

**ZEBRA BALIKLARINDA DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN *EDWARDSIELLA TARDA* ENFEKSİYONU
ÜZERİNE HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER**

Hamza KALKAN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hayati YÜKSEL

**Haziran 2015
Her hakkı saklıdır**

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEBRA BALIKLARINDA DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN *EDWARDSIELLA TARDA*
ENFEKSİYONU ÜZERİNE HİSTOPATOLOJİK
İNCELEMELER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hamza KALKAN

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Hayati YÜKSEL

Haziran 2015

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Öğrenimimin ders dönemimden, tez konusunun belirlenmesinden ve tezimin sonuçlanmasına kadar ki her aşamada maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyerek; bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana ve tezime yön veren, Danışman Hocam; Sayın Doç. Dr. Hayati YÜKSEL'e emeklerinden dolayı sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans tez çalışmaları süresince katkı ve desteklerini hep yanımda gördüğüm, hocalarım; Yrd. Doç. Dr. Aykut ULUCAN'a, Doç. Dr. Mehmet Nuri AÇIK'a, Yrd. Doç. Dr. Ünal İSPİR'e ve Öğretim Görevlisi Ömer ÇAMUR'a teşekkür ederim.

Ayrıca üzerimdeki emekleri büyük olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve dualarını esirgemeyen Anne ve Babam'a, bu tezin hazırlanması sırasında gösterdikleri sabır, fedakârlık ve desteklerinden dolayı özellikle Eşime, Oğluma ve Kızıma şükranlarımı sunarım.

Hamza KALKAN

Bingöl 2015

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. TANIM VE TARİHÇE.....	3
2.1. Etiyoloji.....	6
2.2. Deneysel Olarak <i>Edwarsiella tarda</i> Enfeksiyon Oluşturma Yolları.....	7
2.3. <i>Edwarsiella tarda</i> 'nın Patogenezisi.....	7
2.4. <i>Edwarsiella tarda</i> Enfeksiyonundaki Makroskobik Bulgular.....	8
2.5. <i>Edwarsiella tarda</i> Enfeksiyonunda Gözlenen Histopatolojik Bulgular.....	9
2.6. <i>Edwarsiella tarda</i> Enfeksiyonunda Teşhis Tedavi ve Korunma Yolları.....	10
3. MATERYAL VE METOT.....	11
3.1. Deney Hayvanları.....	11
3.2. Deney Ortamı.....	11
3.3. Beslenme.....	11
3.4. Referans Suş ve Kültür Ortamı.....	12
3.5. Çalışma Takvimi ve Deneysel Gruplandırma.....	12
3.5.1. Grup 1 (Deney Grubu).....	12
3.5.2. Grup 2 (Deney Grubu-10 ⁴ CFU/ml Intraperitoneal).....	12
3.5.3. Grup 2 (Deney Grubu-10 ⁵ CFU/ml Intraperitoneal).....	13

3.5.4. Grup 3 (Deney Grubu-10 ⁶ CFU/ml İmmersiyon).....	13
3.5.5. Grup 3 (Deney Grubu-10 ⁷ CFU/ml İmmersiyon).....	13
3.6. Anestezi Ötenazi Nekropsi ve Doku Örneklerinin Alınması.....	14
3.7. Doku Örneklerinin İncelenmesi.....	14
3.8. Hematoksilen-Eosin Boyama Protokolü.....	14
3.9. Preparatların İncelenmesi.....	14
4. BULGULAR.....	15
4.1. Klinik Bulgular.....	15
4.1.1. Grup 1 (Kontrol grubu).....	15
4.1.2. Grup 2 (Deney grubu-10 ⁴ CFU/ml İntraperitoneal).....	15
4.1.3. Grup 3 (Deney grubu-10 ⁵ CFU/ml İntraperitoneal).....	15
4.1.4. Grup 4 (Deney grubu-10 ⁶ CFU/ml İmmersiyon).....	16
4.1.5. Grup 5 (Deney grubu-10 ⁷ CFU/ml İmmersiyon).....	16
4.2. Makroskobik Bulgular.....	16
4.2.1. Grup 1 (Kontrol grubu).....	16
4.2.2. Grup 2 (Deney grubu-10 ⁴ CFU/ml İntraperitoneal).....	17
4.2.3. Grup 3 (Deney grubu-10 ⁵ CFU/ml İntraperitoneal).....	17
4.2.4. Grup 4 (Deney grubu-10 ⁶ CFU/ml İmmersiyon).....	18
4.2.5. Grup 5 (Deney grubu-10 ⁷ CFU/ml İmmersiyon).....	19
4.3. Mikroskobik Bulgular.....	19
4.3.1. Grup 1 (Kontrol grubu).....	19
4.3.2. Grup 2 (Deney grubu-10 ⁴ CFU/ml İntraperitoneal).....	19
4.3.3. Grup 3 (Deney grubu-10 ⁵ CFU/ml İntraperitoneal).....	24
4.3.4. Grup 4 ve Grup 5 (Deney grubu-10 ⁶ CFU/ml ve Deney grubu-10 ⁷ CFU/ml İmmersiyon).....	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	30
KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ.....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Celcius Derece
µm	: Mikrometre
<i>A. hydrophila</i>	: <i>Aeromonas hydrophila</i>
ATCC	: American Type Culture Collection
BHIA	: Brain Heart Infusion Agar
<i>C. freundii</i>	: <i>Citrobacter freundii</i>
CFU	: Colony Forming Units
DsRed	: Kırmızı fluoresan protein
<i>E. ictaluri</i>	: <i>Edwardsiella ictaluri</i>
<i>E. tarda</i>	: <i>Edwardsiella tarda</i>
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
<i>F. columnare</i>	: <i>Flavobacterium columnare</i>
<i>F. noatunensis</i>	: <i>Francisella noatunensis</i>
H-E	: Hematoksilen – Eozin
IL-1β	: İnterlökin 1beta
IL-8	: İnterlökin-8
im	: İntramusküler
ip	: İntraperitoneal
L	: Litre
<i>L. anguillarum</i>	: <i>Listonella anguillarum</i>
M	: Molar
<i>M. marinum</i>	: <i>Mycobacterium marinum</i>
ml	: Mililitre
n	: Gruptaki birey sayısı
nm	: Nanometre
<i>P. anguillimortiferum</i>	: <i>Paracolobactrum anguillimortiferum</i>
PBS	: Fosfat Buffer Solüsyonu

pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
<i>S. agalactiae</i>	: <i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. epidermidis</i>	: <i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. iniae</i>	: <i>Streptococcus iniae</i>
<i>S. pneumoniae</i>	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pyogenes</i>	: <i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. typhimurium</i>	: <i>Salmonella typhimurium</i>
TMS	: Tricaine Methane Sulfonate
TNF- α ,	: Tumor Nekrosis Faktör- alfa
TP53	: Tumor Baskılayıcı Gen53
TSA	: Triptik Soy Agar
TSB	: Triptik Soy Broth
<i>V. anguillarum</i>	: <i>Vibrio anguillarum</i>
x	: Çarpma işlemi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.	Deneme sonunda kontrol grubu balıkların makroskopik görünümü.....	16
Şekil 4.2.	10^4 CFU/ml İntraperiton grubu balıkların makroskopik görünümü.....	17
Şekil 4.3.	Deride solgunluk.....	18
Şekil 4.4.	Deney grubu-4, 10^7 CFU/ml immersiyon makroskopik görünümü.....	18
Şekil 4.5.	Deney grubu-5, 10^7 CFU/ml immersiyon bazı balıkların makroskopik görünümü.....	19
Şekil 4.6.	Solungaçlarda primer lamellerde mononükleer hücre infiltrasyonu ve kalınlaşma.....	20
Şekil 4.7.	Sinus venosum duvarında fokal mononükleer hücre infiltrasyonu.....	20
Şekil 4.8.	Karaciğerde vena sentraliste trombüs ve lenfosit infiltrasyonları sinuzoidlerde fokal lenfosit infiltrasyonlar ve hepatositlerde vakoulizasyon.....	21
Şekil 4.9.	Karaciğerde fokal koagülasyon nekrozu.....	21
Şekil 4.10.	Böbrek parankiminde kanama ile tubulus epitelinde dökülme ve hafif şiddette dejeneratif değişiklikler	22
Şekil 4.11.	Kas doku içerisinde fokal nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonu..	22
Şekil 4.12.	Deride kas doku içerisine doğru ülser ve fokal nekroz ile mononükleer hücre infiltrasyonları.....	23
Şekil 4.13.	Yaygın fibrinli peritonitis ve kas doku içerisine doğru mononükleer hücre infiltrasyonları.....	23
Şekil 4.14.	Bağırsak lümenlerinde bulutumsu görünümde gri-mavimtrak renkte bakteri kümeleri.....	24
Şekil 4.15.	Karaciğer yaygın konjezyon ve parankimde fokal kanama odakları.....	24

Şekil 4.16.	Yaygın fibrinli peritonitis ve karaciğere doğru yayılan mononükleer hücre infiltrasyonu.....	25
Şekil 4.17.	Böbrek parankiminde fokal kanama alanları.....	25
Şekil 4.18.	Kas dokuda yer yer kas demetlerinde hiyalin dejenerasyonu, nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonları.....	26
Şekil 4.19.	Yaygın fibrinli peritonitis ve mononükleer hücre infiltrasyonu.....	26
Şekil 4.20.	Bağırsak lümenlerinde bulutumsu görünümde gri-mavimtrak renkte bakteri kümeleri.....	27
Şekil 4.21.	Peritonda makrofaj sitoplazmalarında bakteriler.....	27
Şekil 4.22.	Karaciğerde hafif dereceli vakuolazisyon ve konjesyon.....	28
Şekil 4.23.	Kas demetleri arasında yaygın mononükleer hücre infiltrasyonları.....	28
Şekil 4.24.	Hafif derecede fibrinli peritonitis ve mononükleer hücre infiltrasyonları.....	29

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Teleost balıklarda başlıca patojen bakterilerin taksonomik sınıflandırılması.....	4
--	---

ZEBRA BALIKLARINDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN *EDWARDSIELLA TARDA* ENFEKSİYONU ÜZERİNE HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER

ÖZET

Bu araştırmada *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) ile deneysel enfeksiyon oluşturulan genç (bir aylık) zebra balıklarının organ ve dokularında oluşan histopatolojik değişiklikler histolojik teknik ve boyama yöntemleri kullanılarak ortaya konuldu. Bu amaçla, çalışmada, zebra balıklarına intraperitoneal (ip) enjeksiyon ve banyo şeklinde uygulanan eprüvasyon işlemi sonucunda balıklarda enfeksiyon oluşması sağlandı. Deneysel uygulamaya bağlı olarak balıkların organ ve dokularında şekillenen histopatolojik değişiklikler histolojik yöntem ve teknikler kullanılarak mikroskobik incelemeye hazır hale getirildi.

Mikroskobik değerlendirme ile ip enjeksiyon ve immersiyon şeklinde yapılan uygulama sonucunda balıkların organ ve dokularındaki histopatolojik lezyonlar ışık mikroskobunda değerlendirildi, fotoğraflanması yapıldı ve gözlenen mikroskobik bulgular kayıt altına alındı.

Mikroskobik incelemelerde 10^4 ve 10^5 (Colony Forming Units/mililitre) CFU/ml ip deneme gruplarında; peritonda fibrinöz yangı ile kanama, karaciğerde Şiddetli konjesyon, hepatositlerde vakuolizasyon, solungaçlarda primer lamellalarda yer yer mononükleer hücre infiltrasyonu ile pilar hücrelerde dejenerasyon, kas doku içerisinde yaygın veya fokal mononükleer hücre infiltrasyonları, kaslarda yaygın dejenerasyon ve nekroz ile kanama alanları gözlenen önemli değişikliklerdi. 10^6 ve 10^7 CFU/ml immersiyon gruplarında ise diğer gruplara göre daha hafif Şiddette karaciğerde konjesyon ve hepatositlerde vakuolizasyon, kaslarda dejenerasyon ve fokal nekroz alanları görüldü. Kontrol grubunda herhangi bir histopatolojik değişime rastlanılmadı.

Sonuç olarak bu çalışmada; oluşturulan deneysel *E. tarda* enfeksiyonu sonucu ip gruptaki zebra balıklarında daha Şiddetli lezyonlar şekillenirken immersiyon gruplarında daha hafif Şiddette ve daha az oranda lezyonlar oluşmuŐtur. Çalışma süresince balıklardan sadece bir tanesinde ölüm gözlenmiŐ ve deneme boyunca balıklarda gözlenen histopatolojik lezyonlara rağmen ölümlerin çok nadir olarak şekillenmesi, zebra balıklarının *E. tarda* enfeksiyonuna karşı oldukça dirençli oldukları kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Edwardsiella tarda*, zebra balığı, histopatoloji.

HISTOPATHOLOGICAL INVESTIGATIONS ON EXPERIMENTALLY *EDWARDSIELLA TARDA* INFECTION IN ZEBRAFISH

ABSTRACT

In this study, the histopathological changes in the organ and tissues of juvenile zebra fish (one month age) experimentally infected with *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) were shown by using histologic technic and staining methods. For this reason, as a result of epruvation which was applied to zebra fish as intraperitoneal (ip) injection and immersion method, the infection development in the fish was provided. The histopathologic changes which were formed in the organ and tissues of the zebra fish realted to the experimental applications were made ready by using histological methods and techniques.

As a result of ip injection and immersional applications via light microscopically evaluations, the lesions in the organs and tissues of the zebra fish were evaluated, were photographed and the observed microscopic findings were recorded.

In microscopic examinations, in 10^4 - 10^5 (Colony Forming Units/mililiter) CFU/ml ip experimental groups the following important findings were observed: hemorrhage and fibrinous inflammation in peritonea, severe congestion in liver, vacuolization of hepatocyte, locally mononuclear cell infiltration in gills and primer lamellas and degeneration in pillar cells, diffused or local mononuclear cell infiltrations in muscular tissue, diffused degeneration and necrosis and hemorrhage areas in the muscles. Compared with other groups, in the immersion groups of 10^6 - 10^7 CFU/ml, less severe congestion in livers, and vacuolization of hepatocytes, degeneration and focal necrosis areas in muscles were observed. In control group no histopathological changes were observed.

As a result, related to the experimental infection of *E. tarda* in zebra fish, much severe lesions were formed in ip injected group while the lesions of immersion group were less severe and slight. During the study, only the death of one of the zebra fishes was observed and throughout the experiment the rare amount of death despite the observed histopathological lesions in fishes shows that zebra fish is rather resistant to the infection of *E. tarda*.

Keywords: *Edwardsiella tarda*, zebrafish, histopathology.

1. GİRİŞ

Cyprinidae familyasına ait olan zebra balığı (*Danio rerio*) doğal yaşama ortamı Hindistan, Pakistan, Bangladeş ve Güneydoğu Himalayalar olan tropikal bir balıktır. Genellikle durgun, temiz ve bol oksijenli sularda yaşarlar. Lateral hatları boyunca 7-9 adet gümüş rengi ve mavi çizgiler vardır. Zebra balıkları su sıcaklığı bakımından geniş bir yelpazede 18-30 °C sıcaklık aralığında bir sorun olmadan hayatını sürdürebilmektedir. Üremeleri için ideal sıcaklık 26-28 °C'dir (Akbulut ve Yön 2012).

Gelişim biyolojisi çalışmalarında kullanılan ve önemli bir omurgalı modeli olan zebra balığı ile yapılan deneysel çalışmaların pek çok avantajı vardır. Bu organizmaları laboratuvar ortamında üretmek ve üretimlerini devam ettirmek kolaydır ve dikkate değer deneysel avantajlar sağlar. Küçük bir balık olması yer bakımından da avantaj sağlamaktadır (Sprangue et al. 2001). Ayrıca bu organizmaların üretimi de kolay ve ucuzdur. Bir zebra balığı her üreme döneminde 50 ile 300 arasında yumurta bırakır (Sprangue et al. 2001, Lieschke and Currie 2007). Yumurtalardan çıkan larvalar elverişli ortam şartlarında 3 ayda cinsel olgunluğa erişirler (Mills 1994; Lieschke and Currie 2007). Bu da bir defada birçok denek üzerinde çalışma imkânı sağlamaktadır (Sprangue et al. 2001). Döllendikten sonra hızlı bir şekilde gelişen embriyo şeffaf olduğundan gelişimin her aşamasını mikroskop altında görmek de mümkündür bu durum mutasyonların hızlı ve etkili bir şekilde tanınmasına olanak sağlamaktadır. (Sun et al. 2004).

Yapılan araştırmalarda teleost grubunda olan zebra balığı ile insan ve diğer omurgalıların genom yapılarının benzer olduğu, metabolizmalarının ve embriyonik gelişimlerinin hemen hemen aynı olduğu (Meeker and Trede 2008; Sullivan and Kim 2008), en önemlisi de insanlarda bulunan tümör baskılayıcı genin (TP53) zebra balığında da keşfedilmesi, bunlara ilaveten ksenobiyotik metabolizmanın faz I ve faz II enzim sistemi

bu balık türünde de bulunması, insan bağışıklık sistemlerinin de oldukça birbirine benzerliğinin görülmesi Traver et al. (2003), Lieschke and Trede (2009) ve ilaç tanımlama konusunda da umut vaat ettiği anlaşılmıştır (Annemarie and Herman 2011). Bu özelliklerinden dolayı zebra balığı, üzerinde çalışılması zor olan diğer türler hakkındaki biyolojik olayların araştırılması ve bilgi edinilmesi ile insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında mükemmel bir model organizma olarak kullanılmaktadır (Sprangue et al. 2001; Sun et al. 2004; Van der Sar et al. 2004).

E. tarda; Enterobacteriaceae familyasına ait, Edwardsiella cinsinde yer alan, gram-negatif, bir bakteri olup edwardsiellosisin etkenidir. Geniş coğrafik alanda su ürünleri yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara neden olan bir bakteridir (Whang et al. 2009; Mohanty and Sahoo 2007; Seong et al. 2012). İnsanlarda da enfeksiyon oluşturan enterik fırsatçı bir bakteridir (Spencer et al. 2008; Xiaohong et al. 2014).

E. tarda Antartika'da çok geniş bir coğrafik alanda rapor edilmiş Leotta et al. (2009), hayvanlardan bulaşan ve insanlar için de önemli bir zoonoz patojendir (Woo and Bruno 2010). Yapılan çalışmalarda, zebra balıklarının insanların fizyolojik işlevlerine yakın bir özellik gösterdiği aynı zamanda patojen mikroorganizmaların konakçısındaki etkilerinin ortaya konulması bakımından model oluşturduğu bildirilmektedir (Crawford et al. 2008; McGrath and Li 2008).

2.TANIM VE TARİHÇE

Patojen mikroorganizmalar insan ve hayvan sağlığında önemli bozukluklara neden olmaktadır. Patojen mikroorganizmaların kontrolü için geliştirilecek metotların başarılı olabilmesi için patojenin organizmada yapmış olduğu patolojik bozuklukların tam olarak açıklanmış olması gerekir (Buzea et al. 2007).

Çevredeki değişiklikler enfeksiyon hastalıkların oranını artırmaktadır. Enfektif organizmaların hangi mekanizmalar ile hastalıklara neden olduğu göz önünde bulundurulduğunda, birbirleriyle ilişkili iki yön gözlenmektedir. Bunlar; (1) Enfeksiyon oluşturan organizmaların spesifik özellikleri, (2) Vücudun enfeksiyon etkenlerine cevabıdır (Kumar et al. 2003).

Enfeksiyona karşı konak engelleri, mikropların vücuda girmesini ve dokulara yayılmasını önler. İlk engeller sağlam deri ve mukozal yüzeyler ile bu yüzeylerin oluşturduğu salgılardır. Bunlar çoğu enfeksiyonlara karşı çok güçlü savunmalardır. Yine de, bazı enfeksiyon ajanları bu engelleri aşma yeteneğine sahiptir (Kumar et al. 2003).

Bazı enfeksiyöz ajanları veya onların ürünleri direk olarak Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanmış kesitlerde incelenebilir. Organizmalar, bilhassa nekroz varsa, merkezden ziyade lezyonun ilerleyen kenar kısmında genellikle en iyi görüntülenirler (Kumar et al. 2003).

Bakteriyel hastalıklar hem doğal hem de kültür balıklarında yüksek mortalite ile seyretmektedir. Pek çok mikroorganizma, özellikle de fırsatçı patojen olanları stres faktörleri ya da diğer hastalık prosedürleri aracılığıyla konakçı balık dokusuna yerleşerek hastalığa duyarlılık oluşturabilir. Primer patojenlerin sebep olduğu hastalıklar aynı zamanda çoğunlukla stres aracıdır. Latent enfeksiyonlu olan fakat klinik olarak sağlıklı görünen balıklar genellikle belirti göstermezler ancak çevresel kondüsyonları farklı

olabilir. Bakterilerin çoğalması için uygun bir ortam olan, yüksek organik içerikli su, hızlı ısı değişimleri, aşırı kalabalık, travma ve taşıma balıklarda en yaygın klinik hastalık duyarlılığının oluşmasındaki çevresel stres faktörleridir. (Robert 1989).

Son yıllarda dünya genelinde hızlıca artan akua kültür, çeşitli bakteriyel hastalıkların ve bazı ciddi yeni enfeksiyöz hastalık tablolarının görülme sıklığını artırmaktadır. Yaklaşık 25 bakteriyel türe ait örnekler tatlı su ve tuzlu su balıklarında patojen olarak tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra bakteriyel gelişim ve sınıflandırma sistemlerinin idenfikasyon metotlarının güncellenmesiyle daha fazla sayıda bakteri türünün patojen etkiye sahip değişikliklerle seyrettiği gösterilmiştir. Kısaca balık patojenlerinin başlıcaları Gram-negatif kok ailesine ait olan Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae yada Vibrionaceae'dır. Tipik olarak septisemik ve ülseratif hastalık tablolarına neden olurlar (Inglis et al. 1993; Robert and Moeller 2012).

Gram-pozitif mikroorganizmalar birkaç asit-fast bakterilerinden oluşur ve daha nadiren çeşitli balık türlerinde kısmi kondüsyon kaybıyla seyredeler. Teleost grubu balıklar için patojen olan bazı bakterilerin taksonomik sınıflandırması Tablo 2.1'de gösterilmiştir (Robert 1989).

Tablo 2.1. Teleost balıklarda başlıca patojen bakterilerin taksonomik sınıflandırılması (Robert 1989)

Familya	Cinsi	Türü
Cytophagaceae (Gram-negatif kayıcı bakteriler)	Flexibacter	<i>F. colommaris</i> <i>F. Psychrophila</i> <i>F. maritimus</i> <i>Unclassified myxobacteria</i>
Enterobacteriaceae (Gram-negatif fakültatif anaerobik çubuksu bakteriler)	Edwardsiella Yersinia	<i>E. ictaluri</i> <i>E. tarda</i> <i>Y. ruckeri</i>
Pasteuraellaceae (Gram-negatif fakültatif anaerobik çubuksu bakteriler)	Pasteurella	<i>P. piscicida</i>
Pseudomonadaceae (Gram - negatif aerobik çubuksu bakteriler)	Pseudomonas	<i>P. fluorescens</i> <i>P. anguilliseptica</i>
Vibrionaceae (Gram-negatif fakültatif anerobik çubuksular)	Aeromonas Vibrio	<i>A. hydrophila</i> <i>A. salmonicida</i> (including <i>Hamemophilus piscium</i>) <i>V. anguillarum</i> <i>V. ordalli</i> <i>V. carchariae</i>

Tablo 1.1 (Devam): Teleost balıklarda başlıca patojen bakterilerin taksonomik sınıflandırılması (Robert 1989)

Familiya	Cinsi	Türü
Uncertain (Gram-negatif erobik Çubuksu bakteri)	Alteromonas Flovabacterium	<i>V. damsela</i> <i>V. vulnificus</i> biogroup 2 <i>A. piscicida</i> <i>Flovabacterium</i> spp.
Bacillaceae (Gram-pozitif sporlu basiller)	Clostridium	<i>Cl. botulinum</i>
Coryneform group (Gram-pozitif pleomorfik çubuksular)	Renibacterium	<i>R. salmoninarum</i>
Streptococcaceae (Gram-pozitif kok)	Streptococcus	<i>S. faecalis</i> Group B streptococcus and haemolytic ungrouped streptococci
Mycobacteriaceae (Asit-alkol dirençli basil)	Mycobacterium	<i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. marinum</i>
Nocardiaceae (Aside direnci zayıf Gram-pozitif dallı basil)	Nocardia	<i>N. asteroides</i> <i>N. kampachi</i>
Chtamydiaceae (Zorunlu intrasellüler parazitler)		Epitheliocystis organism

Edwardsiella cinsi mikroorganizmalarla insanda enfeksiyon gelişimi oldukça nadirdir ve çoğu enfeksiyon *E. tarda* ile oluşmaktadır (Hasanoğlu vd 2001). Çeşitli patojen mikroorganizmalar ile zebra balıkları arasındaki ilişki incelendiğinde birçok araştırmalara rastlanılmaktadır. Neely et al. (2002), *Streptococcus iniae* (*S. iniae*) ve *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) bakterilerini zebra balıklarına ip ve intramusküler (im) enjeksiyon yolu ile uygulayarak Streptococcal enfeksiyonlar için model oluşturmuşlardır. Davis et al. (2002), *Mycobacterium marinum* (*M. marinum*) ile tüberküloz için modelleme çalışması yapmışlar ve granuloma benzeri oluşumları histolojik olarak göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada Van der Sar et al. (2003) *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) ile infekte zebra balıklarında bu bakterinin izlenmesinde kullanılan kırmızı fluoresan protein (DsRed) salınımının nasıl gerçekleştiği gösterilmiştir.

Özellikle son yıllarda zebra balığı kullanarak patojen mikroorganizmaların meydana getirebileceği olumsuzlukların incelendiği çalışma sayısı hızla artmıştır. Bunlardan *Vibrio anguillarum* (*V. anguillarum*) Zhang et al. (2013), *Streptococcus pneumoniae* (*S.*

pneumoniae) Rounioja et al. (2011), *Citrobacter freundii* (*C. freundii*) Lu et al. (2011), *Flavobacterium columnare* (*F.columnare*) Olivares-Fuster et al. (2011); *Listonella anguillarum* (*L. anguillarum*) Huang et al. (2011), *Francisella noatunensis* (*F. noatunensis*) Vojtech et al. (2012), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) Patterson et al. (2012), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) Vojtech et al. (2012) ve *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) Lu et al. (2014) bakterileri ile zebra balığı arasındaki ilişki incelenmiştir.

2.1. Etiyoloji

Enterobacteriaceae'lar düz kok (1,0 x 2,0-3,0 µm) boyutlarında hareketli ya da hareketsiz flagellaya sahip, *Edwardsiella ictaluri*'ye (*E. ictaluri*) benzemeyen 25 ve 37 °C arasındaki sıcaklıklarda motil olan gram-negatif bakterilerin geniş ve doğal bir gurubudur. Oksidaz negatif, fakültatif aneorobik solunum ve fermantatif metabolizma tipine sahip olan bakterilerdir. *E. tarda*, Hoshina (1962) yılında tarafından Japonya'da ilk kez yılan balıklarından izole edilmiş bir patojendir ve *Paracolobactrum anguillimortiferum* (*P. anguillimortiferum*) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraki araştırmalarda Wakabayashi and Egusa (1973) ve Robert (1989) tarafından *E. tarda* olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda bu patojen Amerika'da kanal kedi balıklarında Meyer and Bullock (1973) tarafından da identifiye edilmiştir.

E. tarda Amerika'da kedi balıklarının ve Japonya'da yılan balıklarının önemli bir patojenidir. Ayrıca kefallerde, kültür çipurasında ve tilapialarda epidemilerle birlikte seyretmektedir (Robert 1989). *E. tarda* omurgasız hayvanlarda, amfibilerde Wyatt et al (1979), sürüngenlerde Sakazaki (1965), Iveson (1971) sığırlarda, domuzlarda, köpeklerde izole edilmiştir (Ewing et al. 1965; Tacal and Menez 1969; Van Damme and Vandepitte 1984).

E. tarda sıklıkla organik yönde kirli olan sularda bulunur. Doğal rezarvuarını hayvanların bağırsakları oluşturmaktadır ve evcil hayvanlardan, ratlarda, kuşlarda, kaplumbağalarda izole edilebilir. Ayrıca sağlıklı balıklardan da izole edilmiştir (Robert 1989).

Enterobacteriaceae familyasına ait *Edwardsiella* cinsinde yer alan gram-negatif, bazıları peritrik flagella ile aktif hareketli, sporsuz ve kısa çomakçıklar biçiminde bir bakteri olan *E. tarda* özellikle ılık sulara yaşayan çeşitli balık türlerinde septisemilere yol açan aerob veya fakültatif anaerob bir bakteridir (Mohanty and Sahoo 2007; Seong et al. 2012).

Yapılan iki farklı çalışmada gram-negatif bir bakteri olan *E. tarda* kullanılarak, immersiyon yöntemiyle bir günlük zebra balığı embriyolarında bakteriyel enfeksiyon oluşturulmuş, bu durum birçok balık türünde de gözlenen genel septisemik karakterler ile seyreden edwardsiellose sebep olmuştur (Pressley et al. 2005; Phelan et al. 2005).

2.2. Deneysel Olarak *Edwardsiella tarda* Enfeksiyon Oluşturma Yolları

Çeşitli patojen mikroorganizmalar ile zebra balıkları arasındaki ilişkinin incelendiği araştırmalara rastlanılmaktadır.

Bir araştırmada; 5 saat süre boyunca *E.tarda* ile immersiyona maruz bırakılmış zebra balığı embriyolarında, kümülatif mortalitenin kontrol grubu balıklarına göre %31 oranında arttığı tespit edilmiştir. Aynı bakteri ile 2 ve 4 saat maruz bırakılmaları durumunda ise tümör nekrozis faktör (TNF) ve interlökin 1 β (IL-1 β) salınımında artışların olduğu bildirilmiştir. Yetişkin zebra balıklarında ise *E. tarda*'nın, dermal abrazyon ile enfeksiyon oluşturabileceği gösterilmiştir (Crawford et al. 2008; McGrath and Li 2008).

Ayrıca zebra balığı embriyoları, bakteriyel enfeksiyonlara yanıtta, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), IL-1 β ve interlökin-8 (IL-8) gibi sitokinler ve kemokinlerin salınımıyla korunduğu ortaya konmuştur (Pressley et al. 2005; Stockhammer et al. 2009; Veneman and Stockhammer 2013).

2.3. *Edwardsiella tarda*'nın Patogenezisi

Bakteriler konakçının dışında başka gölet, su ve çamur içinde yaşama yeteneğine sahiptirler. Bakterilerde su sıcaklığına ve sudaki organik madde oranına bağlı olarak artış gözlenir. Memeliler, kuşlar, sürüngenler amfibilerin gibi organizmalar ve sucul

omurgasızlar taşıyıcı durumdadır. Bakteriler olumsuz koşullarda canlı kalabilmektedirler (Du et al. 2007).

Gram-negatif, çomak şeklinde ve peritrik tip flegellaya sahip *Edwardsiella* türü bakteriler; hasta balıkların iç organlarında, bağırsaklarda ve beyinde izole edilmiştir (Timur ve Timur 2003; Hekimoğlu 2009).

Patojenlerin patojenitesini anlamak için virülens faktörün idenfikasyonu ve karakterizasyonu bilmek gerekir (Whatson and White 1979; Janda and Abbott 1993; Chen et al. 1996). *E. tarda* bakterisinin patogenesisi çok faktörlü olduğundan bu bakterinin patojenitesi hala tam olarak anlaşılammıştır (Seong et al. 2012). *E. tarda* organizmanın bağırsakları ve aşınmış deri yüzeyi bilinen penetrasyon alanlarıdır. *E. tarda* uygun epitel hücrelerine nüfuz edebildiği çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Janda et al. 1991; Strauss et al. 1997; Ling et al. 2000).

Hastalık yapan bazı potansiyel faktörler diğer bazı bakterilerde oluşu gibi *E. tarda* da hücre yapışması faktörleri ve hücre içi istilası aktivitesi olarak iki tipte tarif edilmiştir (Whatson and White 1979; Janda and Abbott 1993; Chen et al. 1996).

E. tarda ile zebra balıklarının embriyo ve erginlerinde hastalıkla ilişkili immun cevap ve patolojisi Pressley et al. (2005) koruyucu amaçlı aşı araştırmaları Seong et al. (2012) ve mikrobiyolojik olarak etkenin moleküler identifikasyonu Ibrahim et al. (2011) ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

2.4. *Edwardsiella tarda* Enfeksiyonundaki Makroskobik Bulgular

E. tarda'nın neden olduğu hastalığın başlıca bulguları, kas dokuya kadar ilerleyebilen küçük deri lezyonları ile hızlı gelişen progresif fibrinli peritonitis ve böbrek ve karaciğer dokusunun nekrozudur. Kuyruk sapı ve lateral bölgedeki kas doku içinde apseler gelişir. Apseler büyüdükçe oluşan büyük boşluklar çok kötü kokan gaz ile dolar (Schlotfeldt et al. 1995; Hekimoğlu 2009). Kötü kokulu hava kabarcıkları sıklıkla karaciğer ve böbreğin yapısı içerisinde fibrinöz eksudat ile çevrili bir biçimde bulunur. Histolojik olarak

lezyonlar hemopoiyetik dokuda, karaciğer parankiminde, karın duvarını perfore edecek kadar ilerleyebilen fokal nekrozlarla karakterizedir (Robert 1989; Schlotfeldt et al. 1995).

Edwardsillois ile şiddetli enfeksiyon durumlarında balıklar, burgu şeklinde yada dairesel hareketler ile yüzmekte yada su yüzeyinde hareketsizlik gözlenir. Mayer and Bullock (1973), Miyazaki and Kaige (1985), Hekimoğlu (2009) ağız ve operkulum çevresinde kızarıklar, anemiye bağlı olarak oksijen yetersizliği gelişir. Balığın cildinde erozyon (pigmentasyon kaybı) Miyazaki and Kaige (1985) ve aşırı mukus salgılama, soluk solungaçlar, gözlerde şeffaflığın kaybolması, ayrıca ülser gibi büyük lezyonlar görülebilir. Karın yüzeyinde şişme ve anüs bölgesinde kızarıklık ve yüzgeçlerde ve ciltte peteşiyal kanama önemli bulgulardır. Perakut durumlarda çoğunlukla karın bölgesinde iç yüzeyinde, böbrek, dalakta kanlı asites, karaciğerde tıkanmalar görülür (Tacal and Menez 1969; Mayer and Bullock 1973; Miyazaki and Kaige 1985; Patros et al. 2006).

Enfekte zebra balığı embriyolarında göğüs ve kuyruk yüzgeçlerinde epidermal tabakada tomurcuk şeklinde şişlikler ile sinir ve kas dokuda bozulma gözlenmektedir (Pressley et al. 2005).

Solungaçlarda küçük beyaz nodüller bulunabilir. Deride enfekte bölgede pigment oluşumu durur. Dışarı çıkık hemorajik (prolapseli) anüs ve gözlerde opaklaşma, dışa doğru çıkık gözler (eksoftalmus) oluşabilir (Bruno et al. 1995; Hekimoğlu 2009).

2.5. *Edwardsiella tarda* Enfeksiyonunda Gözlenen Histopatolojik Bulgular

Edwardsiellosis, histopatolojik olarak intersitisyel nefritis, irin oluşması ve irinli karaciğer ve dalak iltihabı karakteristiktir (Miyazaki and Egusa 1976; Miyazaki and Kaige 1985). Çeşitli çaplarda apseler ve bakteri kolonileri, nötrofil infiltrasyonu, karaciğer, dalak ve böbreklerde makrofajlar gözlenmektedir (Miyazaki and Kaige 1985).

Zebra balığı embriyolarında göğüs yüzgeci ve kuyruk bölümlerinde epidermal tabakanın proliferasyonu ve şişlik, ayrıca enfekte embriyolarda şiddetli sinir ve kas dokusunda dejenerasyon gözlenmiştir (Pressley et al. 2005).

Enfekte embriyoların kan damarlarında bakteri içeren çok sayıda inflamatuvar hücreler ile sepsisemi tablosu tespit edilmiştir (Pressley et al. 2005).

2.6. *Edwardsiella tarda* Enfeksiyonunda Teşhis Tedavi ve Korunma Yolları

Hastalığın tipik semptomları olmasına rağmen kesin tanı için bakterinin izolasyonu ve identifikasyonu gereklidir. TSA (Triptik Soy Agar) veya BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ortamlarında 35 °C de iyi büyür. 25 °C de 2-4 gün sonra küçük kahverengi şeffaf koloniler oluşur. Antibiyogram ile yaklaşık 1 haftalık tanı süresi olmalıdır. Ancak mortalite çok yüksek değildir (%5). Eğer hızlı sonuç istenirse ELISA gibi testlere başvurulabilir (Cengizler 2006).

Hastalığın nasıl taşındığı kesin olarak bilinmemektedir. Etken, havuzlarda, suda ve çamurda yaygın olarak bulunmaktadır. Ayrıca balığın yüzeyinde de normal flora içerisinde yer alır, ancak balıkları enfekte etmez. Çünkü *E. tarda* fırsatçı bir bakteridir (Xiaohong et al. 2014). Bu nedenle yoğun stok oranından ve stresten kaçınmalı, su kalitesi uygun olmalı, havuzların temizliğine dikkat edilmelidir. Henüz bilinen ticari bir aşısı yoktur. Yapılan araştırmalarda sazanlarda glukon verilmesi direnci biraz arttırmıştır (Cengizler 2006).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney Hayvanı

Çalışmada, ticari bir işletmeden temin edilen 100 adet 1 aylık doğal tip (wildtype) "*Danio rerio*" ırkı (erkek ve dişi) zebra balığı kullanıldı. Çalışma süresince balıklar 10x20x40 cm (enxboyxyükseklik) boyutlarında polietilen karbon akvaryumlara ve her grupta 20 balık (n=20) olacak şekilde bırakıldı. Deney ve kontrol grubu balıklar ticari akvaryum balık yemi ile beslenildi.

3.2. Deneysel Ortam

Çalışmanın deneysel aşaması Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Patoloji Laboratuvarı'nda akvaryum düzeneği kurulan çalışma ortamında yapıldı. Zebra balığı ile yapılacak deneyler için polietilen karbon akvaryumlar kuruldu. Akvaryumlardaki suyun sıcaklığı 28 ± 1 °C' olacak şekilde sabitlendi ve sürekli hava motorları ile oksijenlendirildi. Yemleme günde 2-3 kez yapıldı. Akvaryumun bulunduğu ortam fotoperiyodu sağlamak için 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde ışıklandırıldı. Ortamın sıcaklık, hidrojen iyon konsantrasyonu (pH) ve oksijen düzeyleri izlenerek kontrol altında tutuldu (Hallare et al. 2004).

3.3. Beslenme

Çalışmada balıklar, ticari tropikal pul balık yemi (Sera Vipan Large Flakes 500 ml) ile deneysel süreç boyunca günde iki kez beslendi ve balıkların yem alımı tamamlandıktan sonra, artan yemler bir balık kepçesi vasıtasıyla toplandı (Şahin 1999; Hekimoğlu 2009). Balıkların her türlü bakım, temizlik ve besleme işlemleri düzenli şekilde yapıldı.

3.4. Referans Suş ve Kültür Şartları

Zebra balıklarında deneysel enfeksiyon oluşturmak amacı ile *E. tarda* ATCC (American Type Culture Collection) 23704 referans suşu kullanıldı. Referans *E. tarda* suşu, triptik soy broth (TSB) (MERCK, 1.05459) ve TSA (MERCK, 1.05458) besi yerlerine ekildi ve 30 °C sıcaklıkta 24 saat süreyle inkubasyona bırakılarak çoğaltıldı. *E. tarda* suşunun 10^7 CFU/ml'lik dozu spektrofotometre cihazı kullanılarak 600 nanometre (nm) absorbans değerinde ölçülerek hesaplandı. Çalışmada kullanılan diğer doz oranları, 10^7 CFU/ml'lik dozun 1/10 oranında fizyolojik tuzlu su ile sulandırılmasıyla elde edildi.

Çalışmada kullanılan *E. tarda* bakterisinin enjeksiyon ve banyo dozları Pressley et al. (2005) zebra balıklarında uygulamış oldukları dozlar referans alınarak belirlendi.

3.5. Çalışma Takvimi ve Deneysel Gruplandırma

Çalışmada 21 gün boyunca her grupta 20 adet 1 aylık doğal tip "*Danio rerio*" ırkı (erkek ve dişi) olmak üzere toplamda 100 adet zebra balığı kullanıldı. Bu balıklar rastgele her grupta yirmişer balık olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Oluşturulan 5 çalışma grubu ve balıklara yapılan uygulamalar aşağıdaki şekilde belirlendi.

3.5.1. Grup 1 (Kontrol grubu)

Bu gruptaki balıklara tricaine anestezisi altında iken 0. günde 0,1 M steril fosfat buffer solüsyonu (PBS), (P5244, SIGMA, German) ip olarak insülin enjektörü yardımıyla 0,1 ml dozda uygulandı.

3.5.2. Grup 2 (Deney grubu- 10^4 CFU/ml Intraperitoneal)

Bu gruptaki balıklara, kontrol grubunda olduğu gibi tricaine anestezisi altında iken 0. günde 0,1 ml 10^4 CFU/ml dozda *E. tarda* içeren solüsyon ip olarak 28,5 numaralı insülin enjektörü yardımıyla uygulandı.

3.5.3. Grup 3 (Deney grubu-10⁵ CFU/ml İntraperitoneal)

Bu gruptaki balıklara da kontrol grubu ve deney grubu-10⁴ CFU/ml İntraperitoneal olduğu gibi tricaine anestezisi altında iken 0. günde 0,1 ml 10⁵ CFU/ml dozda *E. tarda* içeren solüsyon ip olarak 28,5 numaralı insülin enjektörü yardımıyla uygulandı.

3.5.4. Grup 4 (Deney grubu-10⁶ CFU/ml İmmersiyon)

Bu gruptaki balıklar, 0. günde 10⁶ CFU/ml dozda *E. tarda* içeren 1 litrelik (L) plastik bir kap içerisine konularak, statik immersiyon yöntemi ile 5 saat boyunca bekletildi.

3.5.5. Grup 5 (Deney grubu - 10⁷ CFU/ml İmmersiyon)

Bu gruptaki balıklar da deney grubu-10⁶ CFU/ml immersiyonda olduğu gibi 0. günde 10⁷ CFU/ml dozda *E. tarda* içeren 1 L'lik plastik bir kap içerisine konularak, statik immersiyon yöntemi ile 5 saat boyunca bekletildi.

Bakterilerin enjeksiyon ve banyo tarzında uygulamasından sonra akvaryumlarına alınan balıklar 21 gün boyunca takip edildi ve klinik bulgular kayıt altına alındı. Deneme süresince veya deneme sonunda ölen tüm balıkların makroskopik muayeneleri ve sistemik nekropsileri yapıldı. Nekropsi sonrası balıklar tespit işlemi için %10'luk tamponlu formalin salin solüsyonu içerisinde tutuldu. Tespit işlemi tamamlanan balık dokularına rutin doku takibi işlemi uygulandıktan sonra parafin bloklar hazırlandı.

3.6. Anestezi, Ötenazi, Nekropsi ve Doku Örneklerinin Toplanması

Uygulamaları takiben 21. günün sonunda tüm balıklardan rahat ve ağrısız bir şekilde doku örneklerinin alınabilmesi amacıyla, öncelikle balıklara TMS olarak bilinen tricaine methane sulfonate, Tricaine-S[®] (Western Chemical, Inc., Ferndale, U.S.A) 0,168 mg/ml dozda uygulanarak balıkların anestezileri sağlandı. Bu amaçla balıklar 1 L'lik plastik kaplara alınarak immersiyon yöntemiyle anestezi altına alındı. Balıklar henüz anestezi altında iken formaldehit ile ötenazi edilerek nekropsileri yapıldı. Nekropside tüm hayvanların sol karın duvarı bir makas yardımıyla pektoral yüzgeçten başlayarak galsama

kapağına kadar kesilerek tüm iç organların makroskobik görüntülenmesi ve sistemik incelenmesi yapılarak, balıklar bütün halinde %10'luk tamponlu formaldehit içerisinde konuldu.

3.7. Doku Örneklerinin İşlenmesi

Alınan dokular % 10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. 48 saatlik tespit işlemini takiben, değişik derecelerde (%70, 80, 90, 100) alkol, ksilol ve parafin serisi içeren ototeknikon cihazına (TP 1020, Leica, German) alındı. Granüllü parafinle bloklanan dokular mikrotom ile (RM 2155, Leica, German) 5 mikrometre (μm) kalınlığında kesildi. Balık dokuları histopatolojik açıdan değerlendirilmek üzere, H-E ile boyandı. Boyanan dokular, görüntüleme sistemli, binoküler stereo ışık mikroskopunda (DM 2500, Leica, German) değerlendirildi.

3.8. Hematoksilen-Eosin Boyama Protokolü

1. Hazırlanan kesitler deparafinizasyon işlemi için ksilollere alındı (3x3 dakika)
2. Hidrasyon işlemi için kesitler dereceli alkollerden geçirilerek distile suya alındı (4x3 dakika).
3. Harris Hematoksilen solüsyonunda 10 dakika bekletildikten sonra 5 dakika akarsuda yıkandı.
4. Fazla boyanın alınması için asit alkolden geçirilen kesitler amonyaklı suya alındı.
5. Eosinde 1 dakika bekletilen kesitler akarsuda 2 dakika yıkandı. Dereceli alkollere alınan kesitler (4x3 dakika) kurutularak daha sonra ksilollere alındı (3x3 dakika).
6. Boyanmış olan preparatlar entellan® ve lamelle kapatıldı (Mayer 1896; Lillie 1965; Lynch et al. 1969).

3.9. Preparatların İncelenmesi

H-E ile boyanmış preparatlar görüntüleme sistemli, binoküler stereo ışık mikroskopunda (DM 2500, Leica, German) iki kişi tarafından değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

4.1.1. Grup 1 (Kontrol grubu)

0. Günde 0,1 molarlık (M) PBS, (P5244, SIGMA, German) ip olarak insülin enjektörü yardımıyla 0,1 ml dozda uygulanan bu gruptaki balıklarda herhangi bir klinik bulguya rastlanılmadı.

4.1.2. Grup 2 (Deney grubu-10⁴ CFU/ml Intraperitoneal)

Anestezi altında iken ip olarak 28,5 numaralı insülin enjektörü yardımıyla 0,1 ml dozda *E. tarda* içeren solüsyon uygulanan bu gruptaki balıklarda, enjeksiyon uygulamasının ilk 12. saatinde hiçbir değişiklik gözlemlenmez iken, 24. saatten itibaren bireylerde iştahsızlık ve yüzmede durgunluk gözlemlendi. Bu durumun bazı bireylerde 48. saatten sonra normale döndüğü görülürken, bazı bireylerde ise dışkı uzaması görüldü. Bu gruptaki balıklarda ölüm gözlenmedi.

4.1.3. Grup 3 (Deney grubu-10⁵ CFU/ml Intraperitoneal)

Anestezi altında iken ip olarak 28,5 numaralı insülin enjektörü yardımıyla 0,1 ml dozda *E. tarda* içeren solüsyon uygulanan bu gruptaki balıklarda, uygulamanın 12. saatinden sonra bazı bireylerde durgunluk, akvaryum tabanında tek başına yüzme hareketi gözlemlendi. Uygulamanın 24. saatinden sonra bireysel ve normalden daha hızlı yüzme hareketleri ve yeme karşı ilgisizlik gözlenirken, 36. saatten sonra düzensiz ve bireysel yüzme hareketi ve durgunluğun devam ettiği görüldü ve dışkının kopmaması ile karakterize dışkı uzaması görüldü. Uygulamanın sonlarına doğru dışkı uzaması görülen birey sayısında azalma tespit edildi. Bu gruptaki balıklardan bir tanesi uygulamanın 12. gününde öldü.

4.1.4. Grup 4 (Deney grubu- 10^6 CFU/ml İmmersiyon)

0. günde 10^6 CFU/ml dozda *E. tarda* içeren 1 L'lik plastik bir kap içerisine konularak, statik immersiyon yöntemi ile 5 saat boyunca bekletilen bu gruptaki balıklarda, 5 saat boyunca herhangi bir klinik değişim gözlenmedi. Uygulamanın 12. saatinden sonra bireysel ve düzensiz yüzme hareketi ile yeme karşı ilginin azaldığı, 24. saatten sonra ise normal yüzme hareketleri ve yeme karşı ilgilerin normale döndüğü izlendi. Uygulama süresince bireylerde ölüm gerçekleşmedi.

4.1.5. Grup 5 (Deney grubu- 10^7 CFU/ml İmmersiyon)

0. Günde 10^7 CFU/ml dozda *E. tarda* içeren 1 L'lik plastik bir kap içerisine konularak, statik immersiyon yöntemi ile 5 saat boyunca bekletilen bu gruptaki balıklarda, 5 saat boyunca herhangi bir klinik bulguya rastlanmadı. Bu gruptaki bireylerin bazılarında uygulamanın 24. saatinden sonra durgunluk ve iştahsızlık gözlenirken, 48. saatten sonra bireylerde, bu davranışların normale döndüğü görüldü.

4.2. Makroskobik Bulgular

4.2.1. Grup 1 (Kontrol grubu)

0. Günde 0,1 M'lık PBS, (P5244, SIGMA, German) ip olarak insülin enjektörü yardımıyla 0,1 ml dozda uygulanan bu gruptaki balıklarda herhangi bir makroskobik bulguya rastlanılmadı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Deneme sonunda kontrol grubu balıkların makroskobik görünümü

4.2.2. Grup 2 (Deney grubu- 10^4 CFU/ml İntraperitoneal)

Bu gruptaki balıkların nekropsileri esnasında karın boşluğu açıldığında enjeksiyon yapılan alanda, peritonda hafif kalınlaşmanın olduğu ve karın duvarı ile periton arasında hafif yapışmalar görüldü. Balıkların tümünün karaciğerlerinin rölatif olarak hafifçe büyüdüğü ve koyu kırmızı renkli alanların varlığı dikkati çekti. Böbreklerde, yer yer koyu kırmızı renkli fokal odaklar gözlemlendi. Bazı balıkların bağırsak duvarlarında, serozaya yakın olarak yer yer peteşiyal kanamalara rastlandı.



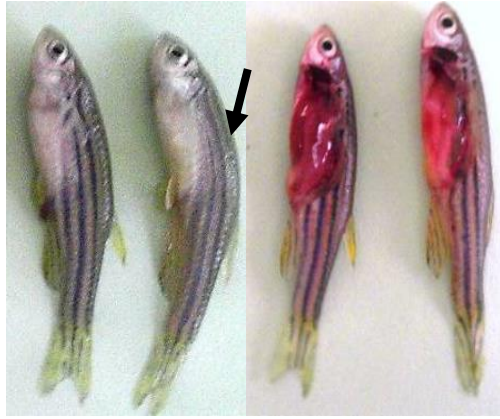
Şekil 4.2. 10^4 CFU/ml İntraperiton grubu balıkların makroskopik görünümü

4.2.3. Grup 3 (Deney grubu- 10^5 CFU/ml İntraperitoneal)

Bu gruptaki balıkların nekropsileri esnasında karın boşluğu açıldığında enjeksiyon yapılan alanda, peritonda yaygın kalınlaşmalar ile karın duvarı ve periton arasında fibrinli tarzda yapışmaların olduğu görüldü. Bir balıkta karaciğere kadar uzanan bir alanda fibrinli peritonitis tablosu hakimdi. Yangısal reaksiyonun karaciğerin kenar kısımlarını da kapsayacak şekilde karın boşluğu ve hava kesesi duvarı ile bağlantılı olduğu tespit gözlemlendi. Diğer balıkların nekropsisinde peritonda değişen derecelerde peteşiyel kanamalar vardı. Bazı bireylerde ise deride solgunluk (pigmentasyon eksikliği) tespit edildi (Şekil 4.3). Bu gruptaki balıkların karaciğerlerinin rölatif olarak hafifçe büyüdüğü ve koyu kırmızı renkli alanların mevcudiyeti tespit edildi. Böbreklerde, yer yer koyu kırmızı renkli odaklar olduğu gözlemlendi. Bu gruptaki 5 balığın bağırsak duvarlarında,

serozaya yakın olarak az miktarda peteşiyal kanamalara rastlandı. Bir balıkta ise böbrekte yaygın kanama alanlarına rastlandı.

Uygulamanın 12. gününde bu grupta ölen balığın yapılan nekropsisi sonucunda, enjeksiyon yapılan bölgede, pektoral yüzgeçlerin kaidelerinde ve iç organlarda hemorajilere rastlandı.



Şekil 4.3. Deride solgunluk (Ok)

4.2.4. Grup 4 (Deney grubu- 10^6 CFU/ml İmmersiyon)

Bu gruptaki balıklarda herhangi bir makroskobik bulguya rastlanılmadı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Deney grubu-4, 10^7 CFU/ml immersiyon makroskobik görünümü

4.2.5. Grup 5 (Deney grubu- 10^7 CFU/ml İmmersiyon)

Bu gruptaki balıklarda herhangi bir makroskobik bulguya rastlanılmadı.



Şekil 4.5. Deney grubu-5, 10^7 CFU/ml immersiyon bazı balıkların makroskobik görünümü

4.3. Mikroskobik Bulgular

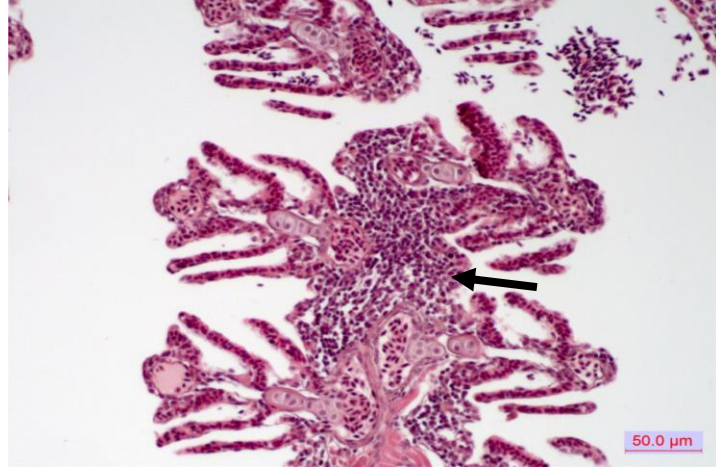
4.3.1. Grup 1 (Kontrol grubu)

Bu gruptaki balıklarda yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda herhangi bir mikroskobik bulguya rastlanılmadı.

4.3.2. Grup 2 (Deney grubu- 10^4 CFU/ml İntraperitoneal)

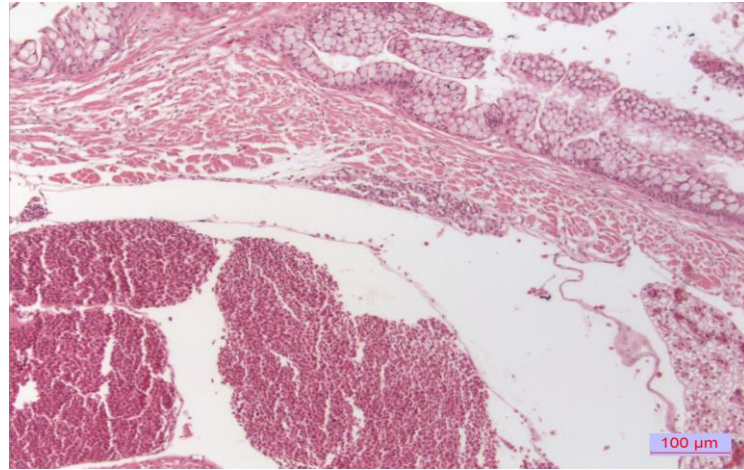
Çalışmanın 21. günün sonunda tüm gruplardaki balıklar TMS[®] ile anestezi edildikten sonra ötenazi edildi ve nekropsileri yapıldı. Bu balıkların makroskobik bulguları değerlendirildikten sonra doku ve organ parçaları alınarak rutin histolojik teknikler kullanılarak organ ve dokulardan hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu altında histopatolojik olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmeler sonucunda 10^4 CFU/ml ip grubunda balıkların solungaç dokularında primer lamellerde mononükleer hücre infiltrasyonu ile kalınlaştığı, damarların ileri derecede konjesyone olduğu görüldü.

Ayrıca yer yer sekonder lamellerde mononükleer infiltrasyonun bulunduğu alanlarda pilar hücrelerde dejenerasyon ve nekrozlar görüldü (Şekil 4.6).



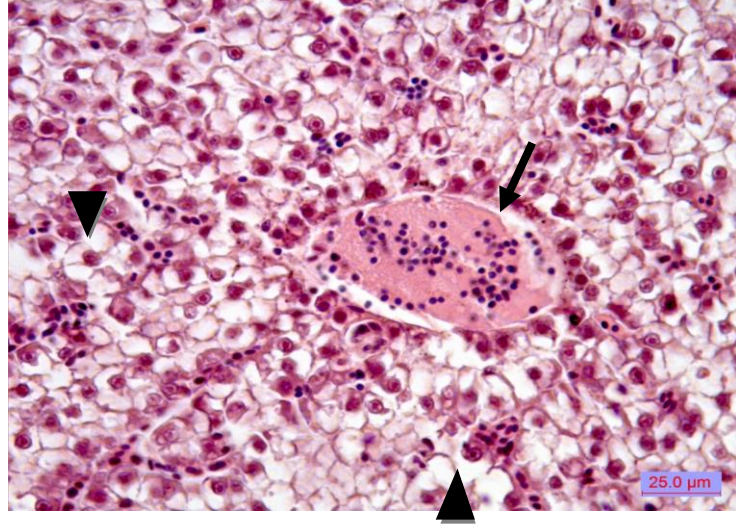
Şekil 4.6. Solungaçlarda primer lamellerde mononükleer hücre infiltrasyonu ve kalınlaşma (Ok) H-E x1000

Kalp dokusunun histopatolojik incelemesinde iki balıkta sinus venosum duvarında fokal mononükleer hücre infiltrasyonu saptandı (Şekil 4.7).



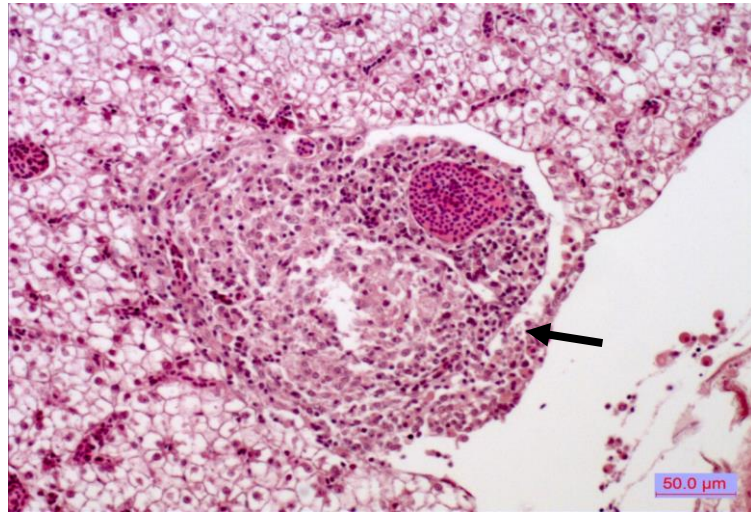
Şekil 4.7. Sinus venosum duvarında fokal mononükleer hücre infiltrasyonu H-E x 200

Bu gruptaki balıkların karaciğer parankim dokusunda venasentraliste trombüs ve damar lümeni ve sinuzoidlerde fokal lenfosit infiltrasyonları ile hepatositlerde ileri derecede vakuolizasyon dikkati çekti (Şekil 4.8).



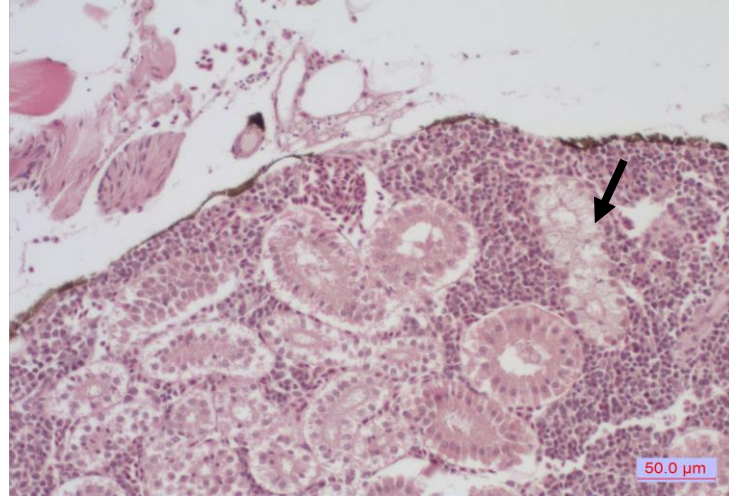
Şekil 4.8. Karaciğerde vena sentraliste trombüs ve lenfosit infiltrasyonları (Ok), sinuzoidlerde fokal lenfosit infiltrasyon ve hepatositlerde vakoulizasyon (Okbaşı) H-E x2400

Bununla birlikte bir balıkta karaciğerde konjesyon, hepatositlerde vakuolizasyon ile fokal koagülasyon nekrozu görüldü (Şekil 4.9).



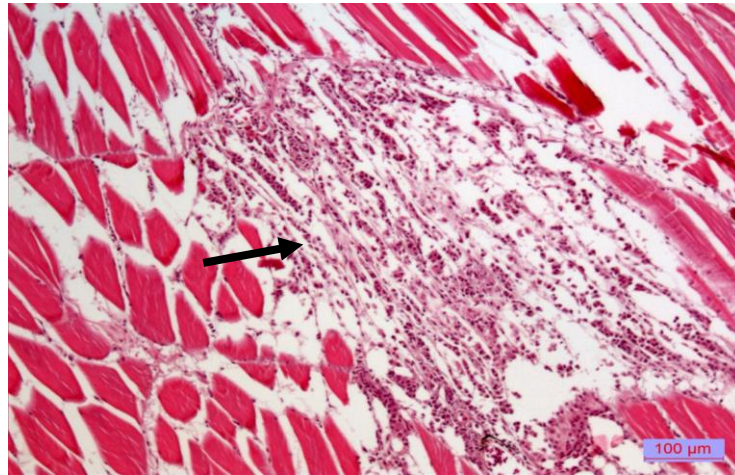
Şekil 4.9. Karaciğerde fokal koagülasyon nekrozu (Ok) H-E x1000

Bu gruptaki balıkların böbrek parankiminde kanama odakları ile tubulus epitelinde dökülme ve hafif derecede dejeneratif değişiklikler tespit edildi (Şekil 4.10).



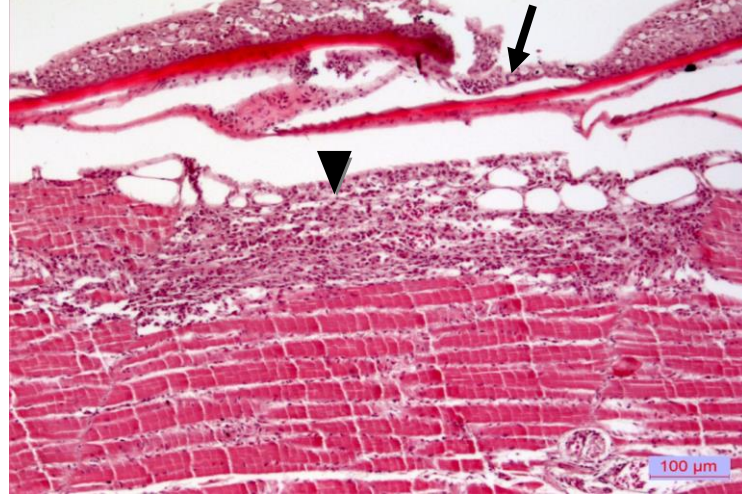
Şekil 4.10. Böbrek parankiminde kanama ile tubulus epitelinde dökülme ve hafif şiddette dejeneratif değişiklikler (Ok) H-E x1000

Histopatolojik olarak önemli değişiklikler bu gruptaki balıkların kas dokusunda gözlemlendi. Özellikle kas dokusunda kas demetleri arasında fokal mononükleer hücre infiltrasyonu, fokal dejeneratif ve nekrotik değişiklikler ile yaygın kanamalar dikkati çeken önemli bulgulardı (Şekil 4.11).



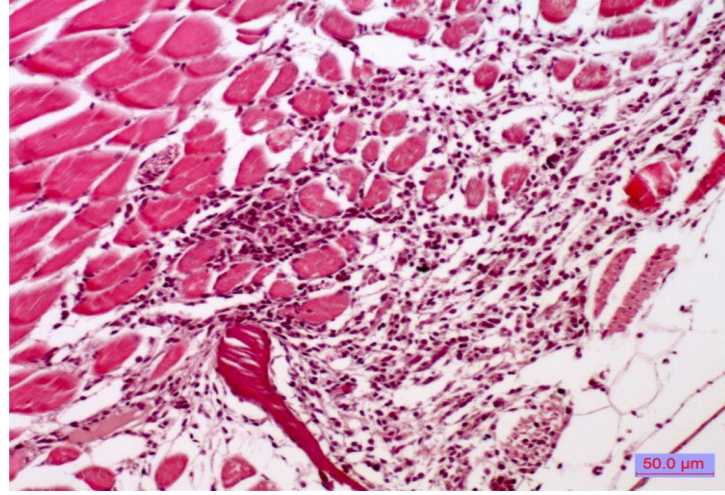
Şekil 4.11. Kas doku içerisinde fokal nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonu (Ok) H-E x400

Ayrıca kas demetleri arasında şekillenmiş olan fokal nekroz alanlarının 3 balıkta yüzeye doğru uzanan ülserli bir görünümde olgu tespit edildi (Şekil 4.12).



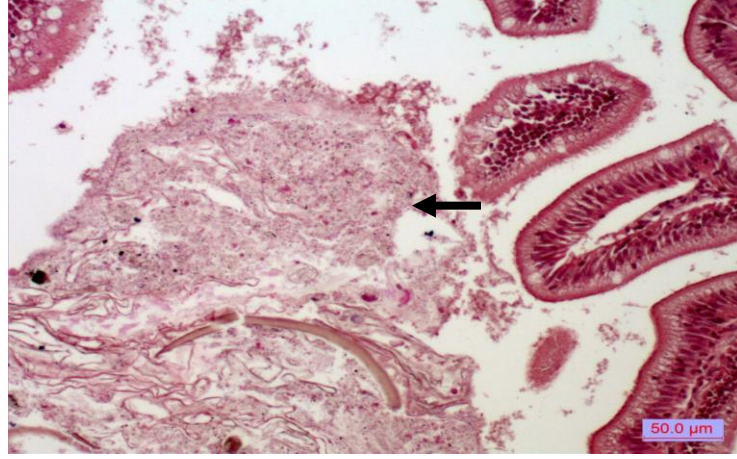
Şekil 4.12. Deride kas doku içerisine doğru ülser (Ok) ve fokal nekroz ile mononükleer hücre infiltrasyonları (Okbaşı) H-E x400

Bu gruptaki balıklarda yaygın olarak fibrinli peritonitis tablosu hakimdi. Şekillenen fibrinli peritonitis tablosundaki mononükleer hücreler kas doku içerisine doğru infiltre olmuşlardı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Yaygın fibrinli peritonitis ve kas doku içerisine doğru mononükleer hücre infiltrasyonları H.E x1000

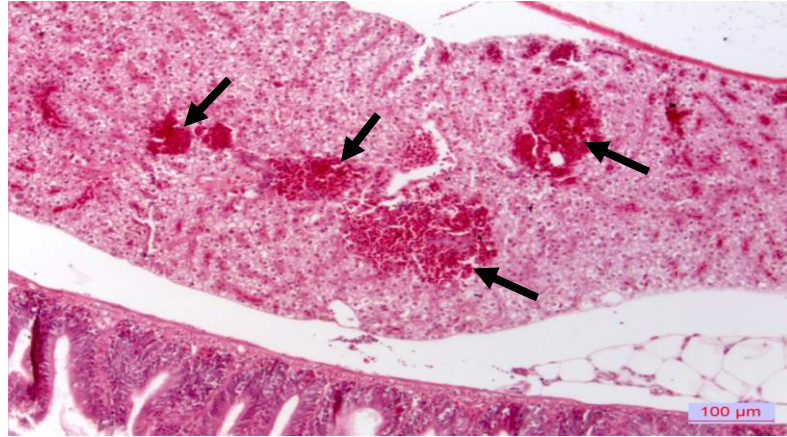
Bu grupta birçok balığın bağırsak lumeninde mavimsi gri renkte bulutumsu görünümde bakteri kümeleri görüldü (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Bağırsak lümenlerinde bulutumsu görünümde gri-mavimtrak renkte bakteri kümeleri (Ok) H-E x1000

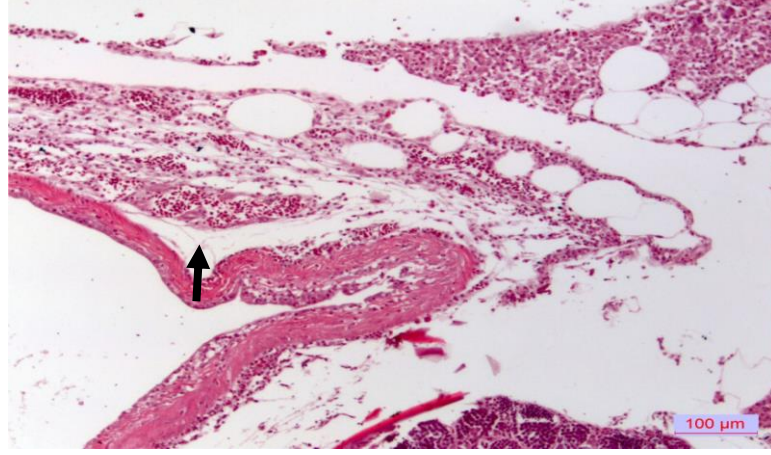
4.3.3. Grup 3 (Deney grubu- 10^5 CFU/ml Intraperitoneal)

Bu gruptaki zebra balıklarında mikroskopik olarak; solungaçlarda dikkati çeken histopatolojik bir değişim gözlenmedi. Karaciğer dokusunda, bu gruptaki balıkların tamamında hepatositlerde benzer şekilde yaygın konjesyon ve kanama ile hafif derecede vakuoler dejenerasyon tespit edildi (Şekil 4.15).



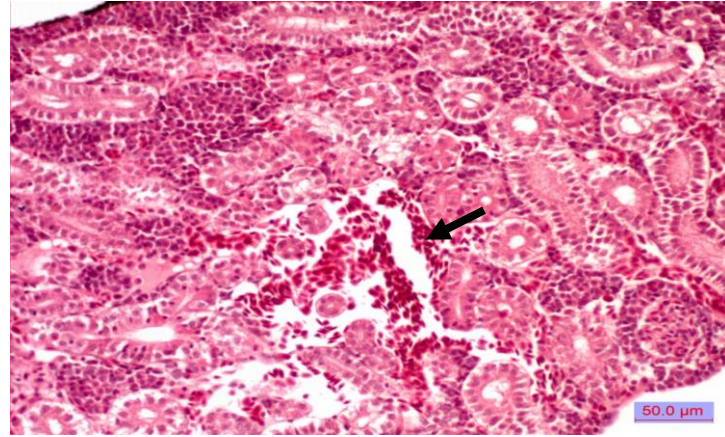
Şekil 4.15. Karaciğer yaygın konjesyon ve parankimde fokal kanama odakları (Oklar) H-Ex400

Bir balıkta karın boşluğunda karaciğere kadar uzanan alanda fibrinli tarzda peritonitis tablosu görüldü. Yangı karaciğerin kenar kısımlarını kapsayacak şekilde karın boşluğu ve hava kesesi duvarı ile bağlantılıydı (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Yaygın fibrinli peritonitis (Ok) ve karaciğere doğru yayılan mononükleer hücre infiltrasyonları H-E x400

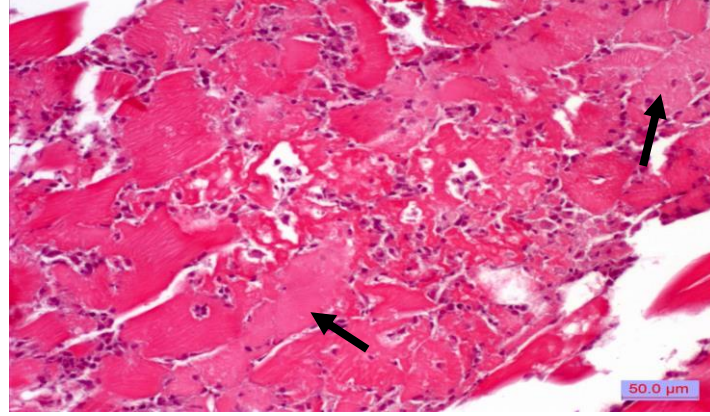
Böbreklerde fokal kanama odaklar dikkati çeken önemli mikroskopik bulgu olarak tespit edildi. Bu gruptaki bir balıkta böbrek parankiminde yaygın kanama alanları vardı (Şekil 4.17)



Şekil 4.17. Böbrek parankiminde fokal kanama alanları (Ok) H-E x1000

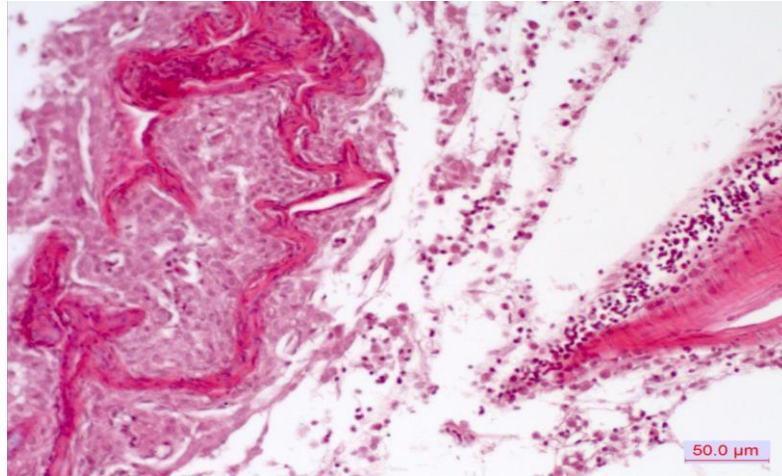
Kas doku içerisinde kas demetleri arasında 10^4 CFU/ml ip grubundakine benzer şekilde fokal nekroz odakları ve mononükleer hücre infiltrasyonları vardı. Şekillenen kas doku nekrozlarında kas ipliklerinin çizgili görünümünü kaybettiği hiyalini bir görünüm kazandıkları saptandı (Şekil 4.18). Nekrotik doku çevresinde şekillenmiş olan mononükleer hücre infiltrasyonlarının çevre kas demetleri arasına da yayıldığı görüldü.

Bir balıkta ise bu değişimler şiddetli fokal kas nekrozu ve yaygın mononükleer hücre infiltrasyonu şeklindeydi.



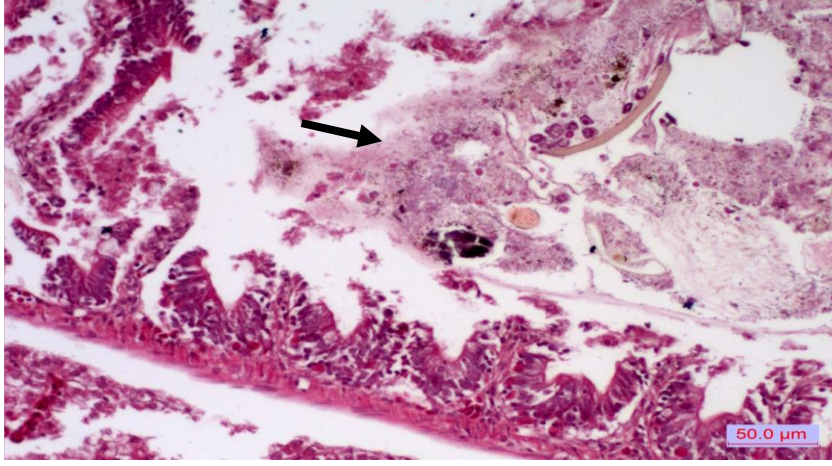
Şekil 4.18. Kas dokuda yer yer kas demetlerinde hiyalin dejenerasyonu, nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonları (Oklar) H-E x1000

Bu gruptaki balıklarda fibrinli peritonitis tablosu hâkimdi, 4 balıkta ise yaygın peritonitis tablosu daha şiddetli şekillenmişti (Şekil 4.19).

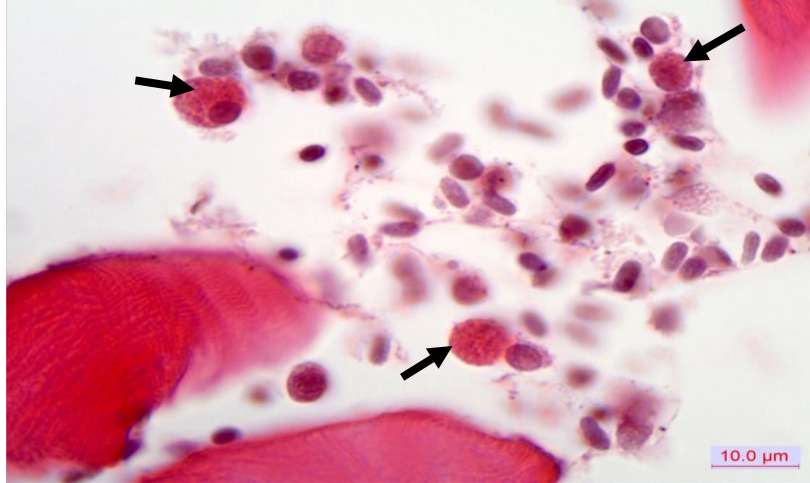


Şekil 4.19. Yaygın fibrinli peritonitis ve mononükleer hücre infiltrasyonu H-E x1000

Bu grupta da, 10^4 CFU/ml ip grupta olduğu gibi birçok balığın bağırsak lumeninde mavimsi gri renkte bulutumsu görünümde bakteri kümeleri (Şekil 4.20) ile peritonda makrofajların sitoplazmalarında bakteriler tespit edildi (Şekil 4.21).



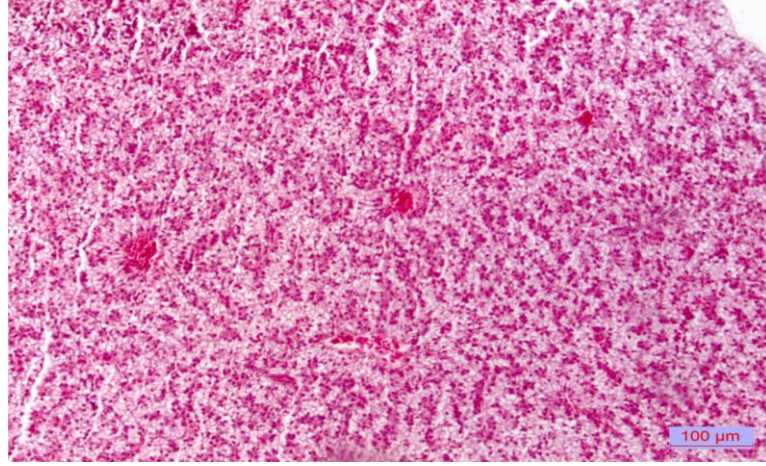
Şekil 4.20. Bağırsak lümenlerinde bulutumsu görünümde gri-mavimtrak renkte bakteri kümeleri (Ok) H-E x1000



Şekil 4.21. Peritonda makrofaq sitoplâzmalarında bakteriler (Ok) H-E x8000

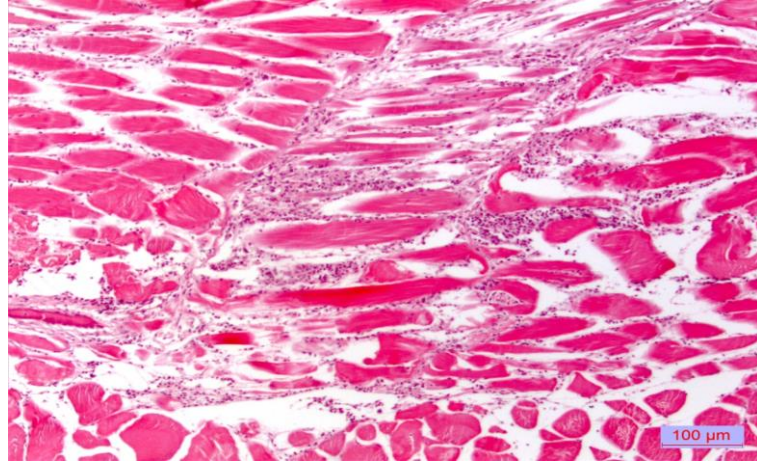
4.3.4. Grup 4 ve 5 (Deney grubu- 10^6 CFU/ml ve Deney grubu- 10^7 CFU/ml İmmersiyon)

Bu iki gruptaki balıklarda gözlenen histopatolojik değişiklikler birbirine benzerlik göstermekteydi. Bu gruplardaki balıklarda organlarda gözlenen histopatolojik değişiklikler ip uygulama yapılan gruplara göre daha hafif şiddete şekillenmişti. Mikroskobik incelemelerde; Karaciğerde konjesyon ve vakuolizasyon görüldü (Şekil 4.22).



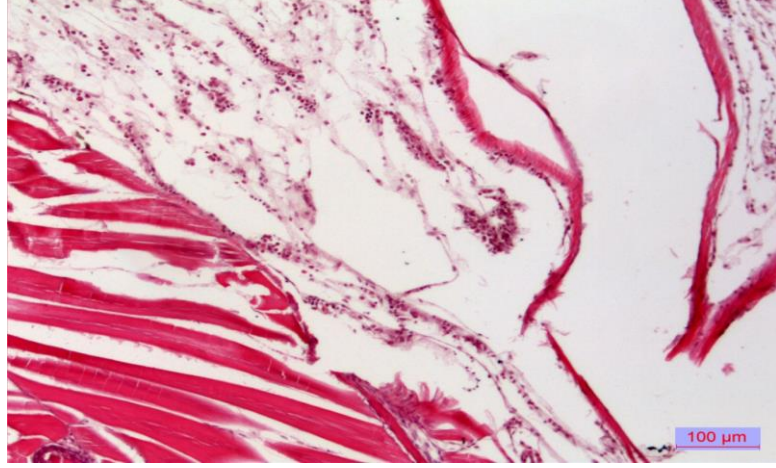
Şekil 4.22. Karaciğerde hafif dereceli vakuolazisyon ve konjesyon H-E x400

Bir balıkta daha belirgin olmak üzere kas demetleri içerisinde yaygın mononükleer hücre infiltrasyonları gözlemlendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Kas demetleri arasında yaygın mononükleer hücre infiltrasyonları H-Ex400

Bu grupta, ip grupta yer alan balıklara göre hafif derecede peritonitis, kanama ile mononükleer hücre infiltrasyonu şekillenmişti (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Hafif derecede fibrinli peritonitis ve mononükleer hücre infiltrasyonları, H-Ex400

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan literatür taramalarında 1 aylık genç zebra balıklarında enjeksiyon ve banyo yolu ile farklı dozlarda bakteri uygulamasından sonra oluşturulan *E. tarda* enfeksiyonunun organ ve dokularda oluşturduğu lezyonların karşılaştırılması üzerine bir çalışmanın yapılmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu çalışmada, laboratuvar koşullarında yetiştirilen 1 aylık zebra balıkları farklı dozlarda (10^4 ve 10^5 CFU/ml ip ile 10^6 ve 10^7 CFU/ml immersiyon) *E. tarda* bakterisi ile enfekte edilerek bu etkenin balıkların doku ve organlar üzerindeki patolojik etkileri incelenmiştir.

E. tarda'nın immersiyon ve ip uygulama gruplarındaki uygulamaları farklı zaman diliminde yapıldı. *E. tarda* zebra balıklarına ip enjeksiyon ve banyo şeklinde (immersiyon) uygulanarak eprüvasyon işlemi sonucunda balıklarda enfeksiyon oluşturuldu. Enfeksiyon oluşturulan genç zebra balıklarının organ ve dokularında meydana gelen değişiklikler histolojik teknik ve boyama yöntemleri kullanılarak mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi. Mikroskopik değerlendirme ile ip enjeksiyon ve banyo şeklinde yapılan uygulama sonucu balıkların organ ve dokulardaki histopatolojik lezyonlar karşılaştırıldı. Lezyonların fotoğraflanması ile birlikte gözlenen mikroskopik bulgular kayıt altına alındı.

Yapılan çalışmalarda Edwardsiellosis ile enfekte olan balıklarda sarmal yüzme ve su yüzeyinde hareket etme (Mayer and Bullock 1973, Miyazaki and Kaige 1985) gibi klinik değişikliklerin gözlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada kontrol gruptaki balıklarda herhangi bir klinik bulgu gözlenmedi. Deneme gruplarında ise uygulamanın 24. saatinden itibaren balıklarda iştahsızlık ve yüzmeye karşı durgunluk, bireysel yüzme hareketi dikkati çeken önemli klinik bulguları. Bu klinik bulguların genel olarak deneme gruplarında 48. saatten sonra normale döndüğü görüldü. Bu çalışmada gözlenen klinik bulguların yapılan diğer çalışmalardaki klinik bulgular ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Bir araştırmada, 5 saat süre boyunca *E. tarda* ile immersiyona maruz bırakılmış zebra balığı embriyolarında, kümülatif mortalitenin kontrol grubu balıklarına göre %31 oranında arttığı tespit edilmiştir (Pressley et al. 2005). Bu çalışmada ise deneme süresince gruplarda yer alan balıklardan sadece 10^5 CFU/ml ip grubundaki bir balıkta uygulamanın 12. gününde ölüm gözlenirken, çalışma süresince diğer balıklarda ölüm gözlenmemiştir.

Benzer iki farklı araştırmada Gram-negatif bir bakteri olan *E. tarda* kullanılarak, immersiyon yöntemiyle bir günlük zebra balığı embriyolarında bakteriyel enfeksiyon oluşturulmuş bu durum birçok balık türünde de gözlenen genel septisemi ile seyreden edwardsielloise sebep olmuştur (Pressley et al. 2005; Phelan et al. 2005). Bu çalışmada deneme süresince bir aylık zebra balıklarında genel septisemi olgusu gözlenmemiştir.

Deneme sonunda nekropsileri yapılan kontrol grubu balıklarda herhangi bir makroskopik değişiklik gözlenmemiştir. Nekropsileri yapılan 10^4 CFU/ml ip ve 10^5 CFU/ml ip balıklarda makroskopik olarak karın boşluğu açıldığında enjeksiyon yapılan alan çevresindeki peritonda kalınlaşmanın olduğu ve karın duvarı ile periton arasında hafif yapışmaların ve kanamaların şekillendiği görüldü. Bu gruplardaki balıkların tümünün karaciğerlerinin rölatif olarak hafifçe büyüdüğu ve serozal yüzlerinde koyu kırmızı renkli alanların varlığı dikkati çekti. 10^5 CFU/ml ip grubundaki bir balıkta karaciğere kadar uzanan fibrinli tarzda yaygın bir peritonitis tablosu hâkimdi. Bu yangısal reaksiyonun karaciğerin kenar kısımlarını da kapsayacak şekilde karın boşluğu ve hava kesesi duvarı ile bağlantılı olduğu tespit edildi. Böbreklerde, yer yer koyu kırmızı renkli fokal odaklar gözlendi. Bazı balıkların bağırsak duvarlarında, serozaya yakın olarak peteşiyal kanamalara rastlandı. Uygulamanın 12. gününde bu grupta ölen balığın yapılan nekropsisi sonucunda, enjeksiyon yapılan bölgede, pektoral yüzgeelerin kaidelerinde ve iç organlarda hemorajilere rastlandı.

Grup 10^6 ve 10^7 CFU/ml immersiyon gruplarındaki balıkların organ ve dokularında dikkati çeken önemli bir makroskopik bulguya rastlanılmadı.

Yapılan iki farklı araştırmada yetişkin zebra balıklarında *E. tarda*'nın dermal abrazyon ile enfeksiyon oluşturabileceği bildirilmiştir (Crawford et al. 2008; McGrath and Li 2008).

Bir araştırmada *E. tarda*'nın neden olduğu hastalıkta, kas dokuya kadar ilerleyebilen küçük deri lezyonlar, hızlı gelişen progresif fibrinli peritonitis ile böbrek ve karaciğer dokusunda nekroz ve kuyruk sapı ile lateral bölgedeki kas doku içinde apseler bildirilmiştir (Schlotfeldt et al. 1995).

Bu çalışmada literatürlerde belirtilen makroskobik bulgular ile benzer olarak 10^4 CFU/ml ip ve 10^5 CFU/ml ip gruplarında fibrinli peritonitis tablosu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda görülen kas dokuya kadar ilerleyebilen küçük deri lezyonları ile böbrek ve karaciğer dokusunun nekrozu ve kuyruk sapı ve lateral bölgedeki kas doku içinde apseler bu çalışmadaki hiçbir deneme grubunda makroskobik olarak gözlenmemiştir. Diğer çalışmalarda belirtilen kuyruk sapı ve lateral bölgedeki kas doku içindeki apselerin bu çalışmada gözlenmemesinin muhtemelen zebra balıklarında dermal abrazyon oluşturulmaması ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür.

Yapılan araştırmalarda edwardsillois de interstitial nephritis, irin oluşması ile karaciğer ve dalakta irinli bir yangı önemli histopatolojik bulgular olarak bildirilmiştir (Miyazaki and Egusa 1976; Miyazaki and Kaige 1985). Egusa (1976) ve Miyazaki and Kaige (1985) yaptıkları çalışmalarda değişik büyüklüklerde apseler ve bakteri kolonileri ile karaciğer, dalak ve böbreklerde makrofaj infiltrasyonlarını rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada deneme sonunda histopatolojik incelemesi yapılan kontrol grubu balıklarda herhangi bir histopatolojik değişiklik gözlenmedi. 10^4 CFU/ml ip grubunda balıkların solungaç dokularında primer lamellerin mononükleer hücre infiltrasyonu ile kalınlaştığı, damarların ileri derecede konjesyone olduğu görüldü. Ayrıca yer yer sekonder lamellerde mononükleer hücre infiltrasyonun bulunduğu alanlarda pıllar hücrelerde dejenerasyon ve nekrozlar tespit edildi. Kalp dokusunun incelemesinde iki balıkta sinus venosum duvarında fokal mononükleer hücre infiltrasyonu saptandı. Bu gruptaki balıkların karaciğer parankiminde, damarlarda yaygın konjesyon ve kanama ile bir balıkta damarda tromboz ve lümeninde lenfositler izlendi. Bu gruptaki tüm balıkların karaciğer parankimindeki damarlarda yaygın konjesyon ile hepatositlerin ileri derecede vakuolizasyonu dikkati çeken önemli bir bulgu idi. Böbrek parankiminde korteks ve medullada fokal kanama odakları ile tubulus epitelinde dökülme ve hafif şiddette dejeneratif değişiklikler tespit edildi. Bir balığın böbrek parankiminde grimsi mavi renkte

bakteri kümeleri vardı. Histopatolojik olarak önemli değişiklikler bu gruptaki balıkların kas dokusunda gözlendi. Özellikle kas dokusunda kas demetleri arasında fokal mononükleer hücre infiltrasyonu ile fokal dejeneratif ve nekrotik değişiklikler ile yaygın kanamalar dikkati çeken önemli bulgulardı. Bununla beraber kas demetleri arasında şekillenmiş olan fokal nekroz alanlarının 3 balıkta yüzeye doğru uzanan ülserli bir görünümde olduğu tespit edildi. Bu grupta birçok balığın bağırsak lumeninde mavimsi gri renkte bulutumsu görünümde bakteri kümeleri görüldü.

10^5 CFU/ml ip grubunda balıkların karaciğer dokusunda bu gruptaki balıkların tamamında hepatositlerde 10^4 CFU/ml ip benzer şekilde vakuoler dejenerasyon ile konjesyon, karın boşluğunda karaciğere kadar uzanan alanda fibrinli tarzda peritonitis tablosu görüldü. Yangı karaciğerin kenar kısımlarını kapsayacak şekilde karın boşluğu ve hava kesesi duvarı ile bağlantılıydı. Böbreklerde fokal kanama odaklar dikkati çeken mikroskobik bulgu olarak saptandı. Bu gruptaki balıkların kas doku içerisine doğru yayılan kanama alanları belirgindi. Kas doku içerisinde kas demetleri arasında 10^4 CFU/ml ip grubundakine benzer şekilde fokal nekroz odakları ve mononükleer hücre infiltrasyonları vardı. Şekillenen kas doku nekrozlarında kas ipliklerinin çizgili görünümünü kaybettiği hiyalini bir görünüm kazandıkları saptandı. Nekrotik doku çevresinde şekillenmiş olan mononükleer hücre infiltrasyonlarının çevre kas demetleri arasına da yayıldığı görüldü. Birçok balığın bağırsak lumeninde mavimsi gri renkte bulutumsu görünümde bakteri kümeleri görüldü.

10^5 CFU/ml ip dozda bakteri uygulanan zebra balıklarında karaciğerde hepatositlerde görülen vakuolizasyon ve konjesyon 10^4 CFU/ml ip dozdaki bakteri uygulanan balıklara göre daha hafif şiddetliydi. 10^5 CFU/ml ip dozda bakteri uygulanan gruptaki zebra balıklarında şekillenen peritonitis tablosu daha belirgin ve fibrinli tarzda iken 10^4 CFU/ml ip dozdaki bakteri uygulanan gruptaki balıklarda peritonitis hafif şiddetliydi. 10^4 CFU/ml ip dozdaki bakteri uygulanan balıklarda solungaçlarda hiperplazi gözlenirken, 10^5 CFU/ml ip dozda bakteri uygulanan gruptaki zebra balıklarında bu değişiklikler gözlenmedi. 10^4 CFU/ml ip ve 10^5 CFU/ml ip dozda bakteri uygulanan zebra balıklarında kas dokuda gözlenen fokal nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonu birbirine benzer tarzdaydı.

10^4 CFU/ml ip ve 10^5 CFU/ml ip dozda bakteri uygulanan grubundaki zebra balıklarında bağırsaklarda önemli bir histopatolojik değişiklik gözlemlenmedi. Ancak her iki gruptaki balıkların bağırsak lümenlerinde benzer şekilde mavimsi gri renkte bulutumsu görünümde bakteri kümeleri görüldü.

Yapılan iki farklı araştırmada yetişkin zebra balıklarında ise *E. tarda*'nın, dermal abrazyon ile enfeksiyon oluşturabileceği bildirilmiştir (Crawford et al. 2008; McGrath and Li 2008). Araştırmalarda bildirilen deri lezyonları ve deri altı dokusundaki apselerin bu çalışmada şekillenmemiş olması da zebra balıklarında dermal abrazyon oluşturulmamasıyla ilgili olabileceğini akla getirmiştir. Diğer çalışmalarda bildirilmeyen ancak bu çalışmada 10^4 ve 10^5 CFU/ml ip grubundaki balıklarda gözlenen kas dokudaki fokal nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonlarının ip olarak uygulanan etkenin peritonda oluşturduğu yangının kas doku içerisine doğru yayılması ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür.

10^6 ve 10^7 CFU/ml immersiyon gruplarındaki zebra balıklarında mikroskopik olarak; ip uygulama yapılan gruptaki balıklara nazaran karaciğerde hafif derecede konjesyon ve vakuolizasyon görüldü. Bir balıkta daha belirgin olmak üzere ip grubundaki balıklara göre daha hafif şiddet ve yaygınlıkta kas demetleri içerisinde öbek öbek mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edildi. Yer yer kas demetleri içerisinde fokal nekroz odakları vardı. Bu gruplardaki zebra balıklarında; ip gruplarda yer alan balıklara göre daha hafif derecede peritonitis, kanama ve kas doku içerisinde mononükleer hücre infiltrasyonları saptandı.

10^4 ve 10^5 CFU/ml ip grubundaki balıklarda şekillenen peritonitis tablosunun 10^6 ve 10^7 CFU/ml immersiyon grubundaki balıklardan daha şiddetli gözlenmesi, etkenin ip olarak verilmesi ve bu etkenlerin periton mukozasında daha şiddetli yangısal bir reaksiyon oluşturması ile açıklanmıştır.

Zebra balıkları ile yapılan diğer çalışmalarda gözlenen histopatolojik değişiklikler (Egusa 1976; Miyazaki and Egusa 1976; Miyazaki and Kaige 1985; Pressley et al. 2005; Phelan et al. 2005) bu çalışma ile karşılaştırıldığında, karaciğer, böbrek ve dalakta irinli bir yangı gözlenmezken diğer çalışmalarda bildirilenlerden farklı olarak, karaciğerde hepatositlerde

vakuoler dejenerasyon, fibrinli peritonitis, kas dokuda nekroz ve mononükleer hücre infiltrasyonları göze çarpan önemli histopatolojik değişikliklerdi.

Sonuç olarak *E. tarda* bakterisinin zebra balığında oluşturduğu enfeksiyonun doku ve organlar üzerindeki patolojik etkileri incelenmiştir. Laboratuvar koşullarında yetiştirilen 1 aylık zebra balıklarını farklı dozlarda (10^4 ve 10^5 CFU/ml ip ve 10^6 ve 10^7 CFU/ml immersiyon) *E. tarda* bakterisi ile enfekte edilmiştir.

Bu araştırmada *E. tarda* zebra balıklarına ip enjeksiyon ve banyo şeklinde uygulandı, eprüvasyon işlemi sonucunda balıklarda enfeksiyon oluşturuldu. Enfeksiyon oluşturulan genç zebra balıklarının organ ve dokularında meydana gelen histopatolojik değişiklikler histolojik teknik ve boyama yöntemleri kullanılarak ortaya konuldu. Çalışma sonunda klinik bulgular, makroskobik ve mikroskobik bulgular değerlendirilerek *E. tarda*'nın genç zebra balıkları üzerindeki etkileri değerlendirildi. Bu sonuçlar dikkate alındığında bu çalışmada 10^4 ve 10^5 CFU/ml ip deneme grubunda lezyonlar daha şiddetli seyrederken, 10^6 ve 10^7 CFU/ml immersiyon deneme grubunda daha hafif şiddette lezyonlar şekillenmiştir.

Çalışma süresince ve sonunda gözlenen klinik, makroskobik ve mikroskobik bulgular hep birlikte değerlendirildiğinde ip uygulamaların immersiyon uygulamalarına göre lezyonların oluşumu bakımından daha etkili olduğu görülmüştür. Bu uygulamalar neticesinde zebra balıklarında *E. tarda*'nın bir takım histopatolojik lezyon oluşumuna sebep olduğu ancak çalışma süresinde bir balık dışında balıkların ölmediği dikkate alındığında genç zebra balıklarının ve bu etkene karşı oldukça dirençli oldukları sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Akbulut, C., Yön, ND., “Bisfenol a'nın zebra balıklarında (*Danio rerio*) teratolojik etkileri”, Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sakarya, 2012.

Annemarie, HM., and Herman, PS., “Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model”, *Current Drug Targets*, 12: 1000-1017, 2011.

Bruno, DW., Alderman, DJ., Schlotfeld, HJ., Baudin-Laurencin, F., Bernoth, EM., Daelman, W., Palmer, R., Thorud, K., “A practical guide for the marine fish farmer”, published by european association of fish pathologists, 64 pp, 1995.

Buzea, C., Pacheca, II., Rabbie, K., “Nanomaterial sandnano particles sources and toxicity”, *Bioin terphases*, 2(4): 17-71, 2007.

Cengizler, İ., “Balık Hastalıkları”, Nobel Kitapevi, Adana, 2006.

Chen, JD., Lai, SY., and Huang, SL., “Molecular cloning, characterization of *Edwardsiella tarda*”, *Arch*, 165: 9-17, 1996.

Crawford, AD., Esguerra, CV., Witte, PA., “Fishing for drugs from nature: zebrafish as a technology platform for natural product discovery”, *Planta Med.*, 74(6): 624-632, 2008.

Davis, JM., Clay, H., Lewis, JL, Ghori, N., Herbomel, P., Ramakrishnan, L., “Real-time visualization of mycobacterium-macro phage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos”, *Immunity* 17: 693-702, 2002.

Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A., Li, Y., and Whang, Y., “Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 1349-1354, 2007.

Egusa, S., “Some bacterial diseases of freshwater fishes in Japan”. *Fish Pathol*, 10: 103-114, 1976.

Ewing, WH., Mcwhorter, AC., Escobar, MR., Lubin, AH., “*Edwardsiella*, A new genus of Enterobacteriaceae based on a new species”, *E. tarda* *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 15: 33-38, 1965.

- Hallare, AV., Kohler, H-R., Triebkorn, R., “Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent”, DMSO. *Chemosphere*, 56: 659-666, 2004.
- Hasanoğlu, HC, Köksal, N, Gökırmak, M, Özerol, İ, Yıldırım, Z, Orhan, Z, Hacıevliyagil, SS, “Serebrovasküler atak geçiren yaşlı bir hastada *Edwardsiella ictaluri* pnömonisi” İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, 2001.
- Hekimoğlu, MA., “Akvaryum Teknolojileri”, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 2009.
- Hoshina, T., “On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. Sp”. *Bull. Jpn. SOC. Sci. Fish.* 28: 162-164, 1962
- Huang, ZA., Chen, J., Lu, XJ., “Alteration on the expression of ayuco agulation factor x gene up on liston ella Anguillarumin fection”, *Dong Wuxue Yanjiu.* 32(5): 492-8, 2011
- Ibrahim, MD., Shaheed, IB., El-Yazeed, HA., Koranı, H., “Assesment of susceptibility of poly culturere ared African Catfishand *Nile tilapiato Edwardsiella tarda*”, *Journal of American Science*, 7(3): 779-786, 2011.
- Inglis, V., Roberts, RJ., And Bromage, NR., *Bacterial Diseases of Fish*, New York, NY, Halsted Press, 1993.
- Iveson, JB., “Strontium chloride B and EE enrichment broth media for the isolation of *Edwardsiella tarda*, Salmonella and Arizona species from *Tiger snakes*”, *J Hyg (Lond)* 6: 323-330, 1971.
- Janda, JM., Abbot, SL., “Expression of an iron-regulated hemolysin by *Edwardsiella tarda*”; *FEMS Microbiol, Lett.*, 275-280, 1993.
- Janda, JM., Abbot, SL., Kroske- Bystrom, S., Cheung, WK., Powwers, C., Kokka, RP., Tamura, K., “Pathogenic properties of *Edwardsiella* species”; *J. Clin, Microbiol*, 29: 1997–2001, 1991.
- Kumar, V., Cotran, RS., Robbins, SL., “Robbins basic pathology, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2003.
- Leotta, GA., Pineyro, P., Serena, S., Vigo, GB., “Prevalence of *Edwardsiella tarda* in Antarctic Wildlife”, *Polar Biol* 32: 809-812, 2009.
- Lieschke, GJ., and Currie, PD., “Animal models of human disease: *Zebrafish* swim into view”, *Nat. Rev. Genet.* 8(5): 353-67, 2007.

- Lieschke, GJ., Trede, NS., “Fish Immunology”, Curr Biol; 19: R678-82, 2009.
- Lillie, RD., “Histopathologic technic and practical histochemistry”, 3rd Edition, McGraw-Hill Book Co., New York, 1965.
- Ling, SHM., Wang, XH., Xie, L., Lim, TM., and Leung, KY., “Use of Green Fluorescent Protein (GFP) to track the invasive pathways of *Edwardsiella tarda* in the vivo and vitro fish models”, Microbiology 146: 7-19, 2000.
- Lu, A., Hu, X., Wang, Y., Shen, X., Li, X., Zhu, A., Tian, J., Ming, Q., Feng, Z., “Itraq Analysis of gill proteins from the zebrafish (*Danio rerio*) infected with *Aeromonas hydrophila*”, Fish Shell Fish Immunol, 36(1): 229-239, 2014.
- Lu, A., Hü, X., Xue, J., Zhu, J., Wang, Y., Zhou, G., “Gene expression profiling in the skin of zebrafish infected with *Citrobacter freundii*”, Fish Shell Fish Immunol, 32(2): 273-283, 2011.
- Lynch, MJ., Raphael, SS., Mellor, LD., Spare, PD., and Inwood, MJ., “Medical laboratory technology and clinical pathology”, 2nd Edition, WB Saunders Co., Philadelphia London, Toronto, 1969.
- Mayer, FP., and Bullock, GL., “*Edwardsiella tarda*, a new pathogen of Channel catfish (*Ictalurus punctatus*)”; Appl., Microbiol, 25: 155-156, 1973.
- Mayer, P., Mitt. zool. Stn. Neapel., 12: 303, 1896.
- Mcgrath, P., Li, Chun-Q., “Zebrafish: A predictive model for assessing drug-induced toxicity”, Drug Discov, Today, 13: 394-401, 2008.
- Meeker, ND., Trede, NS., “Immunology and Zebrafish: Spawning new models of human disease”, Dev. Comp. Immunol. 32(7): 745-757, 2008.
- Meyer, FP., and Bullock, GL. *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish *Ictalurus punctatus*, Applied Microbiology 25: 155-156, 1973.
- Mills, D., “Akvaryum Bakımı”, İnkılap Kitabevi, İstanbul, Türkiye, 1994.
- Miyazaki, T., Egusa, S., “Histopathological studies of Edwardsiellosis of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)” 1; Suppurative interstitial nephritis from, 111: 33-43 2; Suppurative Hepatitis From, Fish Pathol 11: 67-75, 1976.
- Miyazaki, T., Kaige, N., “Comparative histopathology of Edwardsiellosis of the fish”, Fish Pathol, 20: 219-227, 1985.

Mohanty, BR., Sahoo, PK., “Edwardsiellosis in fish: A brief review”, J. Biosci. 32(7): 1331-1344, 2007.

Neely, MN., Pfeifer, JD., Caparon, M., “*Streptococcus*–Zebrafish model of bacterial pathogenesis”, Infect Immun, 70: 3904–14, 2002.

Olivares-Fuster, O., Bullard, SA., Mcelwan, A., Liosa, MJ., Arias, CR., “Adhesion dynamics of flavobacterium columnare to Channel catfish *Ictalurus punctatus* and zebrafish (*Danio rerio*) after immersion challenge”, Dis. Aquat. Organ. 96(3): 221-227, 2011.

Patros, F., Zarca, C., Dopazo, L., Cuadrado, M., and Crespo, S., “Pathology of *Edwardsiella tarda* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.)”; J. Fish Dis. 29: 87-94, 2006.

Patterson, H., Saralahti, A., Parikka, M., Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Poyart, C., Rounioja, S., and Rämetsä, M., “Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection”. Dev. Comp. Immunol. 38(3): 447-455, 2012.

Phelan, PE., Mellon, MT., Kim, CH., “Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4 and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*)”. Mol Immunol; 42: 1057-71, 2005.

Pressley, ME., Phelan, PE., Witten, PE., Mellon, MT., Kim, CH., “Pathogenesis and inflammatory responses to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish”. Dev Comp Immunol, 29: 501-513.2005.

Robert, B., and Moeller, JR., “Bacterial diseases of fish”, Cichlid- forum.com., 2012.

Robert, R.J., “Fish Pathology”, Second Edition, Bailliere Tindall U.K, 1989.

Rounioja, S., Saralahti, A., Rantala, L., Parikka, M., Henriques-Normark, B., Silvennoinen, O., Rämetsä, M., “Defense of Zebrafish embryos against *Streptococcus pneumoniae* infection is dependent on the phagocytic activity of leukocytes”. Dev. Comp. Immunol, 36(2): 342-8, 2011.

Sakazaki, R., “A proposed group of the family Enterobacteriaceae”, The Asakusa Group, Int J Syst Evol Microbiol 15: 45-47, 1965.

Schlotfeldt, H., Alderman, DJ., Baudin-Launrencin, F., Bernoth, EM., Bruno, DW., Daelman-Kleingeld, D., Lorenzen, E., Thoruldsen, K., “A practical guide for the marine fish farmer”, Published By European Association of Fish Pathologists, 1995.

Seong, BP., Takashi, A., and Tae, SJ., “Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish”, *Veterinary Research*. 43: 67, 2012.

Spencer, JD., Hastings, MC., Rye, AK., English, BK., Ault, BH., “Gastroenteritis caused by *Edwardsiella tarda* in a pediatric renal transplant recipient”, *Pediatric Transplant*, 12: 41-238, 2008.

Sprague, J., Doerry, E., Douglas, S., Westerfield, M., “The zebrafish information network (ZFIN): A resource for genetic, genomic and development research”, *Nucleic Acids Research*, 29: 87-90, 2001.

Stockhammer, OW., Zakrzewska, A., Hegedûs, Z., Spaink, HP., Meijer, AH., "Transcriptome profiling and functional analyses of the zebrafish embryonic innate immune response to salmonella infection", *J. Immunol* 182(9): 5641-53, 2009.

Strauss, EJ., Ghori, N., and Falkow, S., “An *Edwardsiella tarda* strain containing a mutation in a gene with homolog to *sglB* and *hpmB* is defective for entry into epithelial cells in culture infect, immun”, 65: 3924-3932, 1997.

Sullivan, C., Kim, CH., “Zebrafish as a model for infectious disease and human function”, *Fish Shellfish Immunol*. 25(4): 341–350, 2008.

Sun, Z., Amsterdam, A., Pazour, GJ., Cole, DG., Miller, MS., Hopkins, N., “A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney”, *Development*, 131: 4085–93, 2004.

Şahin, Y., “A’dan Z’ye Akvaryum”, İnkılap Kitapevi, İstanbul, 1999.

Tacal, JV., Jr, Menez, CF., “The isolation of *Edwardsiella tarda* from a dog”, *Philipp J Vet Med*, 7: 143-145, 1969.

Timur, G., Timur, M., “Balık hastalıkları”, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, Dilek Ofset matbaası, s: 538, 2003.

Traver, D., Herbomel, P., Patton, EE., “The zebrafish as a model organism to study development of the immune system”, *Adv Immunol*; 81: 253-330, 2003.

Van Damme, LR., Vandepitte, J., “Isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from mammals and birds in zaire re velev”, *Med Vet Pays Trop* 37: 145-151, 1969.

- Van Der Sar, AM., Appelmelk, BJ., Vandenbroucke-Grauls, CM., Bitter, W., “A star with stripes: Zebrafish As An Infection Model”, *Trends Microbiol*, 12(10): 451–457, 2004.
- Van Der Sar, AM., Musters, RJ., Van Eeden, FJ., Appelmelk, BJ., Vandenbroucke-Grauls, CM., Bitter, W., “Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections”, *Cell Microbiol*. 5: 601–11, 2003.
- Veneman, WJ., Stockhammer, OW., De Boer, L., Zaat, SA., Meijer, AH., Spaik, HP., “A Zebrafish high throughput screening system used for *Staphylococcus epidermidis* infection marker discovery”, *BMC Genomics* 14(1): 255, 2013.
- Vojtech, LN., Scharping, N., Hansen, JD., “Processing of zebrafish interleukin-1 Beta during *Francisella noatunensis* infection, roles of inflammatory caspases”, *Infect, Immun.* 80(8): 2878-2885, 2012.
- Wakabayashi, H., Egusa, S., *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel diseases. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 39: 931–936, 1973.
- Whang, QY., Yang, MJ., Xiao JF., Wu, HZ., Wang, X., Lü, YZ., et al., “Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular Niches”, *Plos One* 4: 7646, 2009.
- Watson, JJ., White, FH., “Hemolysins of *Edwardsiella tarda*”, *J., Med.* 43: 78–83, 1979.
- Woo, PTK., Bruno, DW., “Fish diseases and disorders, volume 3, viral bacterial and fungal infections, in *Edwardsiella septicaemias*”, 2nd Edition, Edited by EVARS JJ., Klesius PH., Plump JA., Shoemaker CA., Wallingford; Cabi International, 2010.
- Wyatt, LE., Nickelson, RI., Vanderzant, C., “*Edwardsiella tarda* in freshwater Catfish and their environment”, *Appl Environ Microbiol*, 38: 710-714, 1979.
- Xiaohong, L., Xinyue, C., Haizgen, W., Jingfan, X., Yuan, G., “Role of intertinal inflammation in predisposition of *Edwardsiella tarda* infection in zebrafish (*Danio rerio*)”, *Fish & Shellfish Immunology*, 41: 271-278, 2014.
- Zhang, Z., Wu, H., Xiao, J., Wang, Q., Liu, Q., Zhang, Y., “Immune response evolved by infection with *Vibrio anguillarum* in zebrafish Bath-Vaccinated with a live attenuated strain”, *Vet. Immunol., Immunopathol*, 154(3-4): 138-144, 2013

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Malatya’da doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Malatya’da tamamladı. 2000 yılında Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümünü kazandı ve 2004 yılında mezun oldu. 2006 yılında girdiği Polis Meslek Eğitim Merkezi sınavlarını kazanarak altı ay öğrenimden sonra Emniyet Genel Müdürlüğü bünyesinde polis memuru olarak göreve başladı ve halen Bingöl İl Emniyet Müdürlüğü bünyesinde polis memuru olarak görev yapmaktadır. 2012 yılında Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programına kayıt yaptırdı. Evli ve iki çocuk babasıdır.