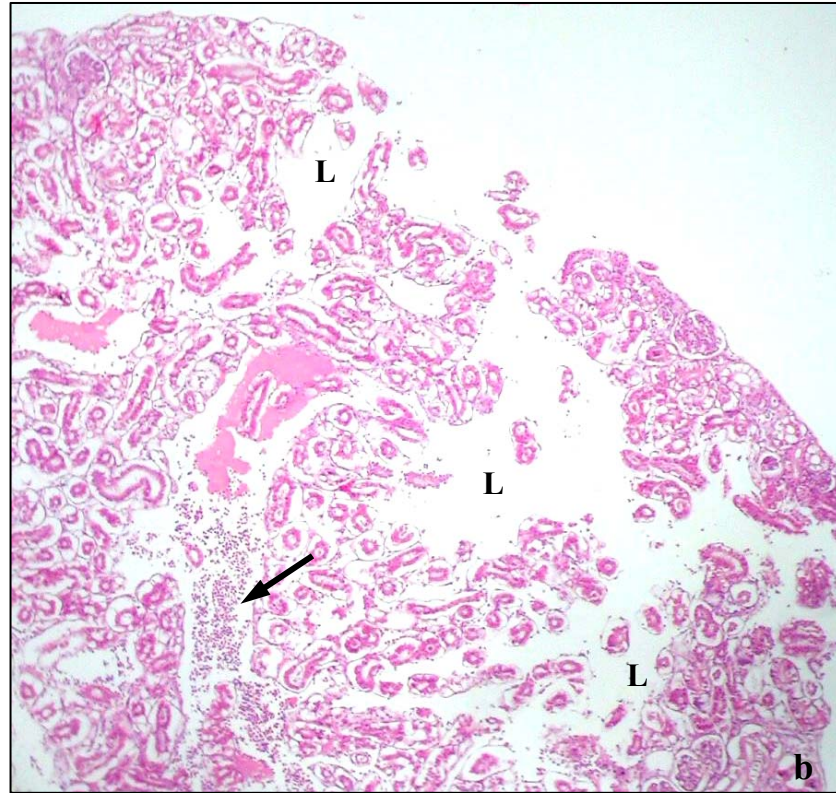
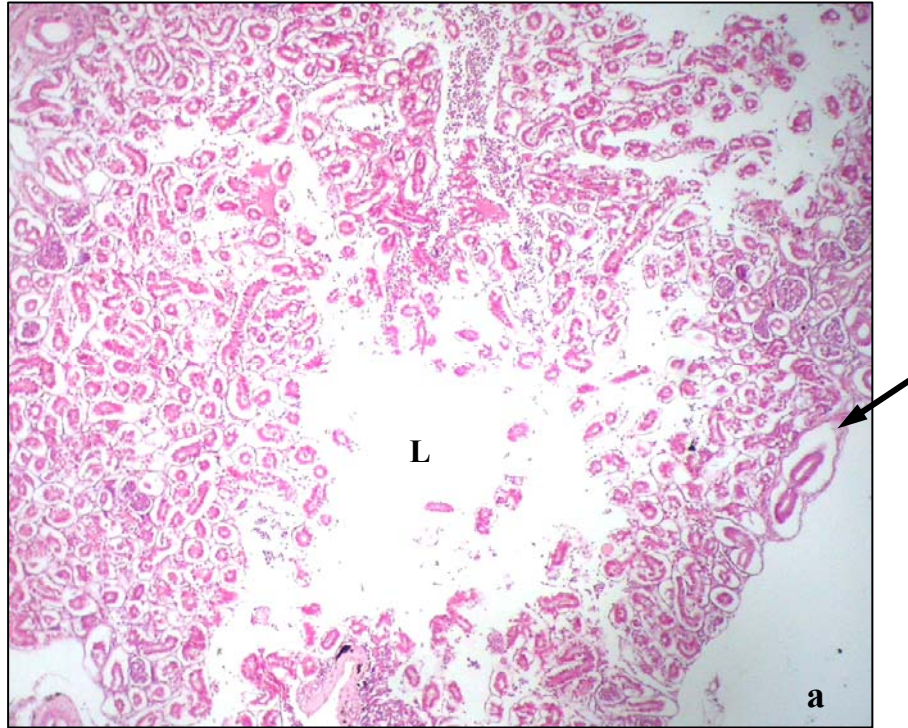
Şekil 4.15: Enfeksiyonun 2. gününde solungaçta hemoraji, filament epitel hücrelerinde nekroz ve dökülme (okla gösterilmiştir) H+E x200



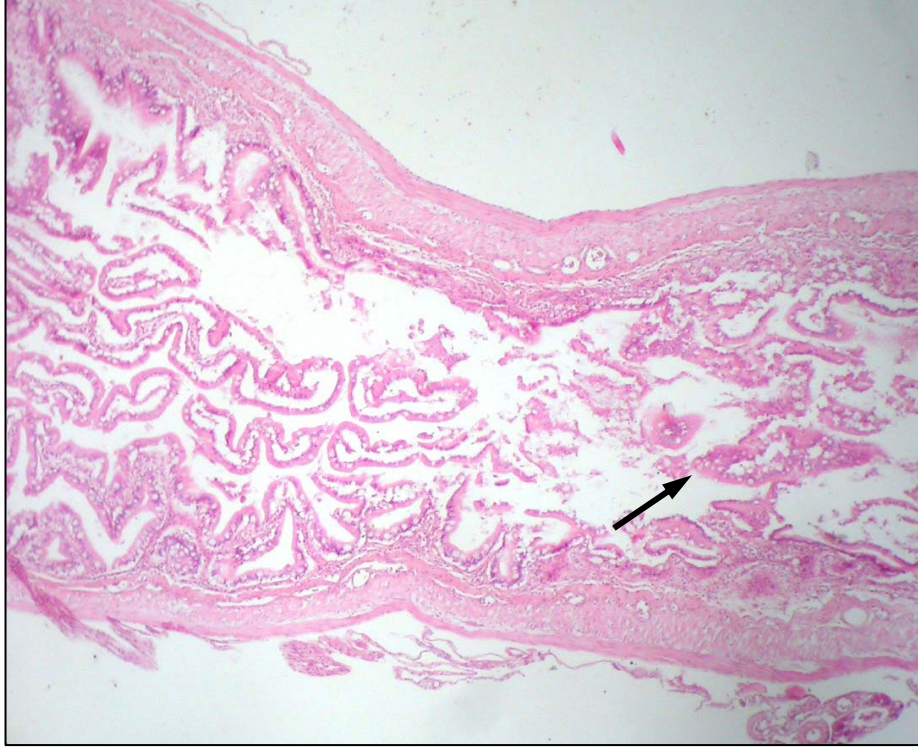
Şekil 4.16: Enfeksiyonun 2. gününde kalbin ventrikülündeki kaslarda hemorajik odaklar (okla gösterilmiştir) H+E x200



Şekil 4.17: Enfeksiyonun 2. gününde kalp kas hücrelerinde nekroz sonucu miyopati (okla gösterilmiştir), H+E x400



Şekil 4.18: Enfeksiyonun 3. gününde böbrek dokusunda tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon ve liquefactive nekroz odakları (L), a) peritübüler ödem (okla gösterilmiştir), H+E x100, b) nekrotik intertübüler dokuda yaygın hemoraji odakları (okla gösterilmiştir) H+E x100

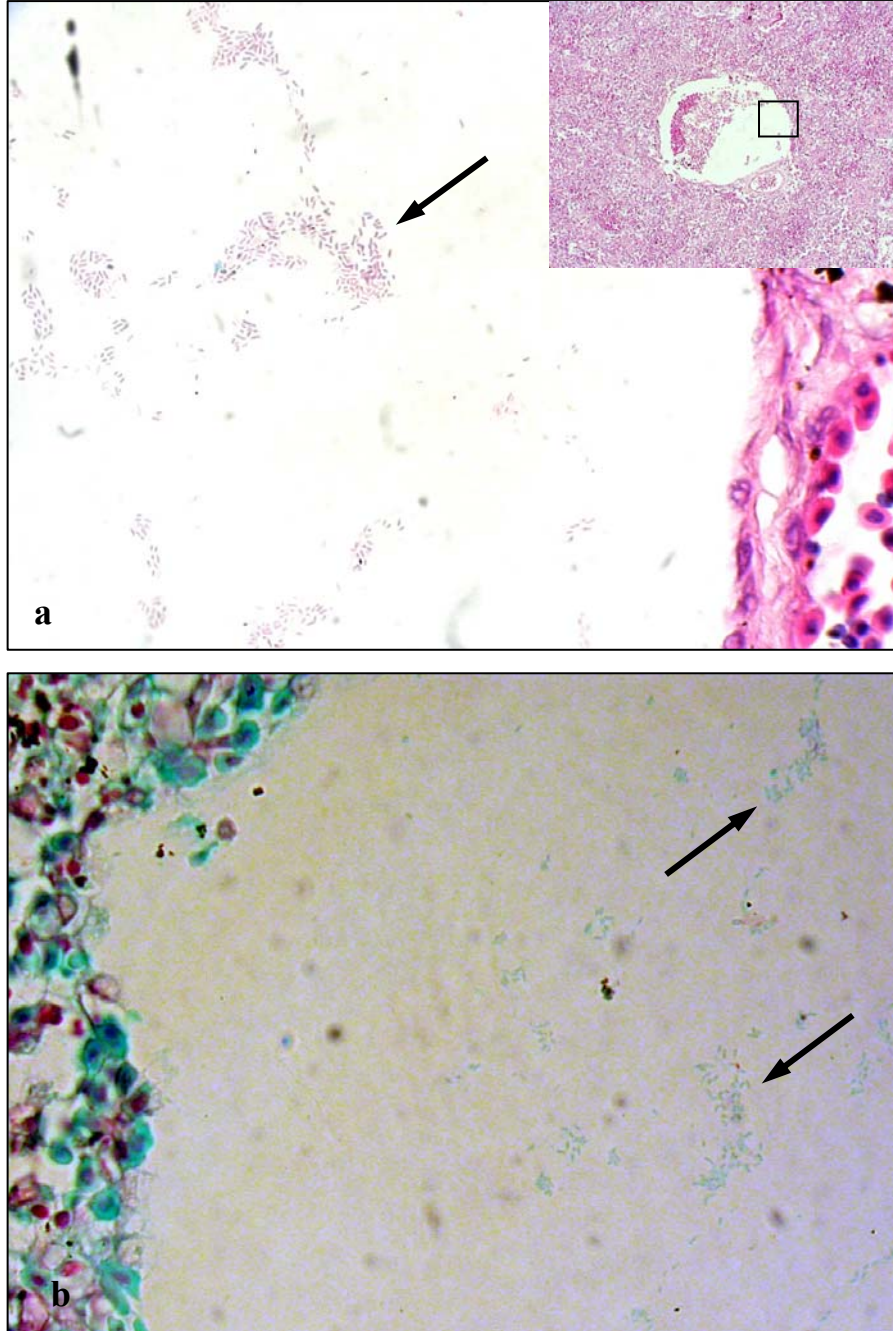


Şekil 4.19: Enfeksiyonun 3. gününde bağırsak mukoza epitel hücrelerinde nekroz ve lümeneye dökülme (okla gösterilmiştir), H+E x100

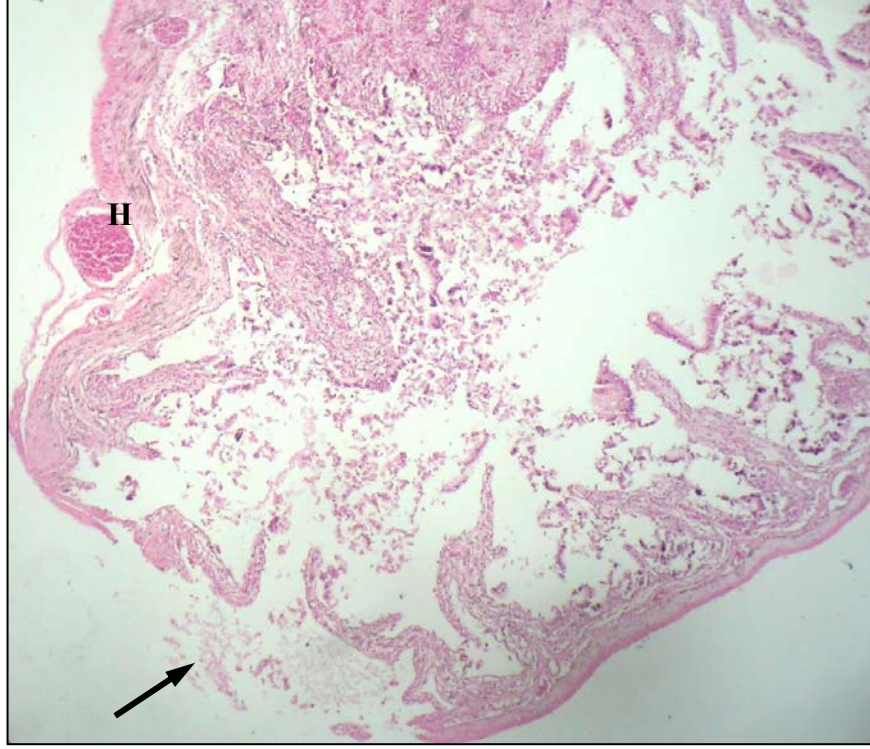
Dördüncü gün; dalak kesitlerinde liquefactive nekroz ve nekrotik boşluklarda bakteri hücreleri gözlenmiştir (Şekil 4.20). Karaciğer parankim hücrelerinde vakuoler dejenerasyon ve nekroz tespit edilmiştir. Böbrek tübül epitelinde dejenerasyon, hematopoietik dokuda liquefactive nekroz gözlenmiştir. Bağırsak duvarında ve kaslarda hiperemi gözlenmiş ve mukozada nekroz sonucu bağırsak duvarında delinme tespit edilmiştir (Şekil 4.21).

Beşinci gün; boşalmış dalakta multifokal liquefactive nekrotik odaklar dikkati çekmiştir (Şekil 4.22). Böbrekte liquefactive nekroz, peritübüler ödem oluşumu, melanonakrofaj merkezleri, multifokal hemorajik odaklar (Şekil 4.23, 4.24) ve nekrotik boşluklarda bakteri hücreleri (Şekil 4.25) gözlenmiştir. Karaciğer parankim hücrelerinde vakuoler yağ dejenerasyonu ile birlikte multifokal hemorajik odakların arttığı (Şekil 4.26), pankreasta hiperemi saptanmıştır. Deride gözlenen lezyonlu bölgeden hazırlanan kesitlerde örneğinde ise pulların dökülmüş olduğu, epidermin dejenerasyona uğradığı tespit edilmiştir (Şekil 4.27).

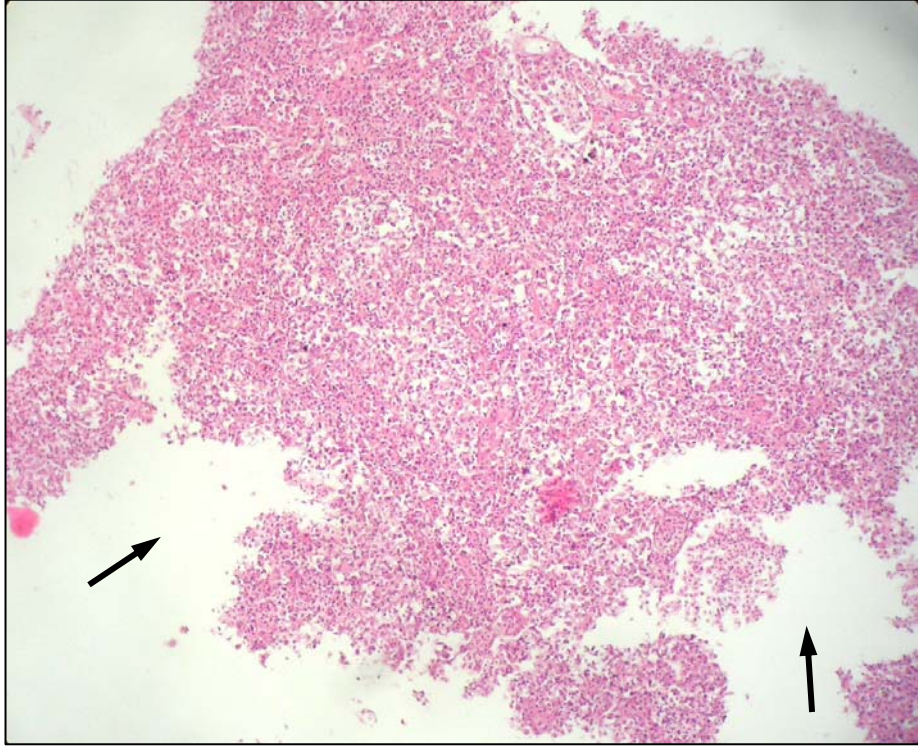
Altıncı gün; dalak hücrelerinde liquefactive nekroz (Şekil 4.28), karaciğerde liquefactive nekroz odakları, multipeteşiyal hemoraji, vakuoler yağ dejenerasyonu gözlenmiştir (Şekil 4.29). Böbreklerde hemoraji ile birlikte yaygın liquefactive nekroz odakları, peritübüler ödem oluşumu ve intertübüler hematopoyetik dokuda boşalma saptanmıştır (Şekil 4.30). Bağırsak duvarında, mukoza epitelinde ve kaslarda nekroz ile lümeneye dökülme gözlenmiştir (Şekil 4.31).



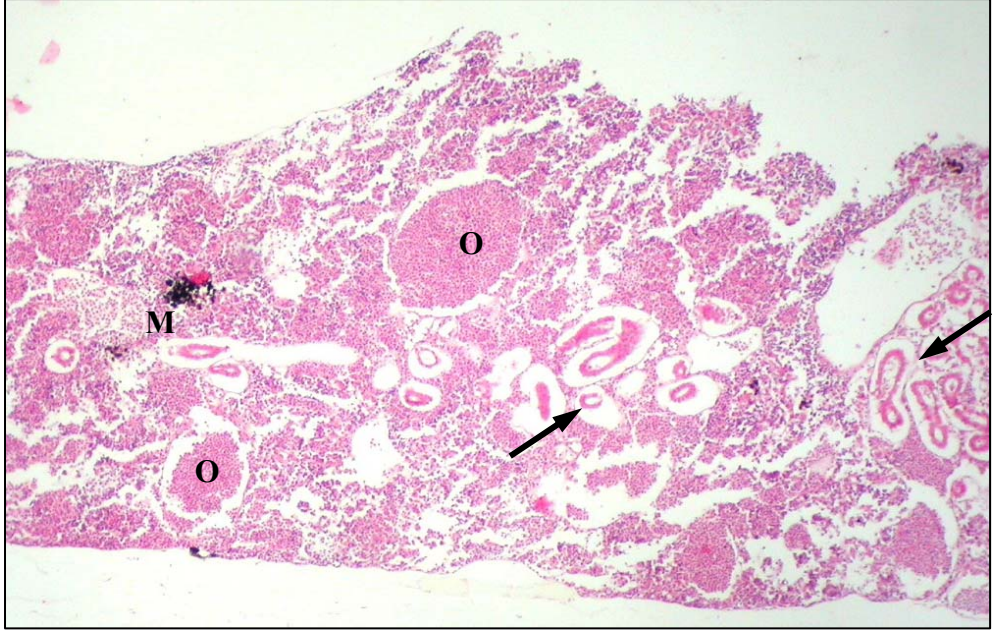
Şekil 4.20: Enfeksiyonun 4. gününde dalak dokusunda bakteri hücreleri tespiti, a) H+E x1000, b) Twort' un gram boyası x1000



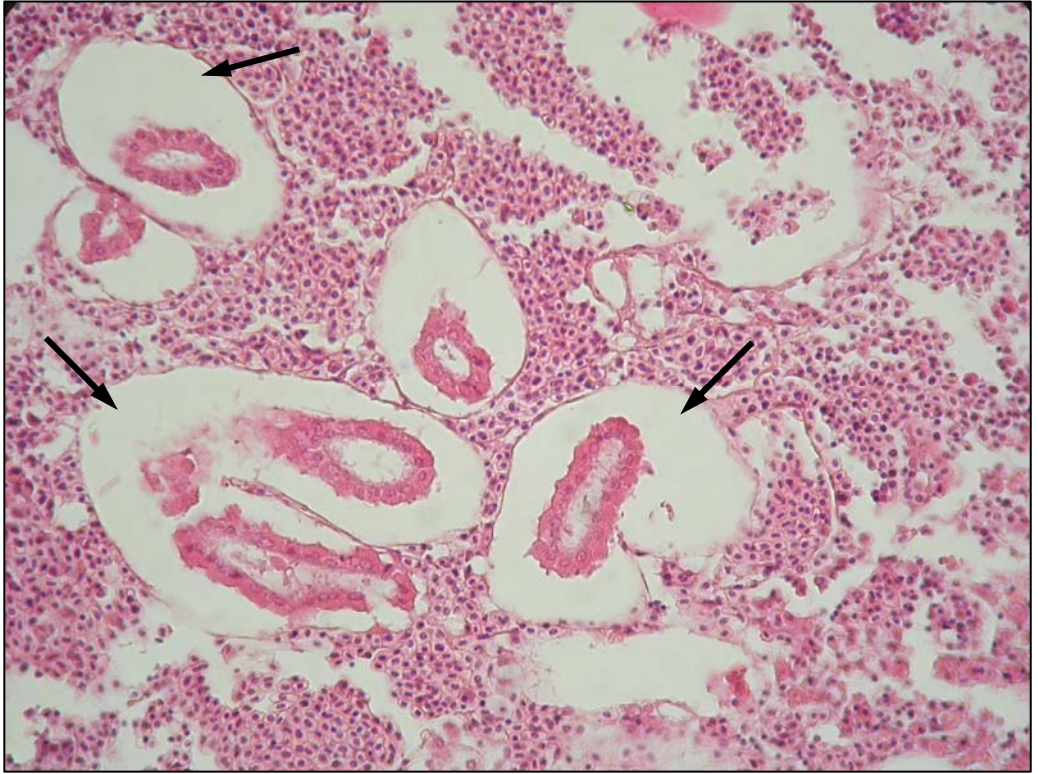
Şekil 4.21: Enfeksiyonun 4. gününde bağırsak duvarı ve kasta delinme (okla gösterilmiştir), H: hiperemi, H+E x200



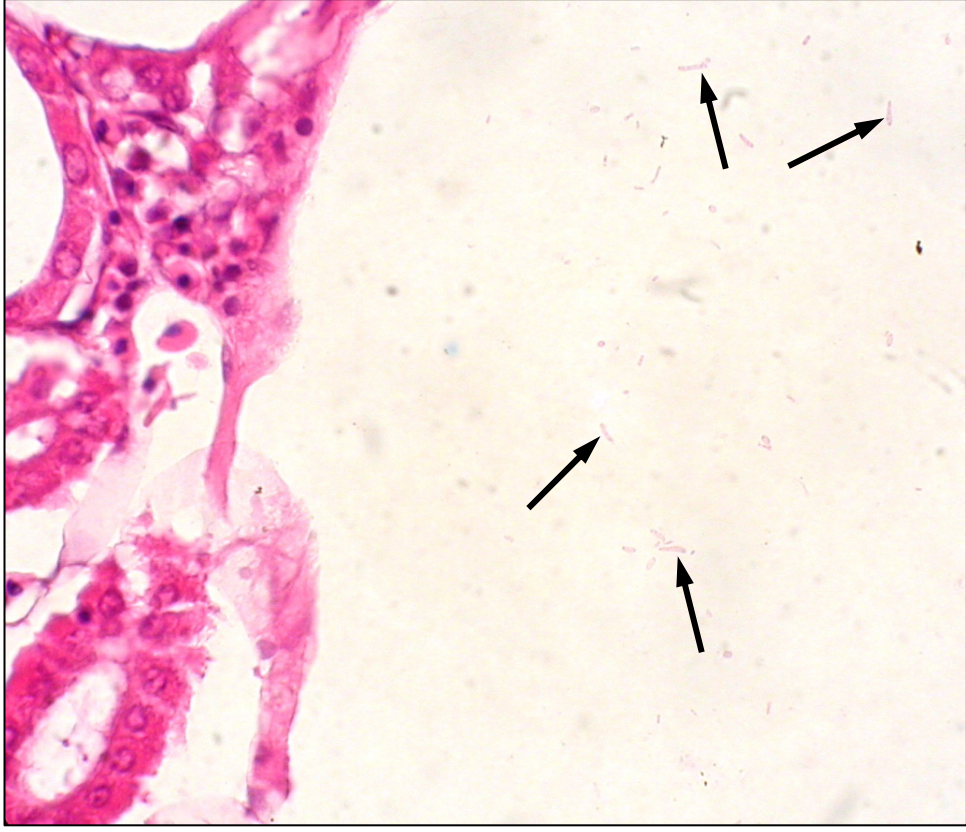
Şekil 4.22: Enfeksiyonun 5. gününde boşalmış dalakta multifokal liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiştir), H+E x200



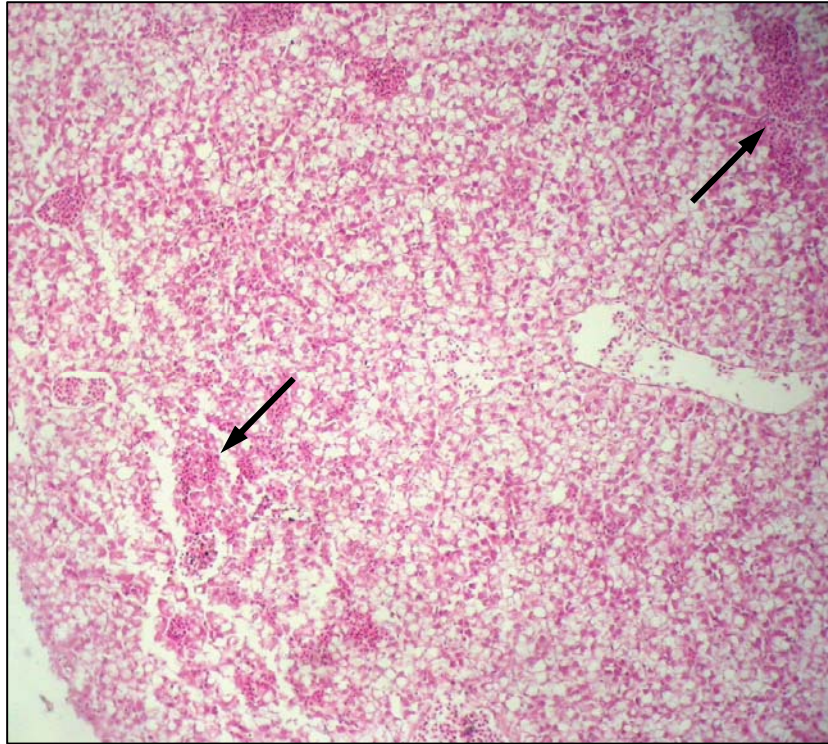
Şekil 4.23: Enfeksiyonun 5. gününde böbrek dokusunda peritübüler ödem (okla gösterilmiştir), O: multifokal hemorajik odaklar, M: melanonakrofaj merkezleri , H+E x100



Şekil 4.24: Enfeksiyonun 5. gününde böbrek dokusunda peritübüler ödem (okla gösterilmiştir) ve interrenal dokuda yaygın hemoraji, H+E x400



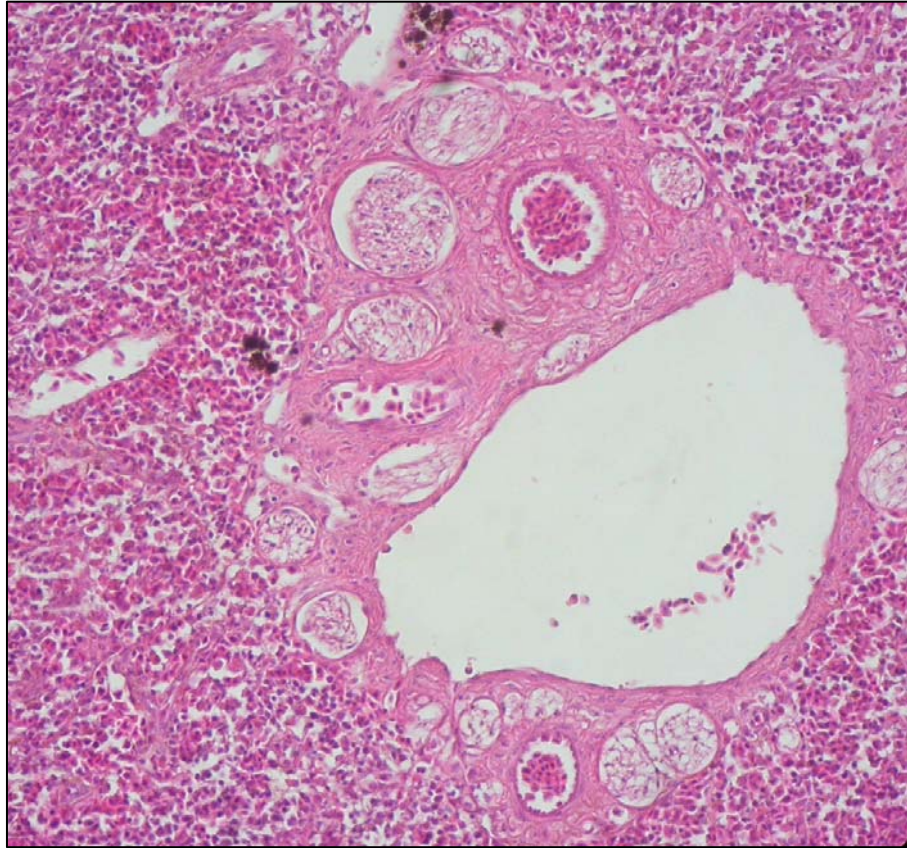
Şekil 4.25: Enfeksiyonun 5. gününde böbrek dokusunda nekrotik odalarda bakteri hücreleri tespiti (okla gösterilmiştir), H+E x1000



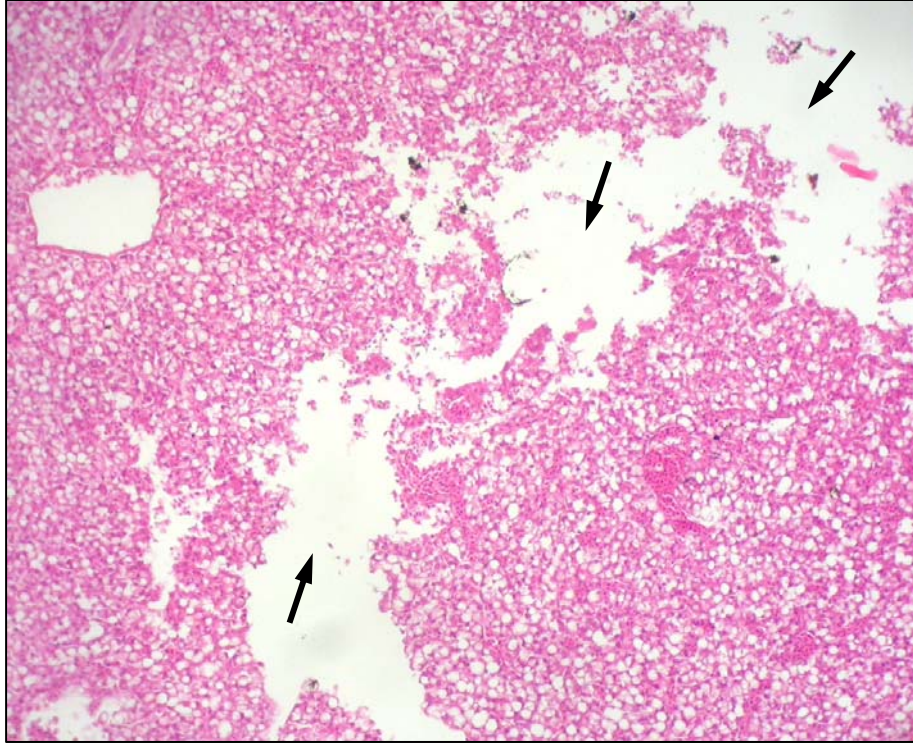
Şekil 4.26: Enfeksiyonun 5. gününde karaciğer dokusunda multifokal hemorajik odaklar (okla gösterilmiştir), H+E x200



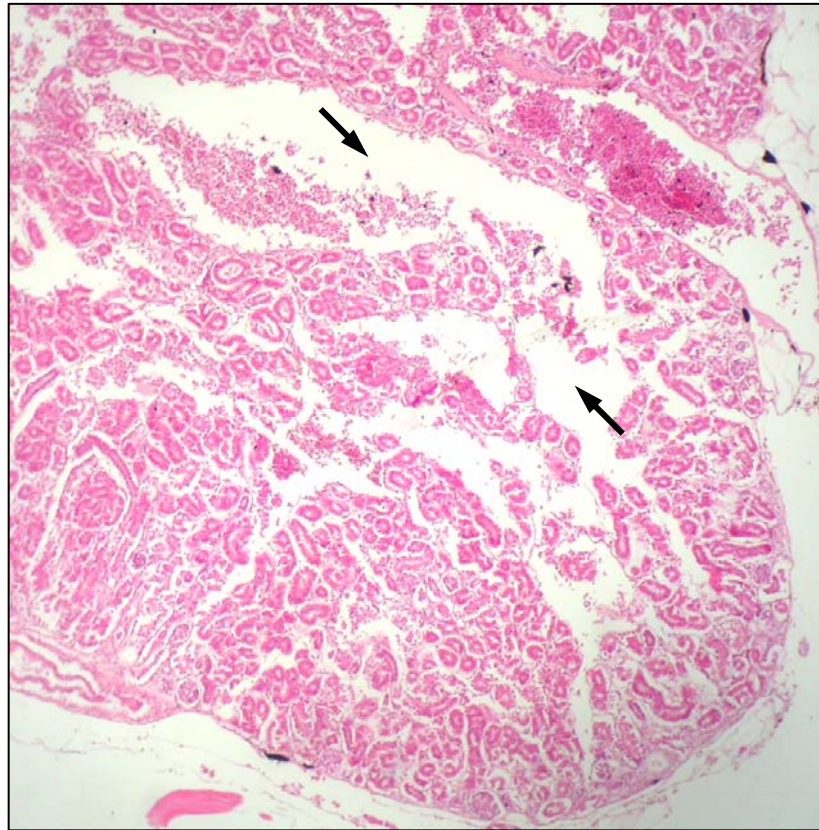
Şekil 4.27: Enfeksiyonun 5. gününde hasta levrek balığında dermise kadar inen deri lezyonu; erimiş epidermis (E) ve altında kalan pullar (P), H+E x100



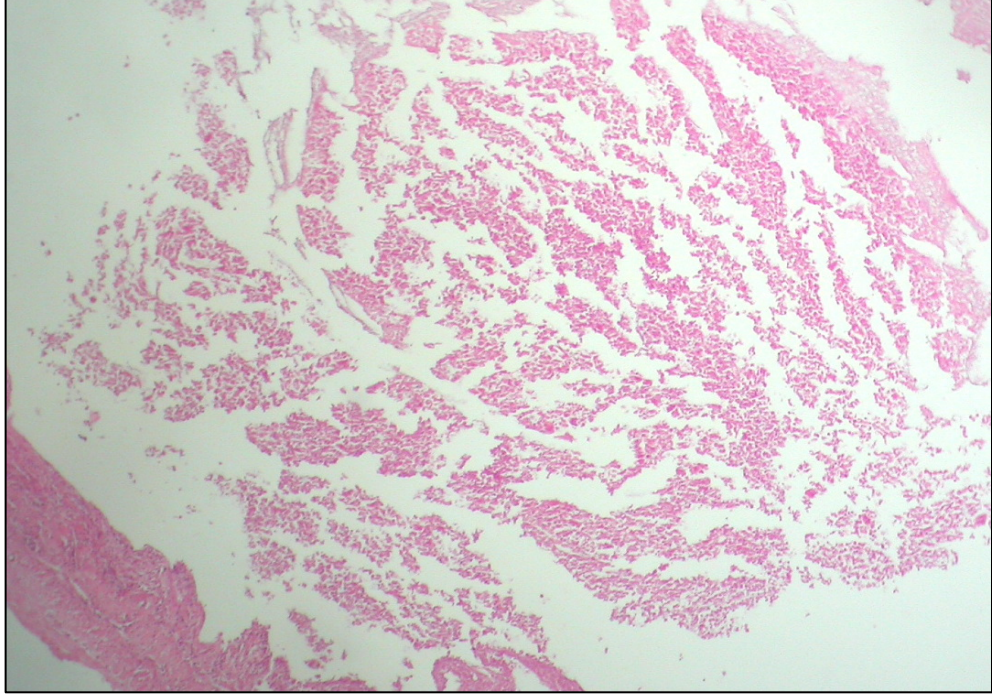
Şekil 4.28: Enfeksiyonun 6. gün dalak örneklerinde gözlenen nekroz sonucu dokuda boşalmalar, H+E x400



Şekil 4.29: Enfeksiyonun 6. gününde karaciğerde liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiştir), H+E x200



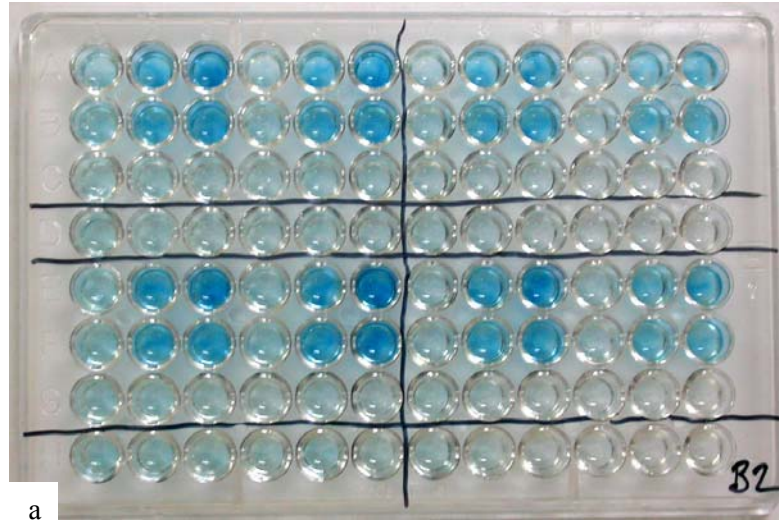
Şekil 4.30: Enfeksiyonun 6. gününde böbreklerde yaygın liquefactive nekroz odakları (okla gösterilmiştir), peritübüler ödem oluşumu ve intertübüler hemapoietik dokuda boşalma, H+E x200



Şekil 4.31: Enfeksiyonun 6. gününde bağırsak duvarı kasları ve mukoza epitelinde nekroz ile lümeneye dökülme, H+E x200

4.5. SEROLOJİK BULGULAR

Kan örneklerinden ayrılan ve -20°C 'de saklanan serum örneklerinden ELISA yöntemi ile transferrin miktarının enfeksiyon sırasında ve normalde kandaki değişimine bakılmıştır. Ancak bu yöntemde kullanılan anti-sazan transferrin antikoru negatif örneklere yanlış pozitif reaksiyon (Şekil 4.32) verdiği için sonuçlar değerlendirilmemiş ve bu yöntemin kullanımından vazgeçilmiştir.



a

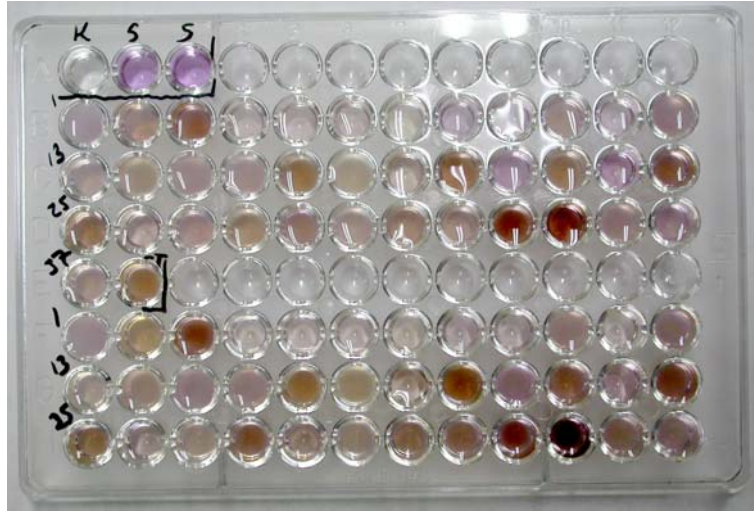


b

	%0,5 BSA						%1 BSA							
	0,1µg/ml K	1µg/ml K	10µg/ml K	0,1µg/ml K	1µg/ml K	10µg/ml K	0,1µg/ml K	1µg/ml K	10µg/ml K	0,1µg/ml K	1µg/ml K	10µg/ml K		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	10 ⁻³ LS	10 ⁻³ LS	10 ⁻³ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻³ LS	10 ⁻³ LS	10 ⁻³ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻³ P	0,1 µg/ml anti-carp Ig
B	10 ⁻⁴ LS	10 ⁻⁴ LS	10 ⁻⁴ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻⁴ LS	10 ⁻⁴ LS	10 ⁻⁴ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻⁴ P	
C	10 ⁻⁵ LS	10 ⁻⁵ LS	10 ⁻⁵ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻⁵ LS	10 ⁻⁵ LS	10 ⁻⁵ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻⁵ P	
D														Boş
E	10 ⁻³ LS	10 ⁻³ LS	10 ⁻³ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻³ LS	10 ⁻³ LS	10 ⁻³ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻³ P	1 µg/ml anti-carp Ig
F	10 ⁻⁴ LS	10 ⁻⁴ LS	10 ⁻⁴ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻⁴ LS	10 ⁻⁴ LS	10 ⁻⁴ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻⁴ P	
G	10 ⁻⁵ LS	10 ⁻⁵ LS	10 ⁻⁵ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻⁵ LS	10 ⁻⁵ LS	10 ⁻⁵ LS	Negatif	Negatif	Negatif	10 ⁻⁵ P	
H														Boş

Şekil 4.32: ELISA deneme sonuçları; a) TMB eklendikten sonraki görüntü ,b) 1M HCl eklenip reaksiyon durduktan sonraki görüntü, c) Kuyuların örnek isimleri; K: anti-carp Ig ile kaplama, LS: Levrek serumu, P: peroksidaz işaretili anti-rabbit IgG

Dolaylı olarak kandaki transferrin miktarını belirleyebilmek için kandaki doymamış demir bağlama kapasitesi (UIBC) ölçülmüştür. Bu kit ile yapılan deneyin sonuçları Şekil 4.33' te verilmiştir.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	B	S	S										Serum
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
C	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
D	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
E	37	37											Serum (tekrar)
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
G	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
H	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	

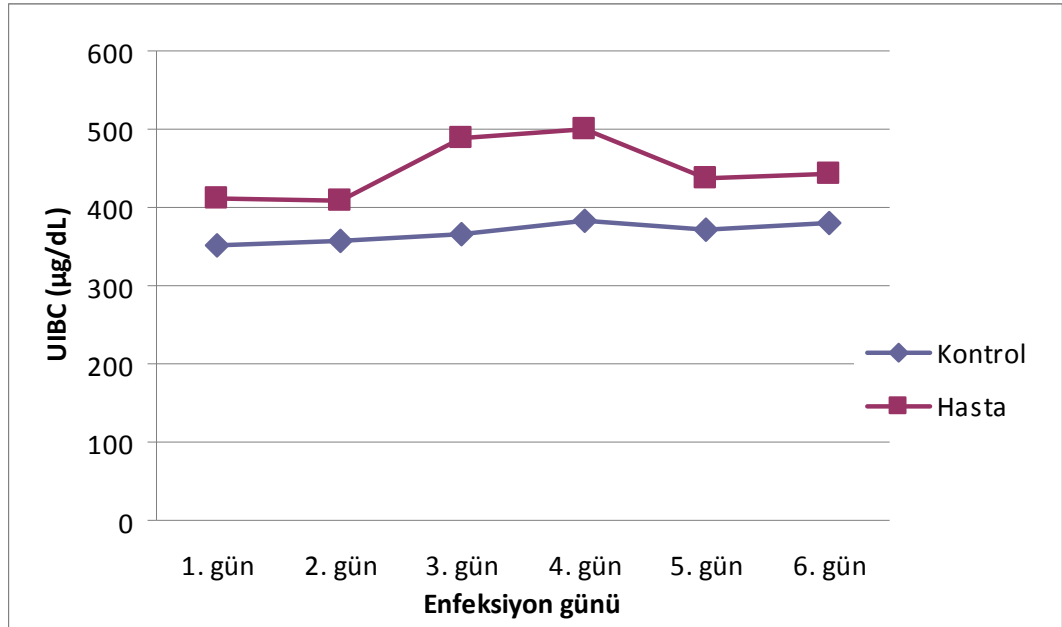
Şekil 4.33: Örneklerin demir bağlama kapasitesine göre renk değişimi, B: kör, S: Kit demir standartı, 1-37: Örnek numaraları

Hemolize uğrayan kan örneklerinin serumları güvenilir sonuç vermediğinden bulgulara eklenmemiştir. Her gün serumlarının ayrı ayrı ortalaması alınmış ve sonuçlar Tablo 4.4. ve Şekil 4.34' de grafik ile verilmiştir. Ayrıca İ.Ü. Mediko Sosyal Biriminde otoanalizör kullanılarak 3. ve 6. gün serum örneklerinin demir miktarları da ölçülmüştür. Otoanalizör için 1 ml serum örneği gerektiğinden her gün örnekleri için ayrı ayrı demir miktarı ölçümü yapılamamıştır

Tablo 4.4: Günlük doymamış demir bağlama kapasitesi (UIBC) ve demir değerleri

UIBC (µg/dl)		
	Kontrol	Hasta
1. gün	351,3	410,94
2. gün	357,84	408,91
3. gün	365,2	487,99
4. gün	383,88	499,64
5. gün	371	437,09
6. gün	380	444,04

Demir miktarı (µg/dl)	
0. gün	141
3. gün	76
6. gün	9



Şekil 4.34: Günlük doymamış demir bağlama kapasitesi (UIBC) değerleri grafiği

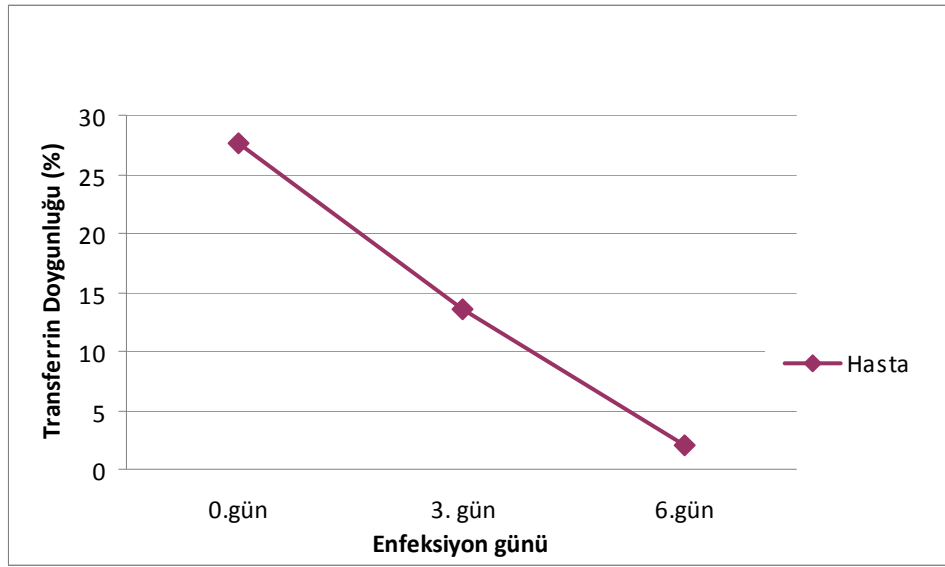
Transferrin doygunluğu aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır;

$$\% TD = \left[\frac{\text{serum demir miktarı}}{\text{serum demir miktarı} + \text{UIBC}} \right] \times 100.$$

Kontrol, 3. ve 6. gün örneklerinin transferrin doygunlukları hesaplanmış ve kandaki demir miktarının azalması ile transferrin doygunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5. ve Şekil 4.35' te grafik ile gösterilmiştir.

Tablo 4.5: Enfekte balık transferrin doygunluk değişimi

% Transferrin doygunluğu	
Kontrol	27,7
3. gn	13,5
6.gn	2



şekil 4.35: Enfekte balık transferrin doygunluk değişim grafiği

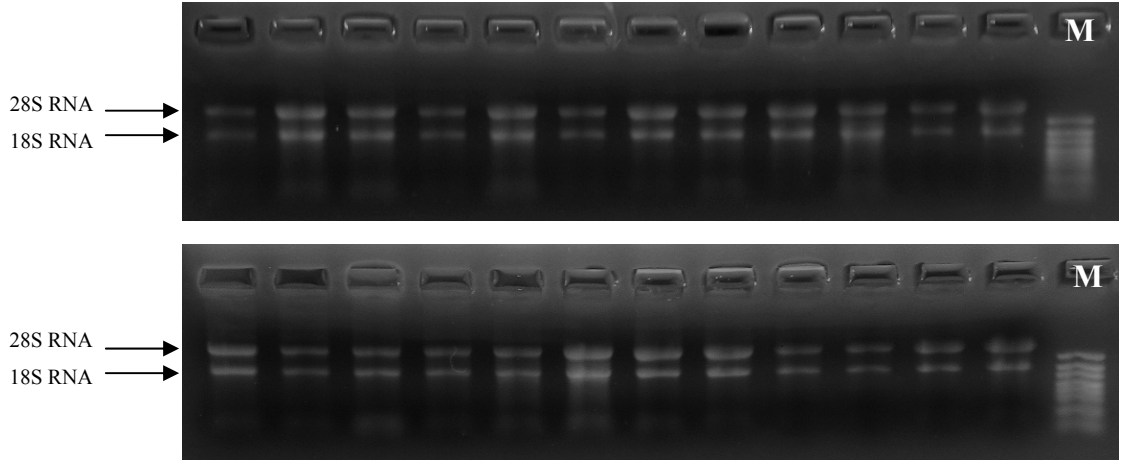
4.6. RNA İZOLASYONU VE RT-PCR BULGULARI

Hem kontrol hem deney balıklarından izole edilen RNA nekleri spektrofotometre yardımı ile 260 nm dalgaboyunda llerek miktarları ve 280 nm dalgaboyunda llerek saf olma dereceleri belirlenmiştir. Elde edilen RNA neklerinin konsantrasyonları Tablo 4.6' da verilmiştir. Aynı zamanda yapılan formaldehit ieren agaroz jel elektroforezi sonucunda, izolasyon sırasında RNA' ların yıkılmadıkları doğrulanmıştır (şekil 4.36).

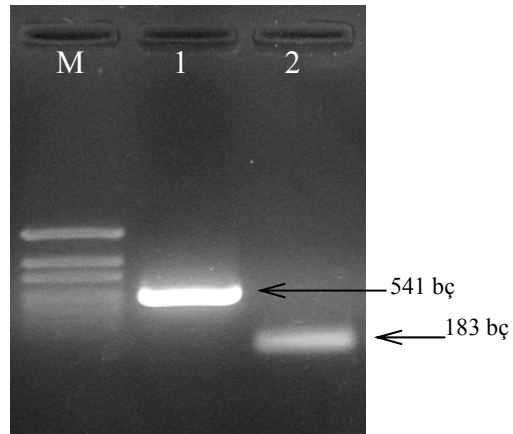
Tablo 4.6: RNA örneklerinin konsantrasyonları

Örnek No	OD ₂₆₀	RNA kons. (µg/µl)	İzole edilen toplam RNA miktarı (µg)
1	0,12	1,18	47,2
2	0,152	1,82	72,8
3	0,421	7,2	288
4	0,117	1,12	44,8
5	0,216	3,1	124
6	0,138	1,54	61,6
7	0,192	2,62	104,8
8	0,129	1,36	54,4
9	0,268	4,14	165,6
10	0,111	1	40
11	0,114	1,06	42,4
12	0,083	0,44	17,6
13	0,117	1,12	44,8
14	0,124	1,26	50,4
15	0,127	1,32	52,8
16	0,071	0,2	8
17	0,102	0,82	32,8
18	0,112	1,02	40,8
19	0,1	0,78	31,2
20	0,129	1,36	54,4
21	0,092	0,62	24,8
22	0,107	0,92	36,8
23	0,108	0,94	37,6
24	0,115	1,08	43,2
25	0,073	0,24	9,6
26	0,096	0,7	28
27	0,095	0,68	27,2
28	0,103	0,84	33,6
29	0,079	0,36	14,4
30	0,086	0,5	20
31	0,083	0,44	17,6
32	0,167	2,12	84,8
33	0,137	1,52	60,8
34	0,121	1,2	48
35	0,138	1,54	61,6

Örnekler hepsi aynı konsantrasyonda olacak şekilde sulandırılarak Titan One Tube RT-PCR Kit (ROCHE) yardımı ile RT-PCR yapılmış ve beklenen bantlar %1' lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek UV altında analiz edilmiştir (Şekil 4.37)

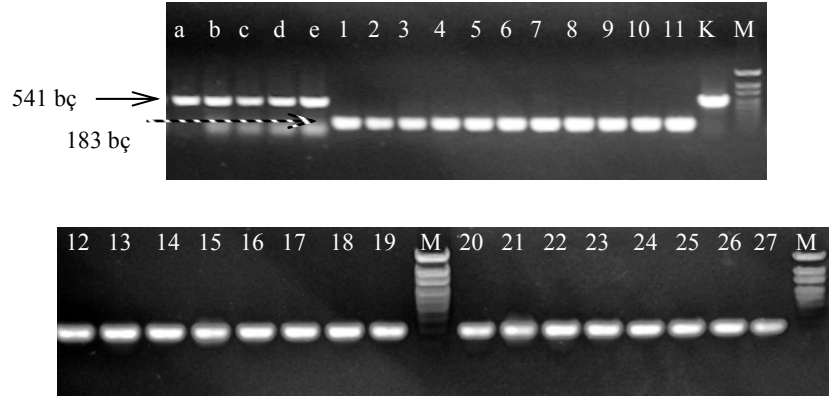


Şekil 4.36: Levrek balığının karaciğer dokusundan izole edilen total RNA örnekleri, M: RNA ladder high range



Şekil 4.37: RNA örneklerinden yapılan RT-PCR sonucu; 1: Levrek β -aktin geni, 2: Levrek transferrin gen EST'si, M: Marker (1000 bp DNA ladder)

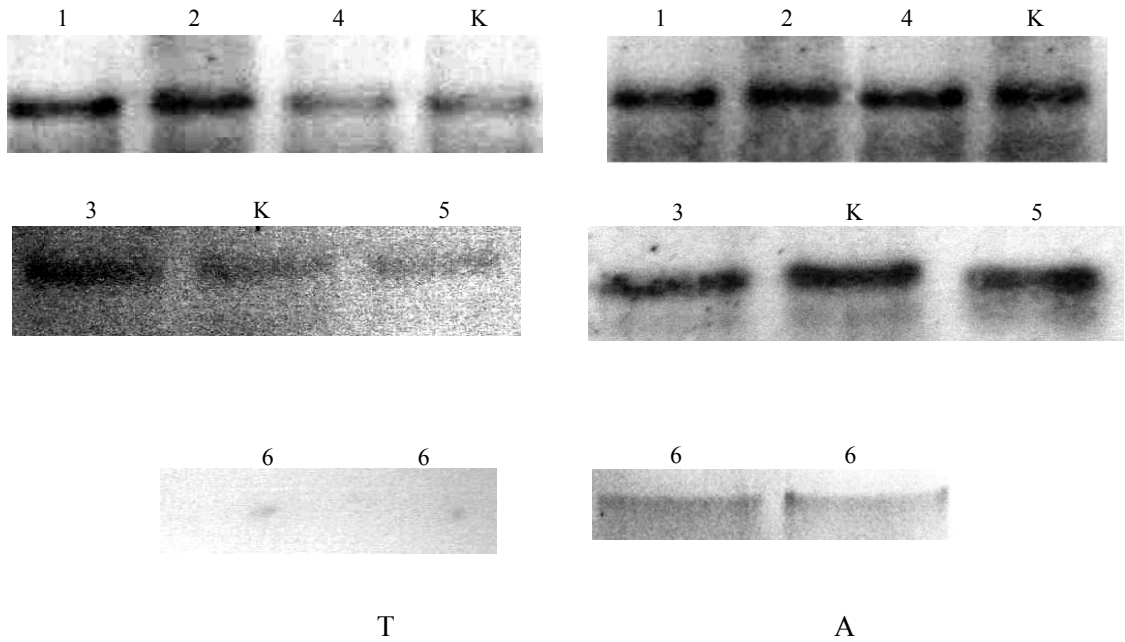
Jelde gen anlatım farkını görebilmek için kullanılması gereken en uygun RNA miktarı için denemeler yapılmıştır. Kullanılan 1 ng, 100 pg ve 10 pg/ μ l yoğunlukta RNA örnekleri ile yapılan RT-PCR sonucunda anlatım farkı gözlenmediğinden alınan sonuçlar anlatım farkını ortaya koymak için yeterli bulunmamıştır (Şekil 4.38).



Şekil 4.38: RT-PCR sonuçları, a-e: internal kontrol gen β -aktin çoğaltılan örnekler, 1-27: transferrin geni çoğaltılan örnekler, K: kontrol (insan β -aktin geni), M: 100bp DNA ladder

4.7. NORTHERN EMDİRİM BULGULARI

Membranda bulunan tüm RNA örneklerinde tek bant şeklinde işaretlenme gözlenmiştir. Deney sonucunda ilk gün ve ikinci gün hasta balıkların transferin gen anlatımında artma olduğu, üçüncü gün anlatımın azalmaya başladığı, dördüncü ve beşinci gün anlatımın kontrol balıklarından da düşük olduğu, altıncı gün ise transferin anlatımının yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39: Northern emdirim deneyi; A: β -aktin gen anlatım sonuçları, T: transferin gen anlatım sonuçları, 1-6: enfekte balık örnekleme günleri, K: kontrol balığı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada levrek balıklarında deneysel olarak *V. anguillarum* enfeksiyonu oluşturularak, bakterinin konak canlıda oluşturduğu patolojik değişiklikler ve konağın verdiği tepki, bazı parametreler kapsamında araştırılmıştır. Hastalık çıkışını engelleyebilmek için, hastalığın seyri ve etken patojenin enfeksiyon süresince balıkta meydana getirdiği bozuklukların zamanla nasıl geliştiğini öğrenmek büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla yapılan bu çalışmada *V. anguillarum* patogenesisini incelemek için deneysel enfeksiyon oluşturulduktan sonra balıkların kan ve doku örnekleri alınmıştır. Bu örnekler ile, total eritrosit sayımı, total lökosit sayımı, hematokrit değeri ölçümü, kan frotileri, doymamış demir bağlama kapasitesi belirlenmesi, serum demir miktar ölçümü, serum transferrin doygunluğu belirlenmesi, bakteri izolasyonu, histopatolojik inceleme ve transferrin gen anlatımı analizleri yapılmıştır.

Deneysel olarak enfekte edilen levreklerden hergün yapılan örneklemelerde tipik vibriosis belirtileri gözlenmiştir. Ölmek üzere olan veya yeni ölmüş balık örneklerinde dış bakıda; baş üzerinde, çene altında, göz çevresinde, ağız içinde, operkulum, çene altında, yüzgeç diplerinde hemorajiler, iç bakıda; karaciğer, dalak, bağırsak cidarı ve viseral organların yüzeyinde hemorajiler, bağırsakta sarı renkli sıvı toplanması ve beyaz mukoid madde birikimi, dalakta büyüme saptanmıştır. Enfeksiyonun son günlerinde ise dalak ve böbrekte erime olduğu dikkati çekmiştir. Bu klinik tablo pek çok araştırmacının bildirdiği tipik Vibriosis bulguları ile benzerlik göstermektedir (Ransom ve diğ., 1984, Ellis, 1989, Inglis ve diğ., 1993, Pedersen ve diğ., 1997, Actis ve diğ., 1999, Austin ve Austin, 2007). Ayrıca Candan (1993) ve Demircan ve Candan (2006) tarafından bildirilen bağırsakta beyaz, opak, mukoid madde birikimi bu çalışmada incelenen balıklarda da dikkati çekmiştir. Her örnekte görülme de bazı balıklarda ekzoftalmus, yüzeysel lezyon oluşumu, kalpte büyüme, viseral organları çevreleyen vücut iç yüzeyinde hemorajiler, solungaçlarda anemi, safranın şişkin ve rengini etrafındaki dokulara verdiği tespit edilmiştir.

İzole edilen *V. anguillarum*' un Gram (-), çomak şeklinde morfolojiye sahip, hareketli olduğu ve katı besiyeri üzerinde yuvarlak, krem renkli koloniler oluşturduğu saptanmıştır. Bu suş % 1,5 NaCl içeren TSA'da 24-25°C sıcaklıkta kolaylıkla üretilmiştir. Bu bulgular daha önce bildirilen raporlarla uyumludur (Blanch ve diğ., 1997, Pedersen ve diğ., 1997, Benediktsdóttir ve diğ., 1998, Actis ve diğ., 1999, Noga, 2000, Demircan ve Candan, 2006, Austin ve Austin, 2007).

Bu çalışmada *V. anguillarum* suşları hem VAM besiyerinde hem de TCBS' de üremiş ancak VAM besiyerinde daha kısa zamanda sonuç alınmıştır. Benzer bulgular Alsina ve diğ., (1994)' nin yaptıkları çalışmada da bildirilmiştir (Alsina ve diğ., 1994). *V. anguillarum* teşhisi için yapılan biyokimyasal testlerin sonuçları ve API 20E profili diğer araştırmacıların (Actis ve diğ., 1999, Noga, 2000, Buller, 2004, Whitman, 2004, Demircan ve Candan, 2006, Austin and Austin, 2007) bulunduğu sonuçlarla uyumludur.

Bu çalışmada kullanılan suşun indol testinin negatif sonuç vermesi referans suş sonucu ile uyuşmamaktadır. *V. anguillarum*' un farklı serotip veya farklı coğrafik bölgelerden elde edilen suşları arasında biyokimyasal özelliklerin değişkenlik gösterdiği daha önceki yayınlarda rapor edilmiştir (Breuil ve Haffner, 1989, Whitman, 2004).

Vibrio enfeksiyonlarında bulaşmanın temelde oral yolla (su ve besin yolu ile) olduğu bildirilmektedir. Belirli koşullar altında bakteri intestinal duvarlara geçerek, konakta sistemik hastalık oluşturma yeteneğindedir (Actis ve diğ., 1999, O'toole ve diğ., 2004, Reed ve Francis-Floyd, 2009). Bu çalışmada da *V. anguillarum* suya inoküle edilerek, balıklarda *in vivo* enfeksiyon oluşturma denenmiştir. Elde edilen veriler ışığında bu enfeksiyonun oral yolla bulaşmasının çok hızlı ve şiddetli septisemiye neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada bakterinin oluşturduğu enfeksiyon sonucu bağırsak duvarının delinmesi orjinal bir bulgudur.

1960 yılında *Salmo trutta*' dan izole edilen ATCC 14181 numaralı *V. anguillarum* suşu O2a serotipidir (Buller, 2004). Actis ve diğ. (1999)' nin belirttiği şekilde salmon ve salmon olmayan balıklarının patojeni olan O2a serotipine sahip bu suş bu çalışmada referans olarak kullanılmış fakat levrek balıklarında enfeksiyon oluşturmamıştır.

Referans suşun alt kültürleri yapıldıkça patojenitesinin düşmesi veya salmon izolatu olması nedenleri ile levreklerde enfeksiyon oluşturmadığı düşünülmüştür.

Pedersen ve diğ. (1997) *V. anguillarum* O1 serotipinin patojenitesi üzerine yaptıkları çalışmada 10^3 - 10^8 hücre/ml yoğunlukta bakteriyi enjeksiyon yöntemi ile intraperitoneal olarak balıklara uygulamış ve LD₅₀ değerlerini bulmuşlardır. 18 farklı suşun kullanıldığı çalışmada her suşun farklı LD₅₀ değeri olduğu bulunmuştur. Genellikle ilk 24 saat içinde ölen balıklarda çok az patolojik değişiklikler bulunmuştur. İlerleyen saatlerde patolojik değişiklikler şiddetlenmiştir. Deride ve kafada, operkulum, göz çevresi, ağız çevresi ve yüzgeç diplerinde hemorajiler gözlenmiştir. Bu çalışmada da LD₅₀ değeri 10^5 hücre/ml bulunan *V. anguillarum* suşu ile enfeksiyon denemesinde suya inokulasyon yöntemi kullanılmış ve başarılı bir şekilde enfeksiyon oluşturulmuştur. Bu enfeksiyon çalışmasında iskelet kaslarında hemoraji ve anüsün dışarı çıkması haricinde Pedersen ve diğ. (1997)' nin bildirdiği bulgulara benzer bulgular elde edilmiştir.

Çalışmada eritrosit sayısının, hasta balıklarda günden güne düştüğü gözlenmiş, fakat 3. ve 6. günlerde yeni eritrositlerin oluşmaya başlaması ile eritrosit sayısında artma tespit edilmiştir. Sağlıklı bir balıkta olgunlaşmamış eritrosit miktarı, eritrosit miktarının % 1' i kadar olması gerektiği bildirilmiştir (Roberts, 1978). Kan örneklerinde yüksek miktarda olgunlaşmamış eritrosit bulunması kendini yenileyen anemi bulgusudur (Stoskopf, 1993). Bu denemede enfeksiyonun 2. gününden itibaren olgunlaşmamış eritrosit sayıları artmış, 3. ve 6. günlerde ise bu sayı %50 civarına ulaşmıştır.

Enfekte balıklardan elde edilen lökositlerin miktar olarak dalgalanma yaptığı tespit edilmiştir. Bağışıklık sisteminin tepki vermesi ile lökositlerin enfeksiyonun ilk iki günü önemli bir artış gösterdiği fakat daha sonraki günlerde bakterinin lökosit sayısında azalma meydana getirdiği hatta 5. günde kontrolden daha düşük seviyeye ulaştığı saptanmıştır. Ransom ve diğ. (1984) *V. anguillarum* etkenli bir vibriosis vakasında salmonlarda lökosit sayısında azalma gözlendiğini rapor etmiştir. Bu azalmanın bakterinin litik etkisi ve sistemik enfeksiyon oluşumu ile organların zarar görmesi ve vücudun lökosit üretememesinin bir sonucu olduğu düşünülmüştür.

Hematokrit değerleri de günden güne azalmış, balıklarda genel olarak bir anemi durumu ortaya çıkmıştır. Bu bulgu daha önce yapılmış çalışmaları sonuçları ile uyum göstermektedir (Akan ve diğ., 1996, Neves ve diğ., 2009).

Vibriozis vakalarında hasta balıklarda gözlenen histopatolojik bulgular, bu çalışmada levreklerde oluşturulan deneysel enfeksiyon süresince de gözlenmiştir. Histopatolojik olarak hastalığın üç sistemik formuna göre değişik bulgular gözlendiği bildirilmiştir (Roberts, 1978, Inglis ve diğ., 1993, Actis ve diğ.,1999, Noga, 2000). Karaciğerde fokal nekroz, böbrekte hemapoietik dokunun boşalmasını takiben renal tübüllere ve hatta renal dokular arasına yayılan nekroz, dalakta hematopoietik dokuda boşalma, kalpte daha az şiddetli lezyonlar ve kaslara kadar ilerleyen deri lezyonları *V. anguillarum*' un akut formunda gelişen önemli bulgulardır. Bu çalışmada deneysel enfeksiyon sonucu elde edilen histopatolojik bulgular akut forma örnek teşkil etmiş, denemede kullanılan *V. anguillarum* suşu levrek balıklarında tipik akut hemorajik septisemiye neden olmuştur.

Enfeksiyon sonucu gözlenen histopatolojik bulgular geçmiş yıllarda bildirilmiş *Vibrio anguillarum* enfeksiyonu çalışmalarındaki histopatolojik bulgular ile uyumludur (Roberts, 1978, Ransom ve diğ., 1984, Grisez ve diğ., 1996, Actis ve diğ.,1999, Noga, 2000, Korun ve Gökoğlu, 2007, Korun ve Timur, 2008). Histolojik kesitlerde bakterinin başlangıçta dalakta, ilerleyen aşamalarda böbrekte kümeleştiği tespit edilmiştir. Karaciğerde ise parankim hücrelerinin yavaş yavaş dejenerasyona uğradığı bulunmuş, hepatik venalara çok yakın bölümlerde küçük çapta nekrozlar gözlenmiştir. Ransom ve diğ. (1984) ve Actis ve diğ. (1999)' nin bildirdikleri gibi, bu çalışmada da dalak ve böbrek en çok etkilenen organlar olmuştur. Enfeksiyonun ilk günlerinden itibaren dalağın etkilendiği ve tüm dokuda nekrotik odaklar oluştuğu gözlenmiştir. Bağırsak mukozasında yaygın ve şiddetli nekroz gözlenmiş, enfeksiyonun son günlerinde bağırsak mukozasının delindiği saptanmıştır. Enfeksiyon ilerledikçe dalak ve böbrek dokusunda da liquefactive nekroz sonucu dokunun parçalandığı tespit edilmiştir. Kan damarları ve nekrotik parankim dokuları arasında ve çevresinde bakteri hücrelerine rastlanmış, solungaç ve bütün viseral organlarda hemorajiler gözlenmiştir.

Böbreğin tümünde nekroz ve peritübüler ödem mevcuttur. Enfeksiyon boyunca genel olarak solungaç epitel hücrelerinin nekroze olarak döküldüğü, kalp kasında da hemorajik odaklar ile birlikte kas hücrelerinin erimesi sonucu miyopati olduğu gözlenmiştir. Roberts (1978) ve Inglis ve diğ. (1993)' nin hastalığın kronik formunda görüldüğünü belirttiği kaslara kadar inen deri lezyonları, bu çalışmada enfeksiyonun akut gelişmesi nedeni ile oluşmamış, lateral vücut kaslarında herhangi bir bozukluk gözlenmemiştir.

Diğer çalışmalarda rastlanmayan kan damarlarının kan hücreleri ile dolu (hiperemik) olması, solungaçlarda nekroz oluşumu ve sadece ilk gün dalak örneklerinde hemosiderin birikimi dikkati çekmiştir. Bu çalışmada oluşturulan septiseminin akut gelişmesinin, vibriozisin kronik formunda görüldüğü bildirilen hemosiderin birikiminin dalak örneklerinde gözlenmemesine sebep olduğu düşünülmüştür (Roberts ve diğ., 1978, Inglis ve diğ., 1993).

Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda *V. anguillarum*' un sahip olduğu sideroforun konak transferrinine bağlanmış olan Fe^{+3} iyonunu kopardığı ve yapısını bozduğu bulunmuştur (Acis ve diğ., 1999). Çalışmada balıklardan alınan kan örneklerindeki transferrin miktarının *V. anguillarum* enfeksiyonu sırasında nasıl değiştiği serolojik olarak gösterilmeye çalışılmıştır. ELISA yöntemi kullanılarak transferrin miktar tespiti yapılmaya çalışılmıştır. Daha önce balıklar ile yapılan çalışmalarda transferrin antikorları kullanılarak miktar tespiti deneylerinde çapraz reaksiyonlar tespit edilmiştir. *Onchorhynchus keta* ve salmonid olmayan 12 farklı tür balığın antikorlarının kullanıldığı bir çalışmada salmonid transferrin antikorunun iki balık haricinde çapraz reaksiyon verdiği gözlenmiştir (Yano, 1996). Roed ve diğ. (1995)' nin yaptığı çalışmada ise Atlantik salmonlarında serum transferrin miktarını ölçmek için oluşturulan poliklonal transferrin antikorunun 10^{-1} oranında sulandırılan alabalık serumu ile düşük miktarda çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır (Røed ve diğ., 1995). Yapılan bu çalışmada ise kullanılan anti-sazan transferrin antikoru ile 10^{-1} - 10^{-5} oranında sulandırılan levrek serumunun çapraz reaksiyon vermediği saptanmıştır. Bu nedenle yapılan ELISA deneyinde kullanılan sazan antikoru ile levrek balıkları serumundaki transferrin miktarı ölçülememiştir.

Transferrin miktarının doğrudan ölçülemediği bu çalışmada likit ferrozinin metodu ile dolaylı olarak Fe^{+3} bağlı olmayan transferrin miktarı (doymamış demir bağlama kapasitesi) ve transferrin doygunluğu ölçülmüştür. Kit kullanılarak gerçekleştirilen bu ölçümlerin sonucunda Fe^{+3} bağlı olmayan transferrin miktarının kontrol balıklarından her zaman fazla olduğu, 3. ve 4. günlerde daha da arttığı sonraki iki gün ise yine ilk iki gün ile aynı seviyeye indiği gözlenmiştir. Transferrin doygunluğunun ise Neves ve diğ., (2009)' nin bulgularına benzer olarak kandaki demirin azalması ile doğru orantılı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Noga, (2000), balıkların yaşadıkları sudan aldıkları demirin yanı sıra diyetle eklenen demirin büyümeyi etkilediğini bildirmiştir. Fakat vibriozisin demirin fazla olduğu ortamlarda balığı daha kolay etkilediği de bilinmektedir (Austin ve Austin, 2007, Noga, 2000). *V. anguillarum* ürettiği siderofor yardımı ile transferrine bağlı bulunan demiri koparabilme yeteneğine sahiptir (Pedersen ve diğ., 1997, Actis ve diğ., 1999.). Kanda demir azalmasına neden olduğu bildirilen *V. anguillarum*' un bu çalışmada kullanılan suşunun siderofor ürettiği CAS agarda turuncu renkli üreyen bakterinin zon oluşturması ile tespit edilmiş ve siderofor üretimi sayesinde transferrin doygunluğunun azalmasına neden olmuştur.

Genlerin fonksiyonel yapısı canlı ile ilgili birçok bilgiyi sunmaktadır. Çevresel modifikasyonlar (kimyasallar, fizyolojik ve patolojik koşullar) ise transkriptom düzeyinde tepkilerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Gornati ve diğ., 2005). Yapılan birçok çalışmada enfeksiyon sırasında balık immün sistem genlerinin anlatım farklılıkları belirlenmiştir (Chen ve diğ., 2006, Rodrigues ve diğ., 2006, Neves ve diğ., 2009). Bu çalışmada ise vibriozis enfeksiyonu sırasında transferrin gen anlatım farkını tespit edebilmek için RT-PCR ve Northern emdirim yöntemleri kullanılmıştır. RT-PCR yönteminde kullanılması gereken en uygun RNA miktarı için denemeler yapılmıştır. 1 ng, 100 pg ve 10 pg/ μ l RNA örnekleri ile yapılan RT-PCR sonucunda yoğunluk farkı gözlenmediğinden alınan sonuçlar anlatım farkını anlamak için yeterli bulunmamıştır. Bu bulgular, Neves ve diğ., (2009)' nin real-time RT-PCR yöntemi kullandıkları çalışma sonucunda belirttiği karaciğerde çok yoğun transferrin anlatımının (1.500.000 kopya) olduğu sonucu ile uyusmaktadır. Aynı sonuçlar Chini ve diğ., (2006)'nin yaptıkları çalışmada da rapor edilmiştir. Karaciğerde çok yoğun transferrin geni

mRNA'sı bulunması, bu çalışmada RT-PCR yönteminin anlatım farkını göstermek için yetersiz kalmasına yol açmıştır.

Low ve diğ., (2003) yapmış oldukları çalışmada transferrin geni için solungaç, böbrek ve dalaktan RNA izolasyonu yapmışlardır. 35 döngülük RT-PCR sonucunda elde edilen ürünler agaroz jelde yürütüldüğünde gen anlatım farklarını tespit edebilmişlerdir. Fakat Neves ve diğ. (2009)' nin bildirdiklerine göre transferrin geni dalak, böbrek, bağırsak, solungaç ve beyinde normal şartlarda çok az anlatım yapmaktadır. Bu nedenle Low ve diğ. (2003)'nin kullandığı RT-PCR yöntemi başarılı sonuç verdiği halde yapılan bu çalışmada karaciğerden izole edilen RNA örneklerinde yoğun transferrin mRNA'sı bulunması nedeni ile başarılı sonuç alınamamıştır. Yaptığımız bu çalışmada RNA miktarının yetersiz gelmesi sonucu RT-PCR yönteminin optimizasyonu yeterince yapılamamıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, RT-PCR yöntemi ile karaciğerde transferrin geni anlatımının karşılaştırılabilmesi için daha fazla RNA izolasyonu yapılması, reaksiyon koşullarının daha fazla denemeye tabii tutulması (daha düşük kalıp RNA miktarı kullanımı, daha az döngü ile reaksiyonu sonlandırma vb.) veya Real-time PCR yönteminin kullanılmasının daha iyi sonuç vereceği düşünülmektedir.

Northern emdirim deneyinde elde edilen transferrin geni anlatımı sonuçlarına göre; kandaki transferin doyumluğu düşmekte iken gen anlatımının da düştüğü tespit edilmiştir. Enfeksiyonun ilk günlerinde transferrin geni anlatımında artma vardır çünkü bağışıklık sistemi akut faz yanıt olarak bakterinin demiri kullanmasını engellemeye çalışmaktadır. Enfeksiyonun 3. ve 4. günlerinde kanda demir azaldığı için transferrin doyumluğu azalmış bu nedenle anlatım yani protein üretimi azalmaya başlamıştır. Son günlerde ise kandaki transferrin doyumluğu en az düzeyde olduğundan kanda ihtiyaç olandan fazla transferrin proteini bulunması anlatımının neredeyse durmasına neden olmuştur. Bayne ve diğ., (2001) yapmış oldukları çalışmada, *V. anguillarum* ile intraperitoneal olarak enfekte edilen alabalıklarda akut faz yanıt oluşturan genleri araştırmışlardır. Balıklardan 4 gün boyunca örnek alınmış ve transferrin gen anlatımının artma yeteneğinde olduğu rapor edilmiştir. Fakat çalışmada kullanılan bakteri yoğunluğundan veya balıkların enfeksiyon düzeyinden bahsedilmemiştir (Bayne ve diğ., 2001). Yapılan bu çalışmada ise ilk iki gün örneklerinde transferrin gen anlatımının arttığı tespit edilmiş fakat daha sonraki günlerde anlatım azalmaya

başlamıştır. Bu bulgular, Neves ve diğ. (2009)' nin *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* enfeksiyonu oluşturulmuş levrek balıklarında transferrin gen anlatımı ve transferrin doygunluğu sonuçları ile uyumludur.

Sonuç olarak bu çalışmada levrek balıklarında vibriosis etkeni *V. anguillarum*' un patogenesisi izlenmiş ve örneklenen balıklardaki patolojik değişiklikler hastalığın tipik bulguları ile uyumlu bulunmuştur. Hasta balıklarda visceral organlarda multifokal nekrozlar, hemorajiler ve ödem, kandaki eritrosit hücrelerinde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler nedeni ile anemi, lökosit sayısında azalma ile bağışıklık sisteminin zayıf düşmesi sonucu ölümlerin akut septisemiye bağlı olarak geliştiği gözlenmiştir. Kandaki demir miktarının azalması ile transferrin doygunluğunun azalması ve buna bağlı olarak vücudun transferrin proteinini üretmediği, dolayısı ile bu proteinin *V. anguillarum*' a karşı savunmada yetersiz kaldığı tespit edilmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda diğer immün sistem proteinlerinin gen anlatım değişiklikleri saptanarak *V. anguillarum*' a karşı savunmada hangi proteinin daha etkin rol oynadığı tespit edilebilir.

KAYNAKLAR

ACKERMAN, P.A. and IWAMA, G.K., 2001, Physiological and Cellular Stress Responses of Juvenile Rainbow Trout to Vibriosis. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13, 173–180.

ACTIS, L.A., FISH, W., CROSA, J.H., KELLERMAN, K., ELLENBERGER, S.R., JAUSER, F.M. and SANDERS, L.J., 1986, Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775 (pJM1). *Journal of Bacteriology*, 167, 57-65.

ACTIS, L.A., TOLMASKY, M.E., FARRELL, D.H. and CROSA, J.H., 1988, Genetic and Molecular Characterization of Essential Components of the *Vibrio anguillarum* Plasmid-Mediated Iron-Transport system. *Journal of Biological Chemistry*, 263(6), 2853-2860.

ACTIS, L.A., TOLMASKY, M.E. and CROSA, J.H., 1999, Vibriosis. In: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno. CAB International Publication, 0851991947.

AGIUS, C. and ROBERTS, R.J., 2003, Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26, 499-509.

AKAN, M., YILDIZ, H., İZGÜR, M. and ATAY, D., 1996, A Case of Vibriosis Caused by *Vibrio anguillarum* in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Health Sciences of Yüzüncü Yıl University*, 2(1-2), 40-43.

AKAYLI, T. and TİMUR, G., 2004, A Diagnostic Study on Vibriosis Cultured Gilt-Head Sea Bream (*S. Aurata*) in the Aegean Sea Coast Farms of Turkey. *Istanbul University Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 17, 43-54.

ALSINA, M., MARTINEZ-PICADO, J., JOFRE, J. AND BLANCH, A.R., 1994, A Medium for Presumptive Identification of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (5), 1681-1683.

ALVAREZ-PELLITERO, P. and PINTÓ, R.M., 1987, Some blood parameters in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, infected by bacteria, virus and parasites. *Journal of Fish Biology*, 31(Supplement A), 259-261.

ANDERSON, D.P., 1974, *Fish Immunology*, Diseases of Fishes Series 4th textbook, Edited by: S.F. SNIESZKO and H.R. AXELROD. T.F.H. Publications, In. Ltd. 0-87666-036-7.

ANONİM, 2008, Basic Techniques in Fish Haematology [online]. Aqualex Multimedia Consortium Ltd. www.aqualex.org/elearning/fish_haematology/english/index.html. [Ziyaret tarihi: Mayıs 2008].

ARDA, N. ve ERTAN, H., 2008, Proteinlerin İzolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, 3. baskı. Editörler G. Temizkan ve N. Arda, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

ARI, Ş., 2008, DNA' nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, 3. baskı. Editörler G. Temizkan ve N. Arda, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

ARIAS, C.R., PUJALTE, M.J., GARAY, E. and AZNAR, R., 1998, Genetic Relatedness Among Environmental, Clinical and Diseased-Eel *Vibrio vulnificus* Isolates from Different Geographic Regions by Ribotyping and Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3403-3410.

ARKOOSH, M.R. and KAATTARI, S.L., 1990, Quantitation of Fish Antibody to a Specific Antigen by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: *Techniques in Fish Immunology*. Edited by J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson, W.B. Van Muiswinkei. SOS Publications, NJ 07704-3303 USA.

AUSTIN, B. and AUSTIN, D., 2007, *Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish 4th edition*. Springer-Praxis Publishing, Chichester.

BARNABÉ, G., 1990, Chapter 4: Rearing Bass and Gilthead Bream. In: *Aquaculture Vol.2*, English edition, Ed. by G. Barnabé, Ellis Horwood, England, 0-13-044199-6.

BAŞUSTA, A.G., 2005, Balık Hematolojisi ve Hematolojik Metodlar, *Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri*, Editör: M. Karataş, Nobel Yayın Dağıtım,.

BAYNE, C., J., GERWICK, L., FUJIKI, K., NAKAO, M. and YANO, T., 2001, Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. *Developmental & Comparative Immunology*, 25, 205-217.

BENEDIKTSDÓTTIR, E., HELGASON, S. and SIGURJÓNSDÓTTIR, H., 1998, *Vibrio* spp. Isolated From Salmonids With Shallow Skin Lesions and Reared at Low Temperature. *Journal of Fish Diseases*, 21, 19-28.

BERNARDET, J.F., KEROUAULT, B. and MICHEL, C., 1994, Comparative study on *Flexibacter maritimus* strains isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in France. *Fish Pathology*, 29, 105-111.

BLANCH, A.R., ALSINA, M., SIMÓN, M. and JOFRE, J., 1997, Determination of Bacteria Associated With Reared Turbot (*Scophthalmus maximus*) Larvae. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 729-734.

- BLAXHALL, P.C. and DAISLEY, K.W., 1973, Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5(6), 771-781.
- BREUIL, G. and HAFFNER, P., 1989, A field report on vibrio disease of Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the South of France. *Advances In Tropical Aquaculture Tahiti AOUACOP IFREMER Actes de Colloque*, 161-169.
- BRUNO, D.W., GRIFFITHS, J., PETRIE, J. and HASTINGS, T.S., 1998, *Vibrio viscosus* in Farmed Atlantic Salmon *Salmo salar* in Scotland: Field and Experimental Observations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 34, 161-166.
- BT PRODUCTS, 2008, UIBC/TIBC (Demir Bağlama Kapasitesi) Kit, Instruction Manual.
- BULLER, N.B., 2004, *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*, CABI Publishing, UK, 0851997384.
- BURY, N., R., WALKER, P., A., GLOVER, C., 2003, Nutritive metal uptake in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*, 206, 11-23
- CANDAN, A., 1993, Çipura (*Sparus aurata* L. 1758) Balıklarında *Vibrio anguillarum* İnfeksiyonu. *Türk Mikrobioloji Cemiyeti Dergisi*, 23, 25-27.
- CANDAN, A., 2000, Türkiye’de Üretilen Atlantik Salmonu (*Salmo salar* L.)’ nda Tespit Edilen ilk Vibriosis Olgusu. *Türk Mikrobioloji Cem. Dergisi*, 30,107-108.
- CARGINALE, V., CAPASSO, C., SCUDIERO, R. and PARISI, E., 2002, Identification of Cadmium-Sensitive Genes in the Antarctic Fish *Chionodraco hamatus* by Messenger RNA Differential Display. *Gene*, 299, 117-124.
- CHEN, Q. and CROSA, J.H., 1996, Antisense RNA, Fur, Iron, and the Regulation of Iron Transport Genes in *Vibrio anguillarum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(31), 18885-18891.
- CHEN, S.-L., ZHANG, Y.-X., XU, M.-Y., JI, X.-S., YU, Y.-C. and DONG, C.-F., 2006, Molecular Polymorphism and Expression Analysis of MHC Class IIB Gene from Red Sea Bream (*Chrysophrys major*). *Developmental & Comparative Immunology*, 30 (4), 407-418.
- CHINI, V., RIMOLDI, S., TEROVA, G., SAROGLIA, M., ROSSI, F., BERNARDINI, G. and GORNATI, R., 2006, EST-based identification of genes expressed in the liver of adult sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gene*, 376, 102-106.
- COLQUHOUN, D.J. and SØRUM, H., 1998, Outer Membrane Protein Expression During *in vivo* cultivation of *Vibrio salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 8, 367-377.
- COLQUHOUN, D.J., 2002, *Vibrio salmonicida*, the causative agent of cold-water vibriosis: Factors relating to pathogenesis and vaccine protection. *PhD Thesis*, The

Norwegian School of Veterinary Medicine Department of Pharmacology, Microbiology and Food Hygiene.

CORRIPIO-MIYAR, Y., MAZORRA DE QUERO, C., TREASURER J.W., FORD, L., SMİTH P.D. and SECOMBES, C.J., 2007, Vaccination experiments in the gadoid haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L., against the bacterial pathogen *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 118, 147–153.

CROSA, J., 1984, The Relationship of Plasmid-Mediated Iron Transport and Bacterial Virulence. *Annual Reviews of Microbiology*, 38, 69-89.

CROSA, J., 1997, Signal transduction and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (3), 319-336.

CULLING, C.F.A., 1963, *Handbook of Histopathological Techniques (Including Museum Technique)*, Second Edition. Butterworth Co. Publishers, London.

ÇAĞIRGAN, H. and YÜREKLİTÜRK, O., 1996, A Research on the diagnosis and treatment of cultured Sea bream (*Sparus aurata*) and Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *The Journal of Center of Veterinary Control and Research Institute*, 21, 35, 113-122.

ÇELİKKALE, M.S., DÜZGÜNEŞ, E. ve OKUMUŞ, İ., 1999, *Türkiye Su Ürünleri Sektörü Potansiyeli, Mevcut Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri*. İstanbul Ticaret Odası Yayın No: 1999-2, İstanbul, 975-512-321-0.

ÇETİNKAYA, O. ve ŞAHİN, A., 2005, Balıklarda Anestezi Uygulamaları ve Başlıca Anestezikler. *Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri*, Editör: M. Karataş, Nobel Yayın Dağıtım, 237-274.

ÇOTUK, A., 2003, *Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri*, Nobel Tıp Kitabevleri, 975-420-290-7.

DARIAS, M.J., ZAMBONINO-INFANTE, J.L., HUGOT, K., CAHU, C.L. and MAZURAS, D., 2008, Gene Expression Patterns During the Larval Development of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) by Microarray Analysis. *Marine Biotechnology*, 10, 416-428.

DEMİR, N., 2006, *İhtiyoloji*, 3. baskı. Nobel Yayın Dağıtım, Yayın No: 924, Ankara. 975-591-909-0

DEMİRCAN, D. and CANDAN, A., 2006, Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* Gene) Associated with Vibriosis in Marine Fish in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30(3), 305-310.

DI LORENZO, M., STORK, M., TOLMASKY, M.E., ACTIS, L.A., FARRELL, D., WELCH, T. J., CROSA, L.M., WERTHEIMER, A.M., CHEN, Q., SALINAS, P., WALDBESER, L. and CROSA, J.H., 2003, Complete Sequence of Virulence Plasmid pJM1 from the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum* Strain 775. *Journal of Bacteriology*, 185 (19), 5822–5830.

EGUCHI, M., FUJIWARA, E. and MIYAMOTO, N., 2000, Survival of , *Vibrio anguillarum* in Freshwater Environments: Adaptation or Debilitation? *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6, 126-129.

EKBLOM, P., THESLEFF, I., SAXÉN, L., MIETTINEN, A., and TIMPLO, R., 1983, Transferrin as a fetal growth factor: Acquisition of responsiveness related to embryonic induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2651-2655.

ELLIS, A.E., 1988, General Principles of Fish Vaccination. In: *Fish Vaccination*. Edited by: A.E. Ellis, Academic Press.

ELLIS, A.E., 1989, *Vibriosis of Salmonids in Scotland, Aquaculture Information Series Number 7*. Department of Agriculture and Fisheries for Scotland. 0953-2781.

ELLIS, A.E., 1999, Immunity to Bacteria in Fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 9, 291-308.

FEAP Reports, 2008, Production and price reports of member associations of the F.E.A.P., The Federation of European Aquaculture Producers. [online], http://www.aquamedia.org/production/euproduction/productionreport_en.asp, [Ziyaret tarihi: 03 Mart 2009]

FERGUSON, H.W., 1989, *Systemic Pathology of Fish, a Text and Atlas of Comparative Tissue Responses in Diseases of Teleosts*. Iowa State Press, 9780813801476.

GATESOUBE, F.J., LAMBERT, C. and NICOLAS, J.L., 1999, Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 757-763.

GONZALES, S.F., OSORIO, C.R. and SANTOS, Y., 2003, Development of a PCR-Based Method for the Detection of *Listonella anguillarum* in Fish Tissues and Blood Samples. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55, 109-115.

GORNATI, R., PAPIS, E., RIMOLDI, S., CHÌNÌ, V., TEROVA, G., PRATI, M., SAROGLIA, M. and BERNARDINI, G., 2005, Molecular markers for animal biotechnology: sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) HMG-CoA reductase mRNA. *Gene*, 334, 299-305.

GRISEZ, L. and OLLEVIER, F., 1995, Comparative Serology of the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4367-4373.

HANSEN, J.D. and LA PATRA, S., 2002, Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection. *Immunogenetics*, 54 (9), 654-661.

HARRIS, W.R., 1998, Binding and Transport of Nonferrous Metals by Serum Transferrin. In: *Less Common Metals in Proteins and Nucleic Acid Probes, Structure and Bonding*, Vol. 92, Ed by: M.J. Clarke. Springer Verlag, Berlin. ISSN 0081-5993

- HIBIYA, T., 1982, *An Atlas of Fish Histology*, Kondasha Ltd., Japan, 4-06139471-1.
- HINTON, D.E., 1990, Histological Techniques. In: *Methods for Fish Biology*, Edited by C.B. Schreck and P.B. Moyle. American Fisheries Society, Exxon Company, USA.
- HIRONO, I., MASUDA, T. and AOKI, T., 1996, Cloning and Detection of the Hemolysin Gene of *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis*, 21, 173-182.
- HORNE, M.T., 1982, The Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* (Bergman). In: *Microbial Diseases of Fish*, Publish for The Society for General Microbiology, edited by: R.J. Roberts, Academic Press Inc., London.
- HOUSTON, A.H., 1990, Blood and Circulation. In: *Methods for Fish Biology*, Edited by C.B. Schreck and P.B. Moyle. American Fisheries Society, Exxon Company, USA.
- IDZERDA, R.L., HUEBERS, H., FINCH, C.A. and MCKNIGHT, G.S., 1986, Rat transferrin gene expression: Tissue-specific regulation by iron deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 3723-3727.
- INGLIS, V., ROBERTS, R.J. and BROMAGE, N.R., 1993, *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Scientific Publications, London, 109-121.
- JALAL, M.A.F., HOSSAIN, M.B., VAN DER HELM, D., SANDERS-LOEHR, J., ACTÍS, L.A. and CROSA, J.H., 1989, Structure of Anguibactin, a Unique Plasmid-Related Bacterial Siderophore from the Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of the American Chemical Society*, 111, 292-296.
- KARATAŞ DÜĞENCI S. and CANDAN A., 2003, The effect of some immunostimulants to the non specific immune system of rainbow trout (*O. mykiss*, Walbaum). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27, 1253-1260.
- KEHA, E.E. ve KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., 2007, *Biyokimya*, 5. Baskı. Aktif Yayınevi, Ankara, 978-975-8986-20-0.
- KENT, M.L. and POPPE, T.T., 2002, Infectious Diseases of Coldwater Fish in Marine and Brackish Water. *Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture*, Eds P.T.K. Woo, D.W. Bruno and L.H.S. Lim, CAB International, 0851994431
- KILIÇ, N., 2005, *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Üçüncü baskıdan çeviri* D.L. Nelson ve M.M. Cox. Palme yayınları: 313, Ankara, 975-8982-18-4.
- KISSIL, G.W., TANDLER, A., COLORNI, A. and ELIZUR, A., 2000, Sea Bass Culture, In: *Encyclopedia of Aquaculture*, edited by: R.R. Stickney, John Wiley & Sons, Inc. USA, 0-471-29101-3.
- KODAMA, H., MOUSTAFA, M., ISHIGURO, S., MIKAMI, T. and IZAWA, H., 1984, Extracellular virulence factors of fish Vibrio: relationships between toxic material, hemolysin, and proteolytic enzyme. *American Journal of Veterinary Research*, 45 (10), 2203-2207.

- KORUN, J. and GÖKOĞLU, M., 2007, *Listonella anguillarum* isolated from hatchery-cultured red porgy (*Pagrus pagrus*) in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6 (6), 823-827.
- KORUN, J. and TIMUR, G., 2008, Marine vibrios associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Journal of Fisheries Sciences.com* [online], 2(1), 66-76. www.fisheriessciences.com
- KÖSTER, W.L., ACTIS, L.A., WALDBESER, L.S., TOLMASKY, M.E. and CROSA, J.H., 1991, Molecular Characterization of the Iron Transport System Mediated by the pJM1 Plasmid in *Vibrio anguillarum* 775. *The Journal Of Biological Chemistry*, 266 (35), 23829-23833.
- LEONG, T.S. and COLORNI, A., 2002, Infectious Diseases of Warmwater Fish in Marine and Brackish Waters. *Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture*, Eds P.T.K. Woo, D.W. Bruno and L.H.S. Lim, CAB International, 0851994431.
- LE BRETON, A.D. 2003, Vaccines in Mediterranean Aquaculture: Practice and Needs. *The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture, Advanced Seminar*, İzmir, Turkey, 21-23 May, International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies Mediterranean Agronomic Institute of Zaragoza, Food and Agriculture Organization of the United Nations Fisheries Department, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of Turkey, Turkish Fisheries Foundation.
- LAING, K.J, HARDIE, L.J., AARTSEN, W., GRABOWSKI, P.S. and SECOMBES, C.J., 1999, Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology*, 23, 71-85.
- LIU, Q., MA, Y., WU, H., SHAO, M., LIU, H. and ZHANG, Y., 2004, Cloning, Identification and Expression of an entE homologue angE from *Vibrio anguillarum* serotype O1. *Archives of Microbiology*, 181, 287-293.
- LÓPEZ, C.S. and CROSA, J.H., 2007, Characterization of Ferric-Anguibactin Transport in *Vibrio anguillarum*. *Biometals*, 20, 393-403.
- LOW, C., WADSWORTH, S. BURRELS, C. and SECOMBES, C.J., 2003, Expression of Immune Genes in Turbot (*Scophthalmus maximus*) Fed a Nucleotide-Supplement Diet, *Aquaculture*, 221, 23-40.
- MARTINEZ-PICADO, J., BLANCH, A.R. and JOFRE, J., 1994, Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using a specific oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 732-737.
- MAZOY, R., CONCHAS, R.F., FOUZ, B and LEMOS, M.L., 1992, Growth of *Vibrio anguillarum* in different fish sera. *Aquaculture*, 107, 277-281.

MCLAREN, G.D., 2001, Hereditary Hemochromatosis and Other Iron-Overload Disorders, In: *Manual of Clinical Hematology, Third Edition*, Edited by: J. Mazza, Lippincott Williams & Wilkins, 9780781729802.

MEMİŞ, D., 2009, *Deniz Balıkları Yetiştiriciliği*. (Baskıda)

MIKKELSEN, H., LUND, V., MARTINSEN, L.C., GRAVNINGEN, K., and SCHRODER, M. B., 2007, Variability among *Vibrio anguillarum* O2 isolates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Characterisation and vaccination studies. *Aquaculture*, 266, 16-25.

MOBIO Laboratories, 2005, Ultraclean Tissue RNA Isolation Kit, catalog number: 15000-50, Instruction Manual

MORETTI, A., FERNANDEZ-CRIADO, M.P., CITTOLIN, G. and GUIDASTRI, R., 1999, Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream, Vol.1, FAO, Italy, 92-5-104380-9.

NEVES, J.V., WILSON, J.M. and RODRIGUES, P.N.S., 2009, Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish, *Developmental and Comparative Immunology*, 33, 848-857.

NOGA, E.J., 2000, Fish Disease Diagnosis and Treatment. Iowa State Press, USA, 0-8138-2558-X.

O'TOOLE, R., VON HOFSTEN, J., ROSQVIST, R., OLSSON, P-E. and WOLF-WATZ, H., 2004, Visualisation of Zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis*, 37 (1), 41-46.

PEDERSEN, K., GRAM, L, AUSTIN, D.A. and AUSTIN, B., 1997, Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* serogroup O1 strains compared to plasmids, outer membrane protein profiles and siderophore production. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 365-371.

PEDERSEN, K., GRISEZ, L., VAN HOUTT, R., TIAINEN, T., OLLEVIER, F. and LARSEN, J.L., 1999a, Extended Serotyping Scheme for *Vibrio anguillarum* with the Definition and Characterization of Seven Provisional O-Serogroups. *Current Microbiology*, 38, 183-189.

PEDERSEN, K., KÜHN, I., SEPPÄNEN, J., HELLSTRÖM, A., TIAINEN, T., RIMAİLA-PÄRNÄNEN, E. and LARSEN, J.L., 1999b, Clonality of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish from the Scandinavian countries, Sweden, Finland and Denmark. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 337-347.

PÉREZ-MIRANDA, S., CABIROL, N., GEORGE-TÉLLEZ, R., ZAMUDIO-RIVERA, L.S. and FERNÁNDEZ, F.J., 2007, O-cas, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 127-131.

PODSCHUN, R., FISCHER, A. and ULLMANN, U., 1992, Siderophore Production of Klebsiella Species Isolated from Different Sources. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 276, 481-486.

PRIMER 3, primer dizayn programi. [online] <http://frodo.wi.mit.edu/> [Ziyaret tarihi 2007]

RANSOM, D.P., LANNAN, C.N., ROHOVEC, J.S. and FRYER, J.L., 1984, Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. *Journal of Fish Diseases*, 7, 107-115.

REED, P. A. and FRANCIS-FLOYD, R., 2009, Vibrio Infections of Fish [online]. A series of the Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. FA31. <http://edis.ifas.ufl.edu/FA036> [Ziyaret Tarihi: Mayıs, 2009]

REED, L.J. and MUENCH, H., 1938, A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.

ROBERTS, R.J., 1978, *Fish Pathology*, McMillan Publishing Co. Inc., New York 0-7020-0674-2

ROCHE, 2004, DIG DNA Labeling and Detection Kit, catalog number: 11093657910, Instruction Manual

ROCHE, 2005, Titan One Tube RT-PCR Kit, catalog number: 11939823001, Instruction Manual

RODGER, H.D. and COLQUHOUN, D.J., 2008, Clinical vibriosis in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) in Ireland. *The Veterinary Record*, 162, 94-95.

RODGERS, C.J., 2003, The Risks Associated With The Use of Veterinary Drugs and Chemicals in Aquaculture: Assessment and Control. *The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture, Advanced Seminar*, İzmir, Turkey, 21-23 May, International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies Mediterranean Agronomic Institute of Zaragoza, Food and Agriculture Organization of the United Nations Fisheries Department, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of Turkey, Turkish Fisheries Foundation.

RODKHUM, C., HIRONO, I., STORK, M., DI LORENZO, M., CROSA, J.H. and AOKI, T., 2006, Putative virulence-related genes in *Vibrio anguillarum* identified by random genome sequencing. *Journal of Fish Diseases*, 29, 157-166.

RODRIGUES, P.N.S. and PEREIRA, F.A., 2004, Effect of dietary iron overload on Photobacterium damsela ssp. Piscicida pathogenicity in sea bass, Dicentrarchus labrax (L.). *Journal of Fish Diseases*, 27, 673-676.

RODRIGUES, P.N.S., VÁZQUEZ-DORADO, S., NEVES, J.V. and WILSON, J.M., 2006, Dual function of fish hepcidin: Response to experimental iron overload and

bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Developmental and Comparative Immunology*, 30, 1156–1167.

RØED, K.H., DEHLI, A.K., FLENGSRUD, R., MIDTHJELL, L. and RØRVIK, K.A., 1995, Immunoassay and Partial Characterisation of serum Transferrin from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 5, 71-80.

ROMALDE, J.R., MAGARIÑOS, B., FOUZ, B., BANDÍN, I., NÚÑEZ, S. and TORANZO, A.E., 1995, Evaluation of BIONOR Mono-Kits for Rapid Detection of Bacterial Fish Pathogens. *Diseases Of Aquatic Organisms*, 21, 25-34.

ROWLEY, A.F., 1990, Collection, Separation and Identification of Fish Leucocytes. In: *Techniques in Fish Immunology*. Edited by J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson, W.B. Van Muiswinkei. SOS Publications, NJ 07704-3303 USA.

SAKA, Ş., TUNCER, H., FIRAT, K. and UÇAL, O., 2007, Culture of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*), Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) and Other Mediterranean Species. In: *Marine Aquaculture in Turkey*, edited by: A. Candan, S. Karataş, H. Küçüktaş, İ. Okumuş, Turkish Marine Research Foundation, Turkey. 978-975-8825-18-9.

SALINAS, P.C., TOLMASKY, M.E. and CROSA, J.H., 1989, Regulation of the iron uptake system in *Vibrio anguillarum*: Evidence for a cooperative effect between two transcriptional activators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 3529-3533.

SALYERS, A.A. and WHITT, D.D., 1994, *Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach*. ASM Press, Washington, 1-55581-070-5, pp. 16-27.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANTOS, Y., BANDÍN, I., NÚÑEZ, S., MONTERO, M., SILVA, A. and TORANZO, A.E., 1992, Comparison of the Extracellular Biological Activities of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 107, 259-270.

SANTOS, Y., ROMALDE, J.L., BANDÍN, I., MAGARIÑOS, B., NÚÑEZ, S., BARJA, J.L. and TORANZO, A.E., 1993, Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 116 (2-3), 11-120.

SARIKAYA, A. T., 2008, RNA' nın İzolasyonu ve Analizi. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, 3. Baskı. Editörler G. Temizkan ve N. Arda, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

ŠARUŠIĆ, G., 1999, Preliminary Report of Infestation by Isopod *Ceratothoa oestroides* (Risso, 1826) in Marine Cultured Fish. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 19(3), 110.

SHARKEY, F.H., BANAT, I.M. and MARCHANT, R., 2004, Detection and Quantification of Gene Expression in Environmental Bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 3795-3806.

SISK, R.B., 1997, RT-PCR Quantitative and Diagnostic PCR in the Analysis of Gene Expression. In: *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian, Chapter 6*. Edited by: W.B. Coleman and G.J. Tsongalis, Humana Press, 103-121.

SNIEZSKO, S. and AXELROD, H., 1971, *Diseases of Fish, Book 2A: Bacterial Diseases of Fishes*, T.F.H. Publications.

STAFFORD, J.L. and BELOSEVIC, M., 2003, Transferrin and the Innate Immune Response of Fish: Identification of a Novel Mechanism of Macrophage Activation. *Developmental and Comparative Immunology*, 27, 539-554.

STICKNEY, R.R. and KOHLER, C.C., 1990, Maintaining Fishes for Research and Teaching. In: *Methods for Fish Biology*, Edited by C.B. Schreck and P.B. Moyle. American Fisheries Society, Exxon Company, USA.

STORK, M., DI LORENZO, TIMOTHY J.W. and CROSA, J.H., 2007, Transcription Termination within the Iron Transport-Biosynthesis Operon of *Vibrio anguillarum* Requires an Antisense RNA. *Journal of Bacteriology*,

STOSKOPF, M.K., 1993, *Fish Medicine*, W.B. Saunders Company, 0-7216-2629-7.

SUMMERFELT, R.C. and SMITH, L.S., 1990, Anesthesia, surgery and related techniques, In: *Methods for Fish Biology*, Edited by C.B. Schreck and P.B. Moyle. American Fisheries Society, Exxon Company, USA.

ŞAHRİKOĞLU, L. ve CANDAN, A., 2002, Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.1758) Balıklarında *Aeromonas hydrophila* İnfeksiyonu Üzerinde Bir Araştırma. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi* 14, 59-70.

TEMİZKAN, G., 2008, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler: Genel Bakış, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Editörler G. Temizkan ve N. Arda, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

TİMUR, G., 2008, *Balık Anatomisi*. Nobel Yayın Dağıtım, Yayın no: 1332, Ankara, 978-605-395-129-2.

TİMUR, G., and KORUN, J., 2004, First Outbreak of Vibriosis in farmed rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Istanbul University, Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 18(18), 1-9.

TİMUR, G. ve TİMUR, M., 2003, *Balık Hastalıkları*. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 975-404-699-9.

TİMUR, G., TİMUR, M., KARATAŞ, S. and AKAYLI, T., 1999, A Study on Fish Pasteurellosis of Cultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Infected, *Ichthyophonus hoferi*. *Istanbul University Journal of Aquatic Products*, Special Issue.

TİMUR, G., TİMUR, M., AKAYLI, T., KORUN, J. and THOMPSON, K.D., 2005, First observation of rickettsia-like organism in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25(5): 196-202

TİMUR, M., 2006, *Balık Fizyolojisi*. Nobel Yayın Dağıtım, Yayın no: 957, Ankara, 975-591-943-0.

TOKULLUGİL A, DİRİCAN, M. VE ULUKAYA E., 1997, *Biyokimya "Lippincott's Illustrated Review Serisinden"* İkinci baskı. P.C. Champe ve R.A. Harvey. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

TURNER, P.C., LENNAN, A.G., BATES, A.D. and WHITE, M.R.H. (2000) *Molecular Biology (Second Edition)*. UK, BIOS Scientific Publishers Ltd., 962-430-118-2.

TÜRK, N., 2002, Isolation of bacteria from Sea Bream and Sea Bass and determination of their antibiotic susceptibilities. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 27 (41), 7-14.

WELCH, T.J and CROSA, J.H., 2005, Novel Role of the Lipopolysaccharide O1 Side Chain in Ferric Siderophore Transport and Virulence of *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*, 73(9), 5864-5872.

WELCH, T.J., CHAI, S. and CROSA J.H., 2000, The Overlapping *angB* and *angG* Genes are Encoded by the *Vibrio anguillarum*: Essential Role in Siderophore Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 182, 6762-6773.

WERTHEIMER, A.M., VERWEIJ, W, CHEN, Q., CROSA, L.M., NAGASAWA, M., TOLMASKY, M.E., ACTIS, L.A., and CROSA, J.H., 1999, Characterization of the *angR* Gene of *Vibrio anguillarum*: Essential Role in Virulence. *Infection and Immunity*, 67, 6496-6509.

WHITMAN, K.A., 2004, *Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: Techniques and Procedures*. Iowa state press, USA, 0-8138-1952-0.

WOJTCZAK, M., DIETRICH, G.J. and CIERESZKO, A., 2005, Transferrin and antiproteases are major proteins of common carp seminal plasma. *Fish & Shellfish Immunology*, 19, 387-391.

WOJTCZAK, M., DIETRICH, G.J., IRNAZAROW, I., JURECKA, P., SŁOWIŃSKA M. and CIERESZKO, A., 2007, Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma: Relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part B 148, 426-431.

YANO, T., 1996, The Nonspecific Immune System: humoral Defense. In: *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*, Edited by: G. Iwama and T. Nakanishi. Academic Press, USA.

YILMAZER, S., ÖZTÜRK, M., ARI, Ş. ve TOPAL SARIKAYA, A., 2008, Nükleik Asit Melezlemesine Dayalı Yöntemler. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, 3. Baskı. Editörler G. Temizkan ve N. Arda, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

YONGJUAN, X., WEIQUN, H., BOACHENG, H., XIAOHANG, J., and RONGQING, Z., 2002, Production and characterisation of monoclonal anti-idiotypic antibody to *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 12, 273-281.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Üsküdar' da doğdum. İlkokul, ortaokul ve liseyi İstanbul' da okudum. 1996 yılında İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesini kazandım. 2000 yılında üniversiteden mezun oldum ve İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Su Ürünleri Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Programında yüksek lisans öğrenimime başladım. 2002-2003 yılları arasında eğitim nedeniyle Japonya' da, Tokyo Balıkçılık Üniversitesinde bulundum. 2004 yılında yüksek lisansımı tamamladım. Aynı yıl İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Su Ürünleri Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Programında doktora öğrenimime başladım. 2005 yılında İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesine araştırma görevlisi olarak atandım. Yabancı dilim İngilizcedir.