Lam Aglütinasyon Metodu ile Bakteriyel Balık Hastalıklarının Teşhisi

Su Ürünleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans

Kaan KUMAŞ

ORCID 0000-0003-1583-8482

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tevfik Tansel TANRIKUL

Aralık 2021

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi **Kaan KUMAŞ** tarafından hazırlanan **Lam Aglütinasyon Metodu ile Bakteriyel Balık Hastalıklarının Teşhisi** başlıklı bu çalışma tarafımızca okunmuş olup, yapılan savunma sınavı sonucunda kapsam ve nitelik açısından başarılı bulunarak jürimiz tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

ONAYLAYANLAR:

Tez Danışmanı: **Prof. Dr. Tevfik Tansel TANRIKUL**
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Gülşen ULUKÖY
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ezgi DİNÇTÜRK
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Savunma Tarihi: 30.12.2021

Yazarlık Beyanı

Ben, **Kaan KUMAŞ**, başlığı **Lam Aglütinasyon Metodu ile Bakteriyel Balık Hastalıklarının Teşhisi** olan bu tezimin ve tezin içinde sunulan bilgilerin şahsıma ait olduğunu beyan ederim.

Ayrıca:

- Bu çalışmanın bütünü veya esası bu üniversitede Yüksek Lisans derecesi elde etmek üzere çalıştığım süre içinde gerçekleştirilmiştir.
- Daha önce bu tezin herhangi bir kısmı başka bir derece veya yeterlik almak üzere bu üniversiteye veya başka bir kuruma sunulduysa bu açık biçimde ifade edilmiştir.
- Başkalarının yayımlanmış çalışmalarına başvurduğum durumlarda bu çalışmalara açık biçimde atıfta bulundum.
- Başkalarının çalışmalarından alıntıladığımda kaynağı her zaman belirttim. Tezin bu alıntılar dışında kalan kısmı tümüyle benim kendi çalışmamdır.
- Kayda değer yardım aldığım bütün kaynaklara teşekkür ettim.
- Tezde başkalarıyla birlikte gerçekleştirilen çalışmalar varsa onların katkısını ve kendi yaptıklarımı tam olarak açıkladım.

Tarih: 30.12.2021

Lam Aglütinasyon Metodu ile Bakteriyel Balık Hastalıklarının Teşhisi

Öz

Yetiştiriciliği yapılan balık türlerinde Gram-negatif ve Gram pozitif bakteriler farklı coğrafi bölgelerde hastalık etkeni patojen olarak tespit edilmiştir. Balık çiftliklerinde oluşan hastalıklar yüksek üretim, iklim değişiklikleri, çiftlikler arası gerçekleşen balık ve yumurta transferleri gibi faktörlerin etkisiyle ortaya çıkarak ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Balık patojenlerinin hızlı teşhis edilmesi ile hastalıkların tedavi edilerek balıkların sağlığına kavuşturulması en önemli unsurlardan biridir. Bu nedenle patojenlerin hızlı identifikasyonunun yapılabildiği serolojik yöntemlere olan ihtiyaç artmıştır. Poliklonal antikorlar tek bir antijen üzerinde birden fazla epitopu tanıyabilmelerinden dolayı bakteriyel balık hastalıklarının serolojik identifikasyonunda sıklıkla tercih edilmektedir. Bu çalışmada antiserum elde etmek için uygulanan immunizasyonda *Lactococcus garvieae, Vibrio anguillarum, Yersinia ruckeri*'nin referans suşlarından antijenler hazırlanmıştır. Yeni Zelanda tavşanlarına antijenler ardışık dozlarda verilerek gerçekleştirilmiştir ve tavşanın kulak veninden kan alınarak antiserumlar ayrı ayrı toparlanmıştır. Bakteriyel patojenler İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Balık Hastalıkları ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndan lam aglütinasyon metodunda kullanılmak üzere temin edilmiştir. Güney Ege Bölgesi'nde 2014-2021 yılları arasında gökkuşağı alabalığından elde edilmiş olan *Y. ruckeri, V. anguillarum, L. garvieae* ve referans (ATCC 43305, ATCC 29473, ATCC 49156) suşlar dahil olmak üzere toplam 42 suş ile çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak; çalışılan *V. anguillarum* suşlarının önemli bir kısmının (%86) serotip O1 olarak belirlenmiş ve *Y. ruckeri* suşları için baskın serotipin (%84) serotip O1 olduğu tespit edilmiştir. Lam aglütinasyon testlerinde incelenen *L. garvieae* suşlarında serolojik farklılıklar

belirlenmiş. Türkiye'de gökkuşağı alabalığından izole edilmiş olan *L. garvieae* suşlarının Japon KG^- antiserumu ile reaksiyon vermediği ancak Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan hasta gökkuşağı alabalığından izole edilmiş olan *L. garvieae* (C3) suşundan üretilen KG^- antiserumu ile reaksiyon verdiği belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae*, seroloji, lam aglütinasyon methodu,

Diagnosis of Bacterial Fish Diseases With Using Slide Agglutination Method

Abstract

Gram-negative and Gram-positive bacteria have been identified as disease-causing pathogens in different geographical regions in farmed fish species. Diseases in fish farms cause serious economic losses due to factors such as high production, climatic changes, fish and egg transfers between farms. Rapid diagnosis of fish pathogens and treatment of diseases is one of the most important factors associated with fish health. Therefore, the need for serological methods for rapid identification of pathogens has increased. Polyclonal antibodies are frequently preferred for the serological identification of bacterial fish diseases because they can recognize more than one epitope on a single antigen. In this study, antigens were prepared from reference strains of *Lactococcus garvieae, Vibrio anguillarum, Yersinia ruckeri* for the immunization process to obtain antiserum. Antigens were gived consetutive doses to New Zealand rabbits and antisera were collected separately by taking blood from the rabbit's ear vein. Bacterial pathogens were obtained from Izmir Katip Celebi University Fish Diseases and Biotechnology Laboratory to be used in the slide agglutination method. A total of 42 strains including *Y. ruckeri, V. anguillarum, L. garvieae* strains obtained from rainbow trout in the South Aegean Region between 2014-2021 and three reference strain (ATCC 43305, ATCC 29473, ATCC 49156) were studied. As a result; majority of *V. anguillarum* (86%) strains determined as serotype O1 and dominant serotype were belong to serotype O1 (84%) for *Y. ruckeri* strains. Serological differences were determined in *L. garvieae* strains examined in slide agglutination tests. *L. garvieae* strains isolated from rainbow trout in Turkey did not react with

Japanese KG- antiserum, however strains positively reacted with KG- antiserum produced from *L. garvieae* (C3) strain isolated from diseased rainbow trout in Turkey.

Keywords: *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae*, serology, slide agglutination method

Anneannem Remziye TÜTÜNCÜ ve Dedem Nayim TÜTÜNCÜ'ye

Teşekkür

Yüksek Lisans tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan ve bana her zaman yardımcı olan başta danışman hocam sayın Prof. Dr. T. Tansel TANRIKUL'a, tez çalışmam süresince her zaman yanımda olan ve yol gösteren sayın Dr. Öğr. Üyesi. Ezgi DİNÇTÜRK'e, tavşanlar ile yürüttüğümüz çalışma süresince deneyimleri ile katkılarını sunan sayın Doç. Dr. Mumin Alper ERDOĞAN'a ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Doç. Dr. Serkan KORAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2021-TYL-FEBE-0012 numaralı projesi tarafından desteklenmiştir.

Kaan KUMAŞ

İçindekiler

Yazarlık Beyanı ii

Öz iii

Abstract v

Teşekkür viii

Şekiller Listesi xii

Tablolar Listesi xiv

1 Giriş 1

2 Genel Bilgiler 4

2.1 Bakteriyel Balık Hastalıkları 4

2.1.1 Vibriosis 4

2.1.1.1 *Vibrio (Listonella) anguillarum*'un Tanımı ve Tarihçesi 4

2.1.1.2 *Vibrio anguillarum*'un Klinik ve Otopsi Bulguları 5

2.1.1.3 *Vibrio anguillarum*'un İzolasyonu ve Teşhisi 6

2.1.1.4 *Vibrio anguillarum*'un Serolojisi 6

2.1.2 Yersiniosis/ Enterik Kızılağız Hastalığı 8

2.1.2.1 *Yersinia ruckeri*'nin Tanımı ve Tarihçesi 8

2.1.2.2 *Yersinia ruckeri*'nin Klinik ve Otopsi Bulguları 8

2.1.2.3 *Yersinia ruckeri*'nin İzolasyonu ve Teşhisi 9

2.1.2.4 *Yersinia ruckeri*'nin Serolojisi 10

2.1.3 Lactococcosis 11

2.1.3.1 *Lactococcus garvieae*'nin Tanımı ve Tarihçesi 11

2.1.3.2 *Lactococcus garvieae*'nin Klinik ve Otopsi Bulguları 11

2.1.3.3 *Lactococcus garvieae*'nin İzolasyonu ve Teşhisi 12
2.1.3.4 *Lactococcus garvieae*'nin Serolojisi 13
2.2 Bakteriyel Balık Hastalıklarında Teşhis Yöntemleri 14
2.2.1 Geleneksel Testler 14
2.2.2 Moleküler teknikler 15
2.2.3 Serolojik Yöntemler 16
2.2.3.1 Floresan Antikor Tekniği (FAT) 16
2.2.3.2 Presipitasyon Testleri 17
2.2.3.3 İmmünodifüzyon (İD) 17
2.2.3.4 Kompleman Fiksasyon Testi 18
2.2.3.5 Lateks Aglütinasyon (LA) 18
2.2.3.6 Antikora Duyarlı Stafilokoklar ile Koaglütinasyon Testi .. 18
2.2.3.7 Geck Tekniği 19
2.2.3.8 ELISA 19
2.2.3.9 Dot Blotting 20
2.2.3.10 Lam Aglütinasyon Metodu 20
3 Materyal ve Metod 22
3.1 Bakteriyel Suşların Temini 22
3.2 İmmünizasyon için Antijenlerin Hazırlanması 22
3.3 Antiserum Eldesi 27
3.4 Termostabil Somatik "O" Antijenlerinin Hazırlanması 29
3.5 Lam Aglütinasyon Metodu 29
4 Bulgular 30
4.1 Lam Aglütinasyon Sonuçları 30
4.1.1 *Vibrio anguillarum* Suşlarının Lam Aglütinasyon Sonuçları 31
4.1.2 *Yersinia ruckeri* Suşlarının Lam Aglütinasyon Sonuçları 35

4.1.3 *Lactococcus garvieae* Suşlarının Lam Aglütinasyon Sonuçları..... 38

4.1.4 Termostabil "O" Antijeni ile *Vibrio anguillarum* Suşlarının Lam Aglütinasyon Testi 39

4.1.5 Termostabil "O" Antijeni ile *Yersinia ruckeri* Suşlarının Lam Aglütinasyon Testi 41

4.2 Kullanılan Suşların Biyokimyasal Test Sonuçları..... 42

5 Tartışma 46

6 Sonuç 54

Kaynaklar 55

Ekler 71

Ek A Tezden Üretilmiş Yayınlar 72

Ek B Etik Kurul Onayı 73

Özgeçmiş 74

Şekiller Listesi

Şekil 1.1 Hastalık etkeninin teşhisi için kullanılan yöntemlerin uygulanma aşamaları 2

Şekil 2.1 *V. anguillarum* ile enfekte balığın klinik ve otopsi bulguları; A: Vücut üzerinde hemorajiler; B: Operkulum ve yüzgeç etrafında hemorajiler; C: Ülser; D: Karaciğerde peteşiyal hemorajiler 5

Şekil 2.2 *Y. ruckeri* ile enfekte balığın klinik ve otopsi bulguları; A: *Y. ruckeri* ile enfekte gökkuşağı alabalığının ağız bölgesinde ve dil üzerinde hemorajiler; B: Karaciğerde hemoraji, mukoz sıvı ile dolu yangılı hemorajik bağırsak. 9

Şekil 2.3 *L. garvieae* ile enfekte balığın klinik ve otopsi bulguları; A: Pilorik kese serozal yüzeyinde peteşiyal kanamalar; B: Gözde hemorajiler; C: Melanosis, ekzoftalmus; E: Yüzgeç kaidelerinde ve deride hemorajiler; D: Karaciğerde ve bağırsakta hemoraji; F: Asites 12

Şekil 2.4 *E. seriolicida* KG^- ve KG^+ suşlarının hücre yüzeyi morfolojisinde görülen farklılıklar; KG^- suşlarının hücre yüzeyinde görülen kümeleşme (1,2); KG^+ suşların hücrelerinin yüzeyinin görünümü (3,4) 13

Şekil 2.5 *E. seriolicida*'nın KG^- ve KG^+ suşlarına ait elektron mikrografları; A: KG^- suşu; B: KG^+ suşu 14

Şekil 2.6 Lam aglütinasyon ve tüp aglütinasyon metodunda göz ile görülebilen aglütinasyon 21

Şekil 3.1 Referans suşların katı besiyerinde üretilmesi; A: *Y. ruckeri* ATCC 29473; B: *V. anguillarum* ATCC 43305; C: *L. garvieae* ATCC 49156; D: *L. garvieae* C3 23

Şekil 3.2 A: TSB'de gece boyunca inkübe edilen bakteri inaktivasyonu; B-C: Formaldehit ilave edilen TSB'nin çalkalayıcıda karıştırılması ve santrifüj tüplerine aktarılması 24

Şekil 3.3 A: Santrifüj işlemi; B-C: Santrifüjden sonraki pelet görüntü ve süpernatantın ortamdan uzaklaştırıldıktan 24

Şekil 3.4 A-B-C: Örneklerin %0,3 formaldehit ile yıkanması; D-E-F: Vorteksleme ve santrifüj işlemleri 25
Şekil 3.5 A-B: Pelet görüntü ve süpernatantın ortamdan uzaklaştırılması 25
Şekil 3.6 A-B: %0,3 formaldehit ile ikinci yıkama; C-D: Santrifüj işlemi 26
Şekil 3.7 A-B: İkinci yıkama sonrası dibe çöken pelet görüntü; C: Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonraki peletin görüntüsü 26
Şekil 3.8 A: Tüplere PBS eklenmesi; B: Vortekslenmesi; C: Santrifüj edilmesi; D: Santrifüj sonrası görünüm; E: Süpernatantın ortamdan uzaklaştırılmasından sonraki görünüm; F: Yoğunluğun McFarland No.3 (10^8 hücre/ml) olarak ayarlanması. 27
Şekil 3.9 A-B-C: Antiserum eldesi için hazırlanan antijenlerin tavşanlara intravenöz enjeksiyonla verilmesi 28
Şekil 3.10 A-B-C: Son enjeksiyondan bir hafta sonra tavşanlardan kan alınması ve elde edilen antiserum 28
Şekil 4.1 Lam aglütinasyon testlerin değerlendirilmesi; A: Pozitif sonuç; B: Negatif sonuç 30
Şekil 4.2 Pozitif aglütinasyon; A: x4 görünümü; B: x10 görünümü (Işık mikroskobu) 31
Şekil 4.3 ATCC 43305, V37, SVA kodlu *V. anguillarum* suşlarının aglütinasyonu 32
Şekil 4.4 V3, V12, V13, V17, V20, V22 kodlu *V. anguillarum* suşlarının aglütinasyonu 32
Şekil 4.5 V24, V29, V31, V32, V34, V35 kodlu *V. anguillarum* suşlarının aglütinasyonu 33
Şekil 4.6 Y1, Y3, Y6, Y12, Y31, Y32 kodlu *Y. ruckeri* suşlarının aglütinasyonu .. 35
Şekil 4.7 Y33, Y34, Y35, Y36, Y37, YR5 kodlu *Y. ruckeri* suşlarının aglütinasyonu 36
Şekil 4.8 YR241118, C26, C27, C29, S31, KYB, ATCC 29473 kodlu *Y. ruckeri* suşlarının aglütinasyonu 36
Şekil 4.9 *L. garvieae* suşlarının Türk KG- (C3) antiserumu ile aglütinasyonu 39

Tablolar Listesi

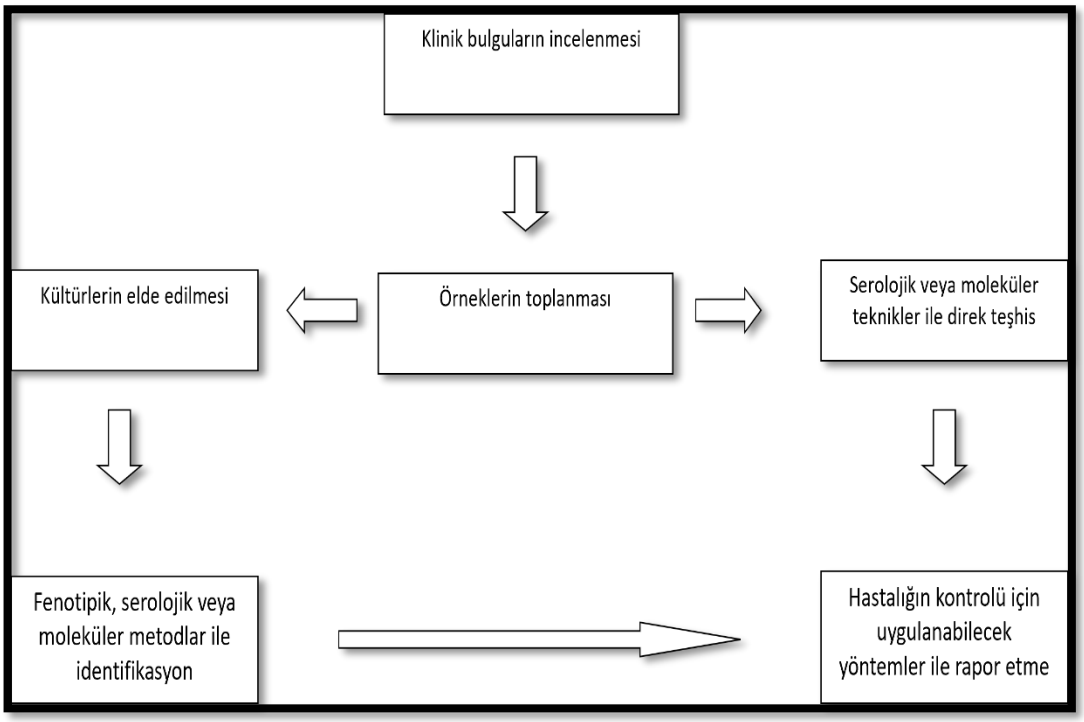
Tablo 2.1 Literatürde Serotip O1, O2 ve O3'ün farklı kodlarla yapılmış olan tanımlamaları 7
Tablo 4.1 *V. anguillarum* suşları ile gerçekleştirilen lam aglütinasyon sonuçları ... 34
Tablo 4.2 *Y. ruckeri* suşları ile gerçekleştirilen aglütinasyon sonuçları..... 37
Tablo 4.3 *L. garvieae* suşlarının lam aglütinasyon sonuçları..... 38
Tablo 4.4 *V. anguillarum* suşlarının termostabil O antijeni ile gerçekleştirilen lam aglütinasyon testi sonuçları 40
Tablo 4.5 *Y. ruckeri* suşlarının termostabil O antijeni ile gerçekleştirilen lam aglütinasyon testi sonuçları 41
Tablo 4.6 Stok kültürlerden pasajlanan *V. anguillarum* suşlarının morfolojik ve API 20E test profilleri..... 43
Tablo 4.7 Stok kültürlerden pasajlanan *Y. ruckeri* suşlarının morfolojik ve API 20E test profilleri 44
Tablo 4.8 Stok kültürlerden pasajlanan *L. garviae* suşlarının morfolojik ve API Rapid ID 32 STREP test profilleri 45
Tablo 5.1 Salmonid türlerden izole edilen *V. anguillarum* suşlarının serotipleri..... 47
Tablo 5.2 Dünya'nın farklı bölgelerinde *V.anguillarum* suşlarının serolojik dağılımları üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler. 49
Tablo 5.3 Türkiye'de izole edilen *V. anguillarum* suşlarının serolojik dağılımları üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler. 49
Tablo 5.4 Dünya'nın farklı bölgelerinde *Y. ruckeri* suşlarının serolojik dağılımları üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler 52
Tablo 5.5 Türkiye'de izole edilen *Y.ruckeri* suşlarının serolojik dağılımları üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler 52

BÖLÜM 1

Giriş

Balıklarda hastalıklar patojen, konakçı ve çevre arasındaki dengenin bozulması durumunda oluşmaktadır [1]. Farklı coğrafi bölgelerde yetiştiriciliği yapılan balık türlerinde Gram-negatif ve Gram pozitif bakterilerin hastalık vakalarından izole edildiği rapor edilmiştir [2, 3]. Balık hastalıklarının ortaya çıkmasında genetik bozukluklar, fiziksel hasarlar, beslenme bozuklukları, patojenler ve kirlilik gibi faktörler rol almaktadır. Epizootiyoloji açısından balıklarda meydana gelen hastalıklar dört grupta kategorize edilmektedir; balık popülasyonlarında vakaların düzensiz, tesadüfi, seyrek aralıklar ile ortaya çıkmasına sporadik hastalıklar, belirli bir coğrafi bölgede kısa sürede geniş salgın oluşturmasına epizootik hastalıklar, geniş coğrafi alanlarda büyük ölçekli salgınlara sebep olanlara panzootik hastalıklar, belirli bölgelerde küçük çaplı, sürekli veya ara sıra tekrar eden salgınlara ise enzootik hastalıklar olarak isimlendirilmektedir [4]. Aniden oluşan ve yüksek mortalite ile seyrederek aynı hızla sona eren salgınlara akut hastalıklar, ölümlerin daha seyrek olduğu ancak daha uzun zaman zarfında devam eden salgınlara ise kronik hastalıklar adı verilmektedir [5]. Enfeksiyöz bakteriyel patojenler birçok taksonomik gruptan bildirilmiş, ancak az sayıda bakteriyel balık patojeni farklı coğrafi bölgelerde yetiştiriciliği yapılan balık türlerinde ciddi ekonomik kayıplar ile ilişkilendirilmiştir [6]. Dünyada gökkuşağı alabalığı işletmelerinde hastalık yapan önemli bakteriyel patojenler *Listonella anguillarum, Lactococcus garvieae, Yersinia ruckeri, Aeromonas hydrophila, Flavobacterium columnaris, Pseudomonas fluorescens* ve *Flavobacterium psychrophilum* olarak bildirilmiştir [7]. Türkiye'de ise gökkuşağı alabalığında görülen önemli bakteriyel balık hastalıkları Yersiniosis, Vibriosis, Lactococcosis, Flavobacteriosis ve motil Aeromonas septisemi olarak rapor edilmiştir [8].

Balık hastalıklarında, veterinerlikte ve insan sağlığında uygulanan prosedürlerden farklı olarak salgınlar meydana geldiğinde kontrol uygulamalarına başlanmadan önce patojenin en hızlı şekilde tanımlanması amaçlanmaktadır [2]. Hastalık etkeni patojenler konakçı üzerinde ülser, erozyon ve hemorajik septisemi dahil birçok klinik belirti göstermekte, bu belirtilerin bazıları hastalıkların karakteristik bulgusu olabilmektedir [1, 2]. Balık hastalıklarında patojenlerin teşhisi konakçıda meydana gelen klinik belirtilerden, otopsi bulgularından, histopatolojik ve mikrobiyolojik incelemelerden alınan veriler değerlendirilerek yapılabilmektedir (Şekil 1.1) [3]. Enfeksiyöz balık hastalıklarının geleneksel yöntemler kullanılarak teşhisi mikroorganizmaların saf kültürlerinin elde edilmesi ile yapılmakta, ancak bakteriyel, fungal, viral enfeksiyonların izolasyon ve teşhisinin fazla zaman almasından dolayı tedavi olumsuz etkilemektedir. Bu durum serolojik ve moleküler yöntemlerin etken patojenlerin hızlı identifikasyonu için kullanılmasının önünü açmıştır [9].



Şekil 1.1: Hastalık etkeninin teşhisi için kullanılan yöntemlerin uygulanma aşamaları [3]

Serolojik yöntemler, özellikle aglütinasyon testleri birçok patojenin teşhisi için gereken süreyi günlerden saatlere düşürmekte ve balık hastalıklarının hızlı teşhisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Lam aglütinasyon metodu ile *Aeromonas salmonicida*'nın identifikasyonunun Rabb ve diğ. [10] tarafından gerçekleştirilmesinden itibaren bu yöntem birçok bakteriyel balık patojeni için uygulanmıştır [11, 12]. Bununla beraber floresan antikor testi, lam aglütinasyon testi, lateks aglütinasyon testi, Geck testi ve ELISA'nın poliklonal antikorlar ile kullanıldığında güvenilir sonuçlar verdiği bildirilmiştir [3, 13].

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Bakteriyel Balık Hastalıkları

2.1.1 Vibriosis

2.1.1.1 *Vibrio (Listonella) anguillarum*'un Tanımı ve Tarihçesi

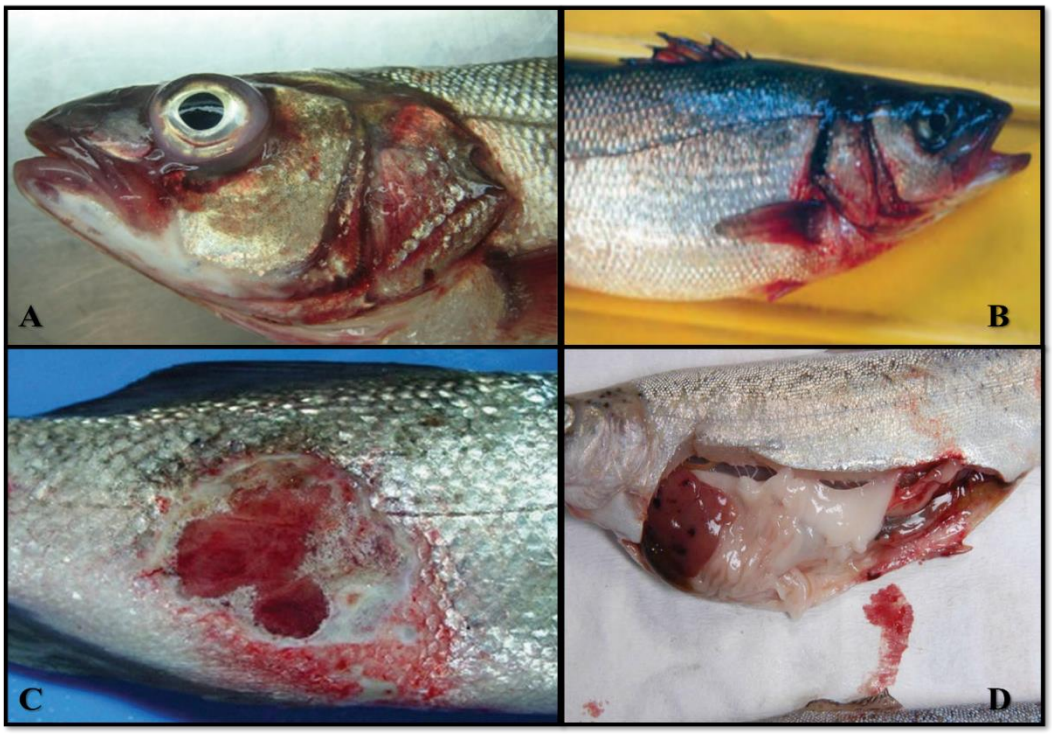
İlk kez 1718 yılında yılan balıklarında "Red-pest" olarak tanımlanan bu hastalık Avrupa literatüründe rapor edilen ilk bakteriyel balık hastalığı olarak bilinmektedir. Ancak hastalığın ilk detaylı incelemesi Drouin de Bouville [14] tarafından yapılmıştır. Red-pest hastalığının etkeni *pestis rubra anguillarum erysipelosis anguillarum* olarak da adlandırılmış ve 18-19. yüzyıllarda İtalya'da denizde kapalı alanlarda tutulan yılan balıklarında ciddi kayıplara sebep olmuştur. Hastalık etkeninin ilk kez tanımlanması ise Canestrini tarafından 1893 yılında *Bacterium anguillarum* olarak yapılmıştır [15]. Fakat etken daha sonra Bergman [16] tarafından İsveç'te ortaya çıkan başka bir salgında hasta yılan balıklarından izole edilmiş ve *Vibrio anguillarum* (*V. anguillarum*) olarak isimlendirilmiştir. İlerleyen yıllarda yapılan moleküler çalışmalarda McDonell ve Colwell [17] rRNA filogenetik incelemeler ile etkenin *Listonella* cinsine dahil edilmesini önermiştir ve *Listonella anguillarum* (*L. anguillarum*) olarak yeniden adlandırılmıştır. Hastalığın "Ulcer-disease" [18], "Salt-water furunculosis" [19], "boil-disease" [20], "Hitra-disease" [21] ve uluslararası kabul edilen ismi Vibriosis dahil olmak üzere birçok farklı isimlendirilmesi yapılmıştır [2].

V. anguillarum Türkiye'de ilk kez 1993 yılında çipura balıklarında tespit edilmiş [22, 23], daha sonra gökkuşağı alabalığından ise 2007 yılında izolasyonu gerçekleşmiştir [24].

2.1.1.2 *Vibrio anguillarum*'un Klinik ve Otopsi Bulguları

Hastalığın balık üzerindeki klinik belirtileri (Şekil 2.1) solungaç lamellerinde şişkinlik, uyuşukluk, anüs etrafında ve yüzgeç kaidelerinde hemorajidir [25-28]. Perakut vakalarda yavru balıklarda, iştahsızlık, renkte koyulaşma ve ani ölümler, akut formunda ise anüs etrafında ve yüzgeç kaidelerinde yoğun hemorajik lezyonlar, kaslarda yer yer ülserler ve şişkinlikler görülmektedir. Kronik vakalarda ise pelvik yüzgeç, pektoral yüzgeç, operkulum, anüs çevresinde, vücudun ventralinde ve ağız çevresinde kızarıklık şeklinde yoğun hemorajiler bildirilmiştir [25, 28-32].

Etken ile enfekte balığın otopsi bulgularında ise karaciğer ile dalakta büyüme ve nekroz, iç organlarda hemoraji ve hiperemi, kas duvarlarında peteşiyel hemoraji ve periton boşluğunda kanlı eksudat birikimi bildirilmiştir (Şekil 2.1) [5].



Şekil 2.1: *V. anguillarum* ile enfekte balığın klinik ve otopsi bulguları; A: Vücut üzerinde hemorajiler [33]; B: Operkulum ve yüzgeç etrafında hemorajiler [34]; C: Ülser [33]; D: Karaciğerde peteşiyal hemorajiler [35]

2.1.1.3 *Vibrio anguillarum*'un İzolasyonu ve Teşhisi

Etkenin enfekte dokulardan, %0,5- 3,5 (w/v) NaCI ile zenginleştirilerek hazırlanan Tyriptic Soy Agar (TSA), Brain Heart Infusion Agar (BHIA), Nutrient Agar (NA) ve Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar'a yapılan inokulasyon sonucu 15-25ºC sıcaklıkta 24-48 saat inkübe edilmesi ile izolasyonun gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir. *V. anguillarum*'un selektif besiyeri olan TCBS'de sarı renkli (sukroz pozitif) koloniler, diğer selektif olmayan besiyerlerinde ise beyaz/krem renginde koloniler oluşturduğu rapor edilmiştir [36, 37].

V. anguillarum'un teşhisi için ilk olarak fenotipik yöntemlerden, biyokimyasal testlerden ve spesifik antiserumların kullanıldığı serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Kesin teşhis için ise moleküler yöntemlerin (16S rRNA) kullanılması gerekmektedir [1, 37].

2.1.1.4 *Vibrio anguillarum*'un Serolojisi

Serolojik olarak farklılıkları ayırt etmek için termostabil O antijenine (lipopolisakkaritlere [LPS]) dayalı serolojik incelemelerde Pacha ve Kiehn [38] *V. anguillarum*'un üç serotipini Kuzeybatı salmonid vibrioları (Serotip 1), Avrupa vibrioları (Serotip 2) ve Pasifik ringa vibrioları (Serotip 3) olarak tanımlamıştır. Pacha ve Kiehn'in *V. anguillarum*'un farklı serotipleri üzerine yaptığı çalışmadan sonra farklı coğrafi bölgelerden *V. anguillarum*'un serolojisi ile ilişkili birçok bildirim yapılmıştır; 1986 yılına kadar Norveç'ten üç serotip [39], Amerika Birleşik Devletleri'nden iki veya üç serotip [40] ve Japonya'dan 6 serotip [41] bildirilmiştir. Ortak bir serotipik tanımlama sistemi oluşturmak ve uluslararası çalışmaların koordinasyonunu sağlamak için Sorensen ve Larsen [42] O antijenine dayalı 1'den 10'a kadar Arap rakamlarının kullanıldığı "O" harfi ile gösterilen yeni bir şema oluşturmuş, Japonya ve Tayvan dışında birçok ülkede bilim insanları tarafından kabul görmüştür. İlerleyen zamanlarda serotip O2 ile yapılan incelemeler sonucunda O antijenine dayalı iki farklı serolojik reaksiyon tespit edilmiş ve serotip O2 (O2α, O2β) alt sınıflara ayrılmıştır [43]. Avrupa'da tanımlanmış [42] O1-O10 kodlu suşlar ile Japonya'da tiplendirilen [41, 44] suşların karşılaştırılması Grisez ve Ollivier [45] tarafından antijen-antikor ilişkilerine göre incelenmiş, Avrupa'da tanımlanan serotip O1'in Japonya sisteminde tiplendirilen serotip C ile, serotip O2'nin serotip A ile, serotip O3'ün ise serotip B ile aynı serotip

olduğu rapor edilmiştir (Tablo 2.1). Ancak Japonya'da tiplendirilen serotiplerin (D-I) Avrupa'da tanımlanmış serotipler ile reaksiyona girmediği tespit edilmiş ve Sorensen ve Larsen'in yapmış olduğu serotipik şemaya eklenerek serotip O11-16 olarak tanımlanmıştır. VaNT1[a], VaNT2[a], VaNT7[a] kodlu suşlar Danimarka'da gökkuşağı alabalığından, VaNT5[a] Danimarka'da yılan balığından, OX_1[b], OX_3[b] Yunanistan'da çipura balığından OX_4[b], OX_5[b], OX_6[b] İspanya'da levrek balığından izole edilmiş ve daha önce tanımlanmış olan serotip O1-O16 suşlarının antiserumları ile oluşturdukları antijen-antikor reaksiyonları incelenmiştir. Aglütinasyon testlerinde reaksiyon vermeyen suşlar VaNT4[a] = O18, VaNT5[a]= O19, VaNT7[a] ve OX_1[b] =O20, OX_3[b] =O21, OX_4[b] =O17, OX_5[b] =O22, OX_6[b] =O23 olarak serotipik şemaya dahil edilmiştir [46].

Farklı coğrafi bölgelerde ortaya çıkan Vibriosis salgınlarında hasta balıklardan baskın olarak serotip O1 ile O2'nin ve daha az oranla serotip O3'ün izole edildiği rapor edilmiştir [34]. Bu serotipler arasında Serotip O1'in homojenik bir yapıda olduğu ve birçok balık türünde hastalık oluşturduğu, heterojen bir yapıda olan serotip O2 ve O3'te (O2a, O2b, O3A, O3B) ise O2a'nın salmonidler ve salmonid olmayan balık türlerinden, O2b'nin genellikle deniz balıklarından, O3A'nın yılan ve ayu balığından, O3B'nin ise genellikle çevresel kaynaklardan izole edildiği tespit edilmiştir [37]. Türkiye'de ise su ürünleri yetiştiriciliği yapılan balık çiftliklerinde *V. anguillarum*'un baskın serotipinin O1 olduğu bildirilmiştir [24, 47-49].

Tablo 2.1: Literatürde Serotip O1, O2 ve O3'ün farklı kodlarla yapılmış olan tanımlamaları [45]

	O1	O2	O3
Pacha ve Kiehn [38]	Kuzeybatı salmonid vibrioları	Avrupa vibrioları	
Harrel ve diğ. [50]	Tip 775	Tip 1669	
Johnsen [39]	Tip HI 10	Tip NCIMB 6	
Strout ve diğ. [40]	775 ve 507 grubu	569 grubu	
Gould ve diğ. [51]	Hızlı-üreyen 775	Yavaş-üreyen 1669	
Ezura ve diğ. [52]	J-O-3	J-O-1	J-O-2
Baudin Laurencin [53]	VA 408		
Kitao ve diğ. [41]	C	A	B
Chart ve Trust [54]	I	II	III
Sorensen ve Larsen [42]	O1	O2	O3
Goerlich [55]	I	II	
Song ve diğ. [56]	T-O-I	T-O-V	T-O-VI

2.1.2 Yersiniosis/ Enterik Kızılağız Hastalığı

2.1.2.1 *Yersinia ruckeri*'nin Tanımı ve Tarihçesi

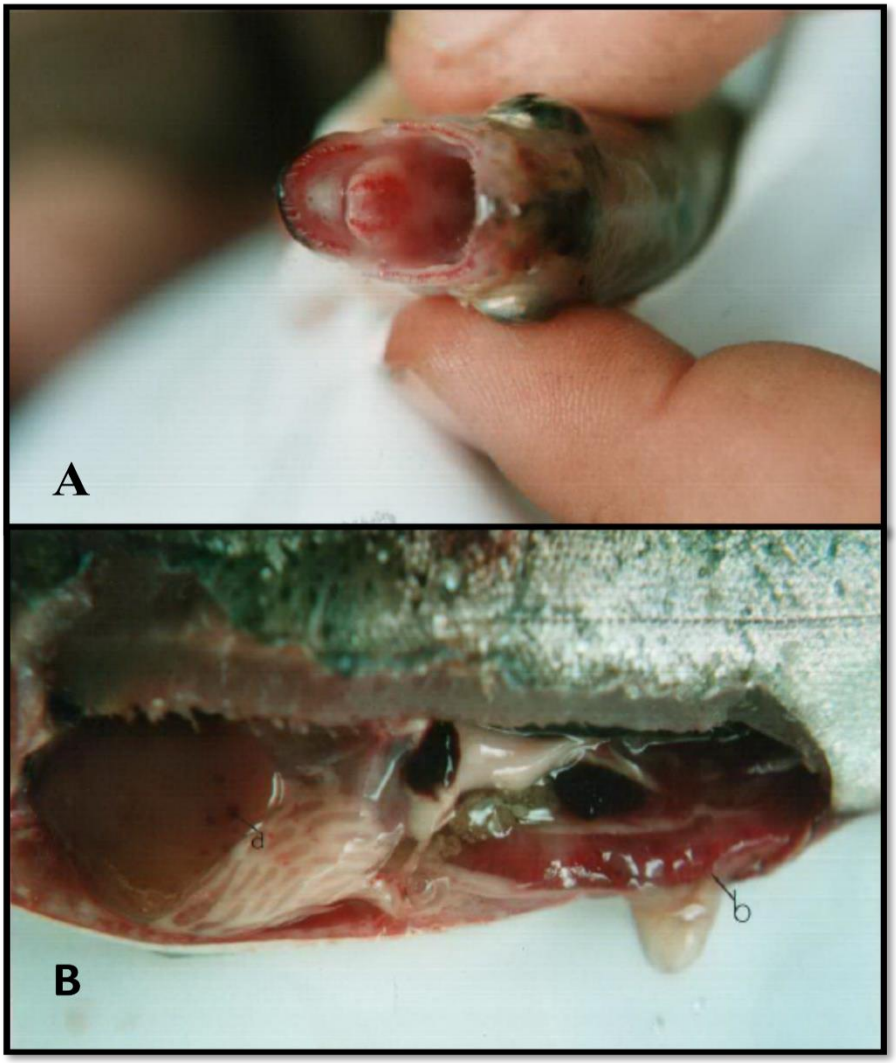
Gram-negatif *Enterobacteriaceace* familyası üyesi olan *Yersinia ruckeri (Y. ruckeri)*, Enterik Kızılağız hastalığının (ERM) etiyolojik etkenidir ve farklı coğrafi bölgelerde çeşitli balık türlerinden izole edildiği bildirilmiştir [57-59]. Balık çiftliklerinde yetiştiriciliği yapılan salmonid türleri, özellikle gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss,* Walbaum) ve Atlantik somonu (*Salmo salar*) etkene karşı duyarlı türlerdir. Oluşan salgın hastalıklarda ciddi ekonomik kayıplar rapor edilmiştir [60].

ERM, gökkuşağı alabalığında "kızılağız" ismini aldığı ağız çevresinde oluşan hemorajiler ile karakterize edilmiştir [57, 58, 61]. Ancak Atlantik somon yetiştiriciliği yapılan balık çiftliklerinde Yersiniosis vakalarının tek veya çift ekzoftalmus ve iris tabakasında görülen hemoraji ile seyrettiği tespit edilmiştir [62-64]. *Y. ruckeri* ilk kez 1950'li yılların başında Amerika Birleşik Devletleri'nde, Idoha eyaletindeki Hagerman Vadisinde bir gökkuşağı alabalığı (*Salmo gairdneri,* Richardson) işletmesinden izole edilmiştir [57, 65]. Kısa zaman içerisinde farklı ülkelerden rapor edilmeye başlanan *Y. ruckeri* Türkiye'de ise ilk defa Çağırgan ve Yüreklitürk tarafından 1990 yılında gökkuşağı alabalığından izole edilmiştir [66].

2.1.2.2 *Yersinia ruckeri*'nin Klinik ve Otopsi Bulguları

Etken ile enfekte balığın klinik bulgularında tipik olarak, yüzeye yakın yüzme, letarji, iştahsızlık, deride yaygın hemorajiler, yüzgeç kaidelerinde ve göz çevresinde hemorajiler, ekzoftalmus, lateral çizgide kızarıklık, baş bölgesinde ve ağızda dil üzerinde hemorajiler görüldüğü bildirilmiştir (Şekil 2.2) [61].

Y. ruckeri ile enfekte balığın otopsi bulgularında ise karaciğerde, piloik sekada, hava kesesinde, leteral kaslarda peteşiyel hemorajiler, dalakta büyüme, bağırsakta iltihaplanma, abdomende şişlik rapor edilmiştir (Şekil 2.2) [61, 67-69].



Şekil 2.2: *Y. ruckeri* ile enfekte balığın klinik ve otopsi bulguları; A: *Y. ruckeri* ile enfekte gökkuşağı alabalığının ağız bölgesinde ve dil üzerinde hemorajiler [70], B: Karaciğerde hemoraji, mukoz sıvı ile dolu yangılı hemorajik bağırsak [70].

2.1.2.3 *Yersinia ruckeri*'nin İzolasyonu ve Teşhisi

Hasta balıklardan BHIA veya TSA'ya inoküle edilen patojenin 20-25 ºC' de 48 saat inkübasyonu sonrasında 2-3mm çapında, yuvarlak, beyazımsı koloni görünümü oluşturduğu rapor edilmiştir [57]. Buna ek olarak etken için selektif olarak kabul edilen Waltman-Shotts besiyerinde patojenin Tween 80'i hidrolize etmesi sonucu koloniler etrafında çözünmeyen kalsiyum tuzları çökelti oluşturmaktadır [28].

Y. ruckeri'nin teşhisinin geleneksel yöntemler, serolojik testler ve moleküler metotlar ile gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir [61].

2.1.2.4 *Yersinia ruckeri*'nin Serolojisi

Y. ruckeri serotip I "Hagerman suşu" en çok izole edilen suş olmakla birlikte en virülent suş olarak da bilinmektedir [57]. O'Leary [71] tarafından *Oncorhynchus tshawytscha*'dan izole edilen *Y. ruckeri* suşları serotip I ile aglütinasyon vermediği tespit edilerek serotip II olarak tanımlanmıştır. Avustralya'da izole edilen ancak serotip I ve II antiserumları ile reaksiyona girmeyen *Y. ruckeri* suşu yapılan incelemeler sonucu serotip III olarak rapor edilmiştir [72]. İlerleyen zamanlarda Stevenson ve Airdrie [73] Ontario'da izole ettikleri *Y. ruckeri* suşunun tanımlı serotiplerin antiserumları ile reaksiyona girmediğini bildirerek serotip IV olarak tanımlamıştır. Colorado'da gökkuşağı alabalığından izole *Y. ruckeri* suşunun ise zayıf aglütinasyon verdiği tespit edilerek serotip V olarak bildirilmiştir [73]. Daly ve diğ. [74] izole ettikleri *Y. ruckeri* suşunun tanımlı olan diğer serotipler ile aglütinasyon vermediğini rapor etmiş ve bu suşu Serotip VI olarak tanımlamıştır. *Y. ruckeri*'nin termostabil O-antijenleri ile serolojik farklılığına ilişkin ilk detaylı çalışma Davies [75] tarafından yapılmıştır. Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya ve Güney Afrika'dan temin edilen hasta balıklardan izole edilmiş *Y. ruckeri* suşlarının aglütinasyon sonuçlarını değerlendirerek *Y. ruckeri* için yeni bir serolojik şema (serotip O1, O2, O5, O6 ve O7) oluşturmuştur. Serolojik incelemeler sonucu serotip O3'ün aslında serotip O1 olarak tanımlandığı ve O4 serotipinin ise De Grandis ve diğ. [76] tarafından farklı bir patojen olarak teşhis edilmesinden dolayı Davies'in yaptığı yeni şemaya serotip O3 ve O4 olarak dahil edilmediği bildirmiştir. Romalde ve diğ. [77] alt gruplardan oluşan yeni bir serolojik şema sunmuş ve bu çalışmada alt grupları bulunan dört serotip tanımlanmıştır; serotip O1 (a, b), serotip O2 (a, b, c), serotip O3, serotip O4. *Y. ruckeri*'nin serolojisine dair yapılan çalışmalarda bu iki serotipik şema da yaygın olarak kullanılmaktadır [61]. Daha sonra Ormsby ve diğ. [78] hasta balıklardan izole edilmiş olan 135 *Y.ruckeri* suşunun serolojik dağılımlarını incelediği araştırmada Davies'in tanımladığı serotiplere ek olarak serotip O8'i tanımlamıştır.

Türkiye'de *Y. ruckeri'*nin tanımlanan serotipleri arasında en çok izole edilen serotipin O1 olduğu bildirilmiştir [79-81].

2.1.3 Lactococcosis

2.1.3.1 *Lactococcus garvieae*'nin Tanımı ve Tarihçesi

Kusuda ve diğ. [82] Japonya'da yetiştiriciliği yapılan sarıkuyruklardaki (*Seriola quinqueradiata*) salgın hastalıktan izole edilen patojeni *Streptococcus* sp. olarak tanımlamıştır [83]. *Streptoccus garvieae* ise 1983 yılında ilk kez Birleşik Krallık 'da bovine mastitis araştırmaları sırasında tanımlanmıştır [84]. Kusuda ve diğ. [85] Japonya'da *Anguilla anguilla* ve *Seriola quinqueradiata*'dan izole edilen ancak türü teşhis edilemeyen *Streptococcus* sp. etkenlerini 1991 yılında yeni bir tür olarak *Enterecoccus seriolicida (E. seriolicida)* ismi ile tanımlanmıştır. İlerleyen zamanlarda yapılan fenotipik ve moleküler çalışmaların değerlendirilmesi ile *E. seriolicida* olarak adlandırılan bu bakterinin *Lactococcus garvieae (L. garvieae)*'nin alt bir türü olarak yeniden sınıflandırılması yapılmıştır [86-89]. Hasta balıklardan izole edilen suşların öncelikle insanlarda da hastalığa sebep olan *Lactococcus lactis subsp. lactis* [84, 86, 90, 91] ile benzerlik gösterdiği bildirilmiş, daha sonra Enterekok-benzeri bakteri şeklinde tanımlanmıştır [92, 93]. Bu patojenin iki serotipinin bulunduğu bildirilmiş olup, serotipler arasındaki farklılık suşlarda kapsül varlığı (KG^-: kapsüllü ve KG^+: kapsülsüz) ile ilişkilendirilmiştir [94-97].

L. garvieae Türkiye'de ise ilk kez Çağırgan ve Tanrıkul [98] tarafından gökkuşağı alabalığından izole edilmiş ve *Enterococcus* benzeri bir bakteri olarak tanımlanmıştır. Ancak *L. garvieae* olarak ilk identifikasyon 2001 yılında Ege Bölgesinde gökkuşağı alabalığından gerçekleşmiştir [99].

2.1.3.2 *Lactococcus garvieae*'nin Klinik ve Otopsi Bulguları

L. garvieae'nin klinik belirtileri salmonidlerde tipik olarak iştahsızlık, eratik yüzme, letarji, tek veya çift taraflı ekzoftalmus, göz içinde kanama ve bulanıklık, asites, melanosis, operkul ve anüs etrafında hemorajiler olarak bildirilmiştir (Şekil 2.3) [97].

Etken ile enfekte balığın otopsi bulgularında, nekrotik büyümüş dalak, solgun karaciğer, bağırsakta hemoraji, karın boşluğunda iltihaplanmış sıvı veya kanlı eksüdat tespit edilmiştir (Şekil 2.3) [97].

Şekil 2.3: *L. garvieae* ile enfekte balığın klinik ve otopsi bulguları; A: Pilorik kese serozal yüzeyinde peteşiyal kanamalar [100]; B: Gözde hemorajiler [2]; C: Melanosis, ekzoftalmus; E: Yüzgeç kaidelerinde ve deride hemorajiler [101]; D: Karaciğerde ve bağırsakta hemoraji [101]; F: Asites [102]

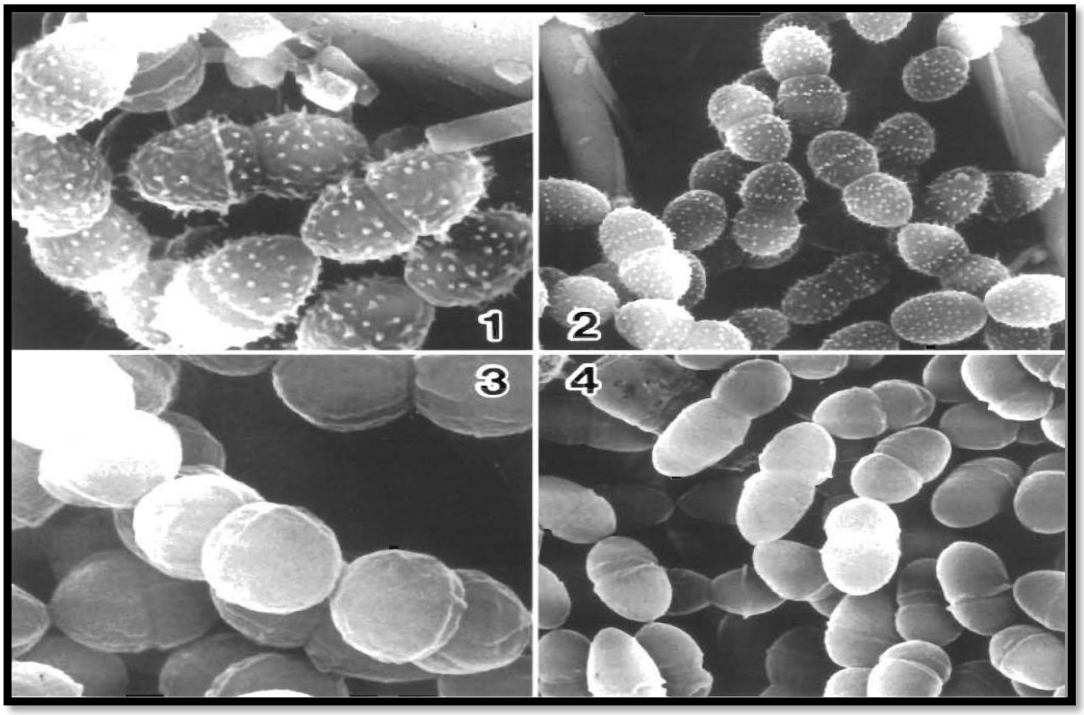
2.1.3.3 *Lactococcus garvieae*'nin İzolasyonu ve Teşhisi

Columbia Agar [103], TSA [104], BHIA [105] ve NA [85]'a hasta balığın iç organlarından aseptik olarak gerçekleştirilen ekimler ile etken izole edilebilmektedir. Ayrıca genel besiyerlerinin %5'(v/v) kan ile zenginleştirilmesi ile daha iyi bir üremenin görüldüğü rapor edilmiştir [106].

L. garvieae'nin ön teşhisi mikrobiyolojik, biyokimyasal ve serolojik testler (lam aglütinasyon metodu [94] veya floresan antikor boyama [107] dahil olmak üzere birçok yöntem) ile yapılabilmektedir. Kesin teşhis için ise moleküler identifikasyon gereklidir [97].

2.1.3.4 *Lactococcus garvieae*'nin Serolojisi

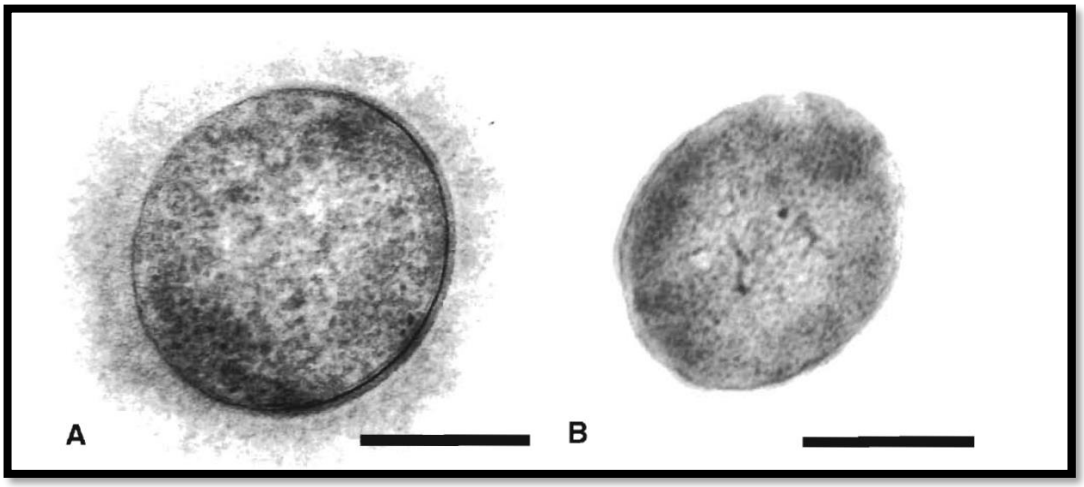
L. garvieae serolojik olarak KG^- ve KG^+ olarak iki serolojik fenotipe ayrılmış ve bu serotiplerin lam aglütinasyon testlerinde farklı reaksiyon verdiği bildirilmiştir. Bu serotipler arasında KG^+ suşlarının hem KG^- antiserumları ile hemde KG^+ antiserumları ile aglütinasyon verdiği, ancak KG^- suşlarının sadece KG^- antiserumları ile reaksiyona girdiği bildirilmiştir [94]. Antijen- antikor reaksiyonlarında tespit edilen bu farklılığın, KG^- suşlarında aglütinasyonu inhibe eden zarf benzeri bir yapıdan kaynaklandığı düşünülmüştür [94]. İlerleyen zamanlarda yapılan araştırmalarda bu iki serotipin hücre morfolojisinde farklılıklar belirlenmiş, KG^- suşlarınının hücre yüzeyinde kümeleşme benzeri bir yapı tespit edilirken, KG^+ suşlarında pürüzsüz bir hücre yüzeyi olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.4) [95].



Şekil 2.4: *E. seriolicida* KG^- ve KG^+ suşlarının hücre yüzeyi morfolojisinde görülen farklılıklar. KG^- suşlarının hücre yüzeyinde görülen kümeleşme (1,2); KG^+ suşların hücrelerinin yüzeyinin görünümü (3,4) [95]

Yoshida ve diğ. [96] KG^- suşlarında bulunan kümeleşme benzeri yapının kapsül materyali olduğunu bildirmiştir (Şekil 2.5). İlerleyen zamanlarda Japonya'da ve Avrupa'da hasta balıklardan izole edilmiş kapsüllü ve kapsülsüz *L. garvieae* suşlarının antijen-antikor reaksiyonları Barnes ve Ellis [108] tarafından incelemiştir. Japonya

kökenli kapsüllü *L. garvieae* suşların sadece Japonya orjinlikapsüllü antiserum ile reaksiyona girdiği, benzer bir şekilde Avrupa kökenli kapsüllü suşlarında sadece Avrupa kapsüllü antiserum ile aglütinasyon oluşturduğu tespit edilmiş ve *L. garvieae*'nin Japon kapsüllü, Avrupa kapsüllü, her iki bölgeden ortak bir kapsülsüz serotip olmak üzere üç serotipe ayrılabileceği rapor edilmiştir. Oinaka ve diğ. [109] Japonya'da 2012-2013 yıllarında aşılı ve aşısız hasta sarıkuyruklarda *L. garvieae* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu suşun referans suşlardan üretilen antikorlar (KG^- ve KG^+) ile yaptıkları lam aglütinasyon testlerinde reaksiyon vermediğini tespit eden araştırmacılar, etken patojeni moleküler yöntemler ile *L. garvieae* olarak identifiye ettiklerini ve daha önce Japonya'da bildirilen serotiplerden farklı bir serotipte olabileceğini bildirmişlerdir.



Şekil 2.5: *E. seriolicida*'nın KG^- ve KG^+ suşlarına ait elektron mikrografları. A: KG^- suşu; B: KG^+ suşu [96]

2.2 Bakteriyel Balık Hastalıklarında Teşhis Yöntemleri

2.2.1 Geleneksel Testler

Bakteriyel patojenlerin tanımlanması ve identifikasyonu salgın süresince hastalığın klinik belirtilerini gösteren balıkların örneklenmesi ile gerçekleştirilebilir. Kontaminasyon riskine karşı yeni ölmüş balıkların örneklenmesi gerekmekte, şüphelenilen patojene bağlı olarak belirli organlardan uygun besiyerlerine inokulasyon gerçekleştirilmektedir. Bakteriyel patojenlerin izolasyonu için genellikle böbrek veya

lezyonları olan organlardan yararlanılmakta, ancak dalak, beyin gibi organlar genellikle belirli patojenlerin izolasyonu için tercih edilmektedir. Aseptik koşullarda iç organlardan örnekleme yapılmadan önce balığın vücudu dezenfekte edilmeli ve her zaman steril ekipmanlar kullanılmalıdır. Eğer besiyerine anında ekim yapmak veya canlı ulaştırmak mümkün değilse örneklemenin gerçekleştirileceği balık buz ile direkt temas etmeden soğuk zincir içerisinde dondurulmadan laboratuvara ulaştırılmalıdır. Balık hastalıklarında etken patojenin izolasyonu için genellikle (TSA), (BHIA), Blood Agar (BA), Cytophaga Agar besiyeri olarak kullanılmaktadır. İzole edilen bakterinin teşhisi Gram boyama, asit-fast boyama, hareket muayenesi, oksidaz testi, karbonhidrat kullanım testleri, indol, tek substrat kullanım testleri, dekarboksilaz/dihidrolaz reaksiyonları, hidroliz testleri, DNAaz testi, fenilalanin deaminaz testi, katalaz testi, nitrat testleri, 0/129 duyarlılık testi, Simmons sitrat testi gibi biyokimyasal testler ile gerçekleştirilmektedir [110].

Bunun yanında genellikle uygulaması kolay olan ve maliyet ve zaman açısından etkili ticari kitler balık ve kabuklu hastalıklarının tanımlanmasında tercih edilmektedir. API test (API 20E, API ZYM, API 20NE, API 50CH, API 50 L, Biolog-GN, Enterotubes ve RapID 32) kitleri (BioMerieux), bakteriyel balık patojenlerinin identifikasyonunda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [2]. Türkiye'de API 20E test kiti ilk olarak Tanrıkul [111] tarafından levrek balıklarından izole edilen *Vibrio* türlerinin identifikasyonunda kullanılmış ve bu bildirimden sonra bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde uygulanması yaygınlaşmıştır.

2.2.2 Moleküler teknikler

Bakteriyel, viral ve paraziter balık hastalılarının hızlı identifikasyonu için moleküler yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Moleküler tekniklerde genellikle, DNA ekstraktı, örneklerden DNA hibridizasyonu ile incelenmekte ve restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ile analiz edilmektedir. Genellikle DNA'nın amplifiye edilmesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gerçekleştirilmekte ve teşhis için spesifik primerler kullanılmaktadır [112].

2.2.3 Serolojik Yöntemler

İn-vitro antijen-antikor reaksiyonların incelendiği araştırmalar seroloji olarak adlandırılmaktadır ve oldukça önemli bir teşhis yöntemidir. Test sonuçları bir antijenin kendisi ve benzer yapıdaki antikorlar ile reaksiyon oluşturması veya oluşturmamasına göre değerlendirilmektedir. Antijen-antikor reaksiyonları spesifik olmakla beraber, bu reaksiyonlardan elde edilen veriler hastalık etkeni patojenlerin identifikasyonu için kullanıma uygundur. Ancak bu testlerde nadir olarak yakın antijenik özellik taşıyan türler arasında çapraz reaksiyonların görülmesinin testler için belirli ölçülerde sınırlayıcı faktör olabileceği bildirilmektedir. Hastalığa neden olan bir organizma ile ilişkili spesifik bir antijeni veya antikoru tespit etmek ve tanımlamak için özgül reaksiyonlar veren serolojik testler kullanılabilir. Serolojik testlerde birinci bileşen antikor olmakla birlikte, testlerin özgüllüğü ve duyarlılığı kullanılan antikora bağlıdır [110].

Monoklonal antikorlar (mAb'ler) yüksek özgüllüğe sahip homojen immunoglobulin içermekle beraber tek bir hedef antijen için yalnızca bir epitopu tespit edebilmektedirler. Monoklonal antikorlara oranla daha az karmaşık olan poliklonal antikorlar daha kısa zamanda, düşük maliyet ile, tek bir antijen üzerinde birden fazla epitopu tanıyabilen heterojen immünoglobin molekülleri içermesinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir. Poliklonal antikorların, hedeflenen etkenin birkaç epitopunu tanıyabilmelerinden dolayı patojenlerin teşhisi için daha uygun olduğu bildirilmiştir [113].

2.2.3.1 Floresan Antikor Tekniği (FAT)

FAT belirli boyaların (floresan izotiyosiyanat, rodamin izotiyosiyanat, Teksas kırmızısı) ultraviyole (UV) ışığı altında bakıldığında floresan ışığı yayması özelliğinden yararlanarak uygulanmaktadır. Bu boyalar, hedef antikor moleküllerine konjuge olduklarında etiket görevi görmekte ve antikorlar spesifik antijen ile reaksiyon oluşturduğunda ışık yaymaktadır. Bu teknik ile genellikle hücre yüzeyindeki antijenlerin saptanması gerçekleştirilir. Bakterilerin lam üzerine fiksasyonu yapıldıktan sonra antijen spesifik antikor ile inkübe edilmelidir. Doğrudan floresein ile işaretlenerek (direkt FAT) veya antikoru tespit etmek için floresan işaretli bir antikor konjugatı (indirekt FAT) eklenerek uygulanabilen bu testlerde veriler floresan

mikroskobu ile incelenerek, floresan yoğunluğu -, +, ++, +++, ++++, +++++ olarak değerlendirilir [9].

2.2.3.2 Presipitasyon Testleri

Bu metot, çözünür haldeki antijenlerin (toksinler, toksoidler, proteinler, karbonhidratlar, glikoproteinler ve lipoproteinler) özgül antikorlarla birleşmesi sonucu presipitat oluşturması esası ile gerçekleşmektedir [114]. Tüpte presipitasyon testlerinin genellikle kalitatif antijen veya antikor tespiti için uygulandığı rapor edilmiştir. Kapiller (kılcal) tüpler veya ince serolojik tüplerin kullanıldığı bu testlerde, tüplerin içine aktarılan klinik örneğin üzerine antijen veya antikor süspansiyonu eklenerek özgül antijen-antikor birleşmesinin gerçekleştiği sıvı içinde oluşan halka şeklinde presipitat oluşumu ile gözlenmektedir [114].

2.2.3.3 İmmünodifüzyon (İD)

Agardan daha saf yapıda olan ve reaktiflerle reaksiyona girmeyen, elektrik yükü içermeyen agaroz jelin kullanıldığı bu yöntemde, antijen ve antikorun yayıldıktan sonra karşılaştıkları bölgelerde prespitin bandı oluşturması temeline dayanır. Agaroz jel içine çukurlar açılan çift yönlü immünodifüzyon yönteminde; antijen varlığı araştırılacak ise ortamdaki çukurlara bilinen antiserum (antikor), çevredekilere ise farklı hasta serumları (antijen) ya da aynı serumun farklı dilüsyonları damlatılarak uygulanmaktadır. Ancak örnekte antikor varlığı araştırılacaksa o zaman ortadaki çukura bilinen antijen, çevredekilere ise hasta serumları damlatılarak uygun sıcaklıkta nemli ortamda 12-48 saat inkübe edilmesi gerektiği bildirilmiştir. İnkübasyon sırasında hem antijen hem de antikor moleküllerinin jel içinde birbirinden bağımsız olarak yayılması ve optimum konsantrasyonlarda karşılaştıkları bölgelerde presipitasyon bandı oluşturması esasına dayanmaktadır. Testlerde oluşan prespitin bantlarının pozisyonu antijenlerin ilişkisini, presipitin bandının yoğunluğu ise immun komplekslerin miktarını belirtmektedir. Tek yönlü immünodifüzyon (Mancini yöntemi) yönteminde ise antikor buluna jel içerisine çukurlar açıldıktan sonra bu çukurlara, antijenin giderek azalan dilüsyonları sırasıyla eklenir. Jelin içine dökülmeden önce eklendiğinden, antikor solüsyonunun yayılımı tek bir antijen için söz konusudur. Antijenlerin denge durumuna ulaşması için 48-72 saatlik inkübasyonun

ardından değerlendirme yapılır. Jel içerisinde dairesel olarak her yöne doğru yayılan antijen, optimum konsantrasyonlarda karşılaştığı antikorlar ile halka şeklinde presipitasyon oluşturur. Test edilen örneklerde bulunan antijen miktarı, oluşan halkaların çapları ölçülerek belirlenir ve elde edilen standart eğriler ile karşılaştırılarak hesaplanır [114].

2.2.3.4 Kompleman Fiksasyon Testi

Antijen-antikor reaksiyonuna dayanan bu yöntemde tüplerin her birine eşit hacimlerde antijen aktarılır ve eklenen antijen ile serum örneğinde bulunan antikor (var ise) birleşerek immün kompleks oluşumu gözlenir. Tüplerde antikor-antijen kompleksi sonucu tüketilmemiş kompleman kaldığı taktirde kalan aktif kompleman miktarı ile ilişkili bir şekilde indikatör hücrelerin belirli bir kısmında veya hepsinde hemoliz görülmektedir. İlk tüpten bir önceki tüpteki serumun titrasyonu ise antikor miktarını tanımlamak için kullanılmaktadır [115, 116].

2.2.3.5 Lateks Aglütinasyon (LA)

Antijenler polistiren yapıdaki lateks boncukların üzerine bağlanarak partikül olarak kullanılır ve serumda antikor varlığının tespiti yapılır. Testin uygulanabilmesi için özel karteksler veya lam kullanıldığı bildirilmiştir. Kümeleşmenin şiddetine bağlı olarak "+" ile "++++" arasında pozitif reaksiyonun değerlendirilmesi yapılan bu testler [114] örnekte bulunan antijenin konsantrasyonuna, lateks partikülünün affinitesi ve aviditesine (poliklonal, monoklonal), boyutuna, iyon konsantrasyonuna, sıcaklığına, pH'ına bağlıdır [116, 117]. Yersiniosis [118], Furunkulosis ve Vibriosis'in teşhisinde yaygın olarak kullanılmakta olan LA yönteminin çoğu bakteriyel balık patojeni için de rahatlıkla uygulanabileceği bildirilmiştir [12].

2.2.3.6 Antikora Duyarlı Stafilokoklar ile Koaglütinasyon Testi

Arazide uygulanabilirliği, güvenilir sonuçlar vermesi ve kolay uygulanabilmesinden dolayı tercih edilen bu yöntem lateks aglütinasyon metoduna oldukça benzemektedir. *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598) hücreleri %0,5 formalin içeren PBS solüsyonuna süspanse edilir. 25ºC'de hücrelerin inaktive olması için 3 saat bekletildikten sonra ve üç kez PBS ile yıkanır. Daha sonra hücreler 10:1 oranında

antiserum ile karıştırılarak 25ºC'de 3 saat inkübe edilir. Hücrelerin kümeleşmesi pozitif reaksiyon olarak kabul edilir [2].

2.2.3.7 Geck Tekniği

Bu yöntem balık patojenlerinde sadece *Aeromonas salmonicida'*nın [119] teşhisi için kullanılmıştır. Geck [120] tarafından geliştirilen bu yöntemde, bir damla bakteri süspansiyonu temiz (yağdan arındırılmış) bir mikroskop lamı üzerine aktarılır, havada kurutulur ve ısı ile fikse edilir. Daha sonra fikse edilen bakterinin üzeri eşit hacimde bulunan antiserum-Indian ink solüsyonu ile kapatılır ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Karışım demir klorür (%0,00001 w/v) ile yıkanarak temizlenir ve lam havada kurutulduktan sonra mikroskopta incelenir. Pozitif sonucun Indian ink ile rahat görülen hücrelerin varlığı olarak kabul edilir [2].

2.2.3.8 ELISA

İnsan sağlığı ve veterinerlikte kullanılmakta olan bu teknik, bakteriyel balık hastalıklarının teşhisi için de tercih edilmektedir [113]. Ticari olarak tanı kitlerinin temin edilebilmesi, çok sayıda örneğin kısa süre zarfında çalışılabilmesi, yöntemin otomasyona uyarlanabilmesi, sonuçların kantitatif veya kalitatif alınabilmesi ve değerlendirmenin objektif olması ELISA testlerinin avantajlarıdır [114]. Bilinen antikor/antijen ile bilinmeyen antikor/antijen karıştırılarak reaksiyonun uygun substratlar kullanılarak görünür hale getirildiği bu testlerde, antijen-antikor birleşmesi temel alınmaktadır [121, 122]. ELISA için, katı bir yüzey (genellikle mikrotitre plakası) üzerinde hareketsiz hale getirilmiş bir antijen veya antikor, hedef moleküller (örneğin. peptitler, proteinler, antikorlar) ve enzim konjuge tespit antikoru gerekmektedir [113]. ELISA testlerinde antikor aramak için bilinen antijen plastik bir yüzeye yerleştirilmekte ve üzerine serum eklenmektedir. Belirli bir süre inkübe edildikten sonra içerik dökülür ve yıkanır. Serumda antijene uygun antikor olması durumunda antijene bağlanma gerçekleşecek ve yıkama ile gitmeyecektir. Bir enzim ile işaretlenmiş olan antiglobulin serumu eklenerek belirli bir süre bekletildikten sonra yıkanmaktadır. İncelenmekte olan serumda antijene uygun antikor var ise antijenle birleşeceğinden eklenen enzim ile işaretlenen antiglobuline bağlanarak yıkama işlemi esnasında bırakmayacaktır. Daha sonra enzime uygun bir substrat eklenecek ve

sisteme yapışmış olan bu enzim substratı parçalaması ile arta kalan substrat, yapılacak kolorimetrik ölçümlerde bağlanmış antikor hakkında bilgi elde edilmiş olur. Antijen aramak için de prensipin aynı şekilde olduğu rapor edilmektedir [123]. Antijen/analit veya antikorun yapısına ve gereken duyarlılığa bağlı olarak dört tipik ELISA testleri (doğrudan, dolaylı, sandviç ve rekabetçi ELISA) bulunduğu bildirilmektedir [113].

2.2.3.9 Dot Blotting

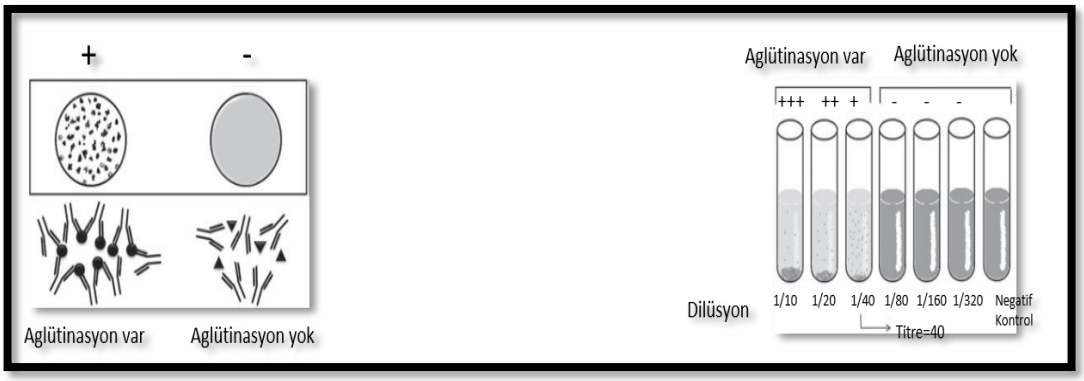
Monospesifik antikor ile spesifik antijenin varlığını tespit etmek için kullanılılan Dot blotting testinde, nitroselüloz membran üzerine 1 µl bakteri solüsyonunu eklendikten sonra 60ºC'de ve 10 dakika boyunca bekletilir. Bunu takiben 1:200'lük %5 blot çözeltisinde (%5 yağsız kuru süt, %0,1 Triton X-100 PBS) 5 saat inkübe edilir. İnkübasyondan çıktıktan sonra yıkanır ve 1:500 oranında peroksidaz immünoglobin (HRP) ile 3 saat seyreltilir. Bu işlemi takiben %0,5 blot ile tekrar yıkanır. Daha sonra substrat içerisinde (PBS içinde %0,03 diaminobenzidin, %0,006 hidrojen peroksit ve %0,05 kobalt klorür) 5 dakika inkübe edilir [124]. Membran üzerinde mor renk oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edilir.

2.2.3.10 Lam Aglütinasyon Metodu

Aglütinasyon reaksiyonları, immünolojik yöntemler arasında uygulanabilen en kolay testleri oluşturmaktadır. Bakteriyel balık patojenlerinin teşhisi için uzun zamandır kullanılmakta olan bu testlerde az miktarda antiserum ile serolojik teşhis gerçekleştirilebilmektedir. Aglütinasyon testlerinde birçok bakteriyel balık patojeninin aynı cins içinde bulunan türlerinin ve aynı türler içinde bulunan farklı suşların serolojik ilişkisi hakkında veri alınabilmektedir. Bu reaksiyonlar, antijen partikülü (örn. bakteri) veya bir antijenle kaplanmış olan inert partiküller (lateks boncuklar) ile yapılabilmektedir. Divalent veya multivalan yapıda olan antikorlar, multivalan yapıdaki antijen partiküllerini çapraz bağlamasıyla aglütinasyon oluşturabilmektedir. Bu yöntem, mikrobiyal hücre yüzeyinde bulunan antijen ve serumdaki antikorların varlığını tanımlayabilmektedir. Serum, antijen ile uygun antikor içeriyor ise bakteri hücreleri aglütinasyon oluşturur. Serumdaki antikor konsantrasyonu, sabit miktarda bir bakteri süspansiyonunun, kademeli olarak dilüe edilmiş homolog antiserumlar ile karıştırılması ile belirlenebilmektedir. Aglütinasyon testlerinde bazı durumlarda

bakteriler otoaglütinasyon eğilimi gösterebilmekte, bu durum yanlış sonuçların elde edilmesine yol açabilmektedir. Ancak bakterinin PBS (fosfat tamponlu salin) içinde yıkanması ile otoaglütinasyon elimine edilebilmektedir. Eğer hala aglütinasyon meydana geliyor ise bakterinin %0,1 protein solüsyonları ile yıkanması önerilmektedir. Otoaglütinasyon reaksiyonunun devam etmesi durumunda, bakteri süspansiyonunun 1 ila 10 dakika kaynama derecesindeki su banyosunda muamele edilmesi önerilmektedir. Bu işlemlerin hiçbiri otoaglütinasyonu ortadan kaldırmıyor ise bu organizma test için uygun değildir [9].

Lam aglütinasyon testi için, bir mikroskop lamına bir damla bakteri süspansiyonu eklenir (%0,85 PBS içinde hazırlanmış 10^8 hücre/ml) veya FTS (fizyolojik tuzlu su) üzerine katı besiyerinden bakterinin inokülasyonu gerçekleştirilir. Lamda bulunan bakteri süspansiyonuna eşit hacimde antiserum inoküle edildikten sonra kısa bir süre hafif bir şekilde karıştırılır. Antijen-antikor reaksiyonuna göre hücrelerin aglütinasyonu pozitif olarak kabul edilmektedir (Şekil 2.6). Reaksiyon aynı zamanda, antiserumların seri dilüsyonları kullanılarak mikrotitre kuyularında da gerçekleştirilebilir [11].



Şekil 2.6: Lam aglütinasyon ve tüp aglütinasyon metodunda göz ile görülebilen aglütinasyon [113]

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOD

3.1 Bakteriyel Suşların Temini

Ege Bölgesi'nde gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan balık çiftliklerinde 2014-2021 yılları arasında Yersiniosis, Vibriosis ve Lactococcosis vakalarından izole edilmiş olan bakteriyel patojenler İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Balık Hastalıkları ve Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Toplamda olarak 15 *V. anguillarum*, 19 *Y. ruckeri* ve 8 *L. garvieae* suşu lam aglütinasyon metodu ile incelenmiştir.

Stok kültürler pasajlandıktan sonra API 20E ve API rapid ID 32 STREP (BioMerieux S.A., Fransa) biyokimyasal test kitleri kullanılarak tanımlanmış ve kontrolleri gerçekleştirilmiştir.

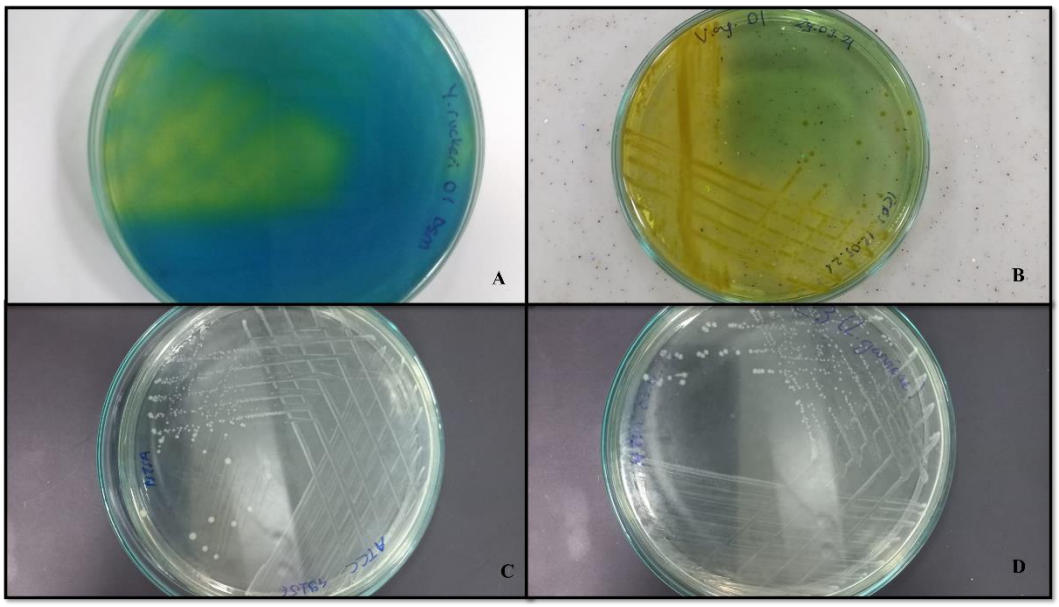
3.2 İmmünizasyon için Antijenlerin Hazırlanması

Antijenler Toranzo ve diğ. [11]'ne göre hazırlanmıştır. Referans olarak seçilen *V. anguillarum* O1 (ATCC 43305), *Y. ruckeri* O1 (ATCC 29473), *L. garvieae* Japon KG^- (ATCC 49156) ve Türkiye'de gökkuşağı alabalıklarında Lactococcosis salgınından izole edilmiş olan biyokimyasal ve moleküler olarak (GenBank: MT876413) tanımlı *L. garvieae* (Türk KG^- [C3]) suşları immünizasyon için antijen olarak kullanılmıştır.

Her bir patojen için antijenler birbirinden bağımsız olarak ayrı ayrı hazırlanmıştır. Stok kültürlerden *V. anguillarum* O1 (ATCC 43305) TCBS'ye, *Y. ruckeri* O1 (ATCC 29473) Shotts-Waltman besiyerine pasajlanmış ve 21ºC'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Stok *L.garvieae* (ATCC 49156) ve *L. garvieae* (C3) TSA'ya pasajlanarak 30ºC'de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.1). Ardından her bir referans suş pasajlandıkları katı besiyerinden alınarak her bir patojen için ayrı hazırlanmış 200 mL

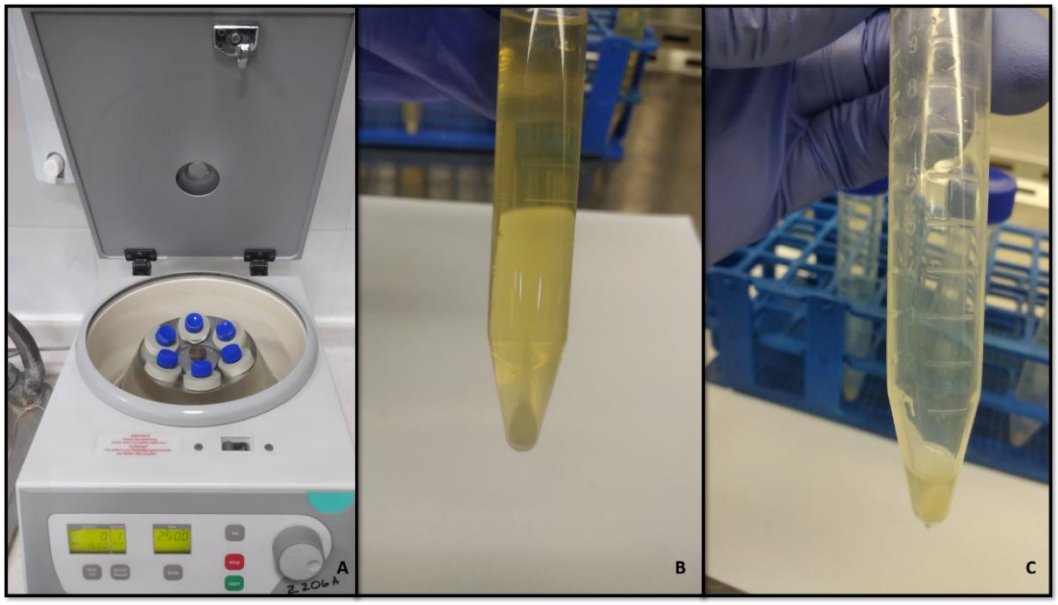
TSB'ye inoküle edilerek gece boyunca uygun sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Hazırlanan bakteri solüsyonunlarına %2 (v/v) formaldehit ilave edilmiş ve çalkalayıcıda karıştırılmıştır. İnaktive edilmiş olan bakteriyel süspansiyonlar biyogüvenlik kabini içerisinde 15 mL hacimdeki santrifüj tüplerine; her bir tüpe,10 mL olacak şekilde aktarılmıştır (Şekil 3.2).

Santrifüj tüplerine aktarılan solüsyonlar 1600 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.3). Bakteri hücreleri %0,3 formaldehit (Şekil 3.4) (Şekil 3.5) solüsyonunda iki kez daha yıkanmış (Şekil 3.6) (Şekil 3.7), ardından bakteri hücreleri %0,85 (w/v) PBS ile yıkanarak santrifüj edilmiştir. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra bakteri hücrelerinin yoğunluğu PBS ile McFarland No.3'e (10^8 hücre/ml) göre ayarlanarak (Şekil 3.8) kullanılıncaya kadar -20ºC'de saklanmıştır.

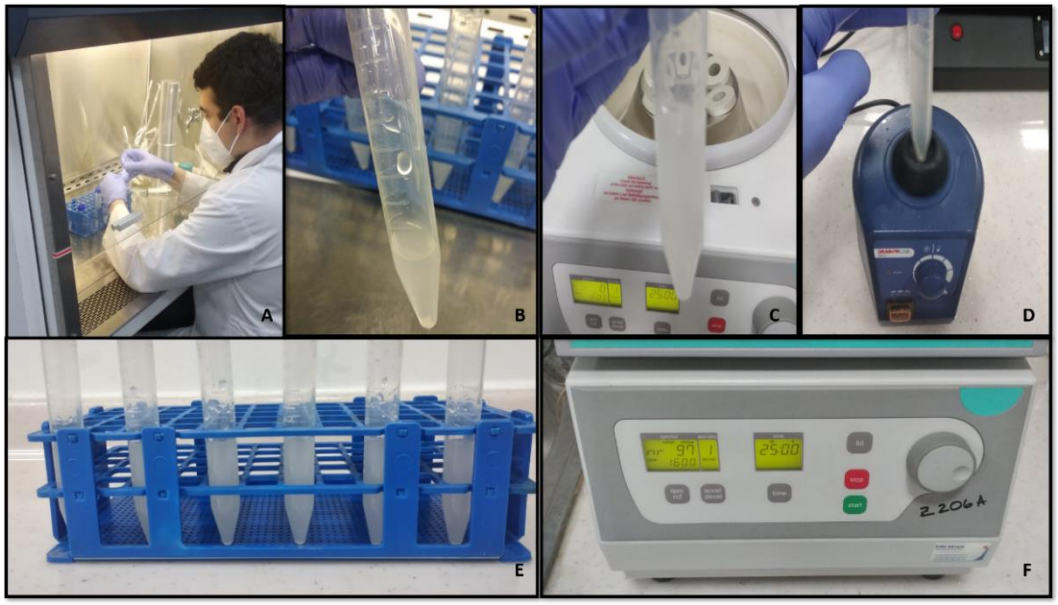


Şekil 3.1: Referans suşların katı besiyerinde üretilmesi. A: *Y. ruckeri* ATCC 29473, B: *V. anguillarum* ATCC 43305, C: *L. garvieae* ATCC 49156, D: *L. garvieae* C3

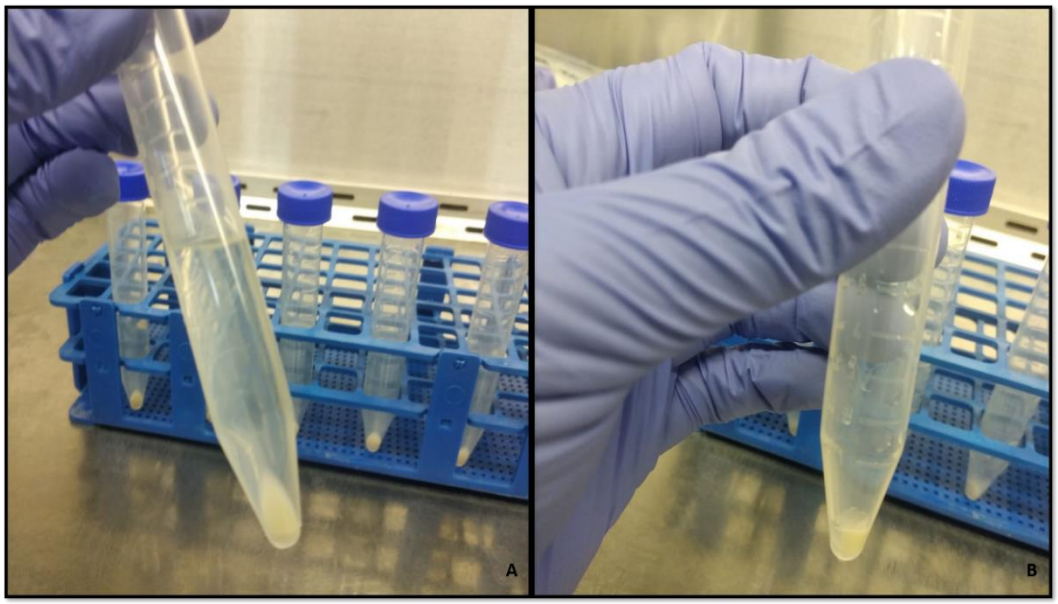
Şekil 3.2: A: TSB'de gece boyunca inkübe edilen bakteri inaktivasyonu; B-C: Formaldehit ilave edilen TSB'nin çalkalayıcıda karıştırılması ve santrifüj tüplerine aktarılması



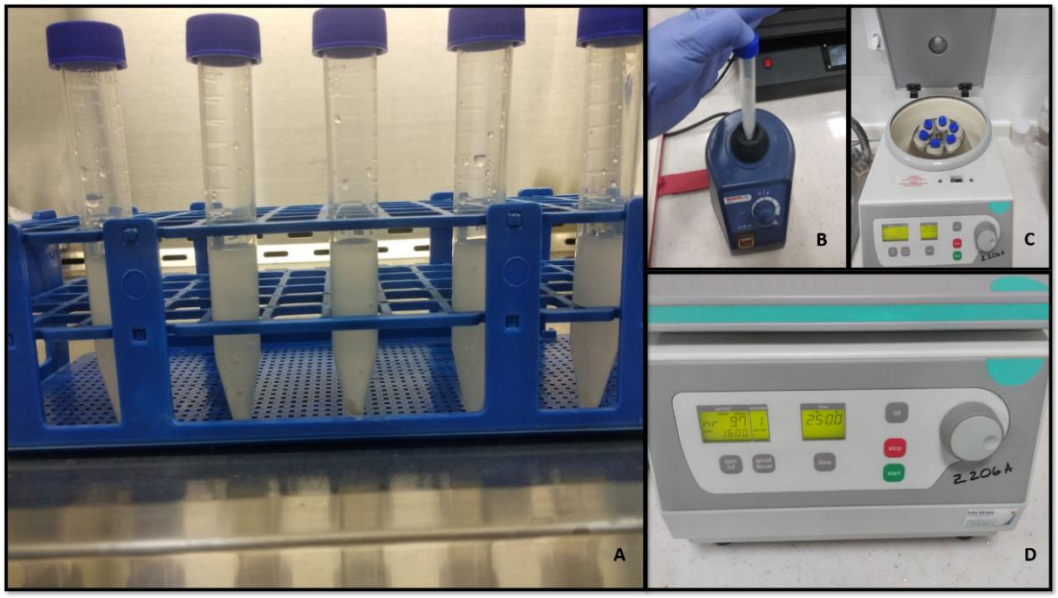
Şekil 3.3: A: Santrifüj işlemi; B-C: Santrifüjden sonraki pelet görüntü ve süpernatantın ortamdan uzaklaştırıldıktan



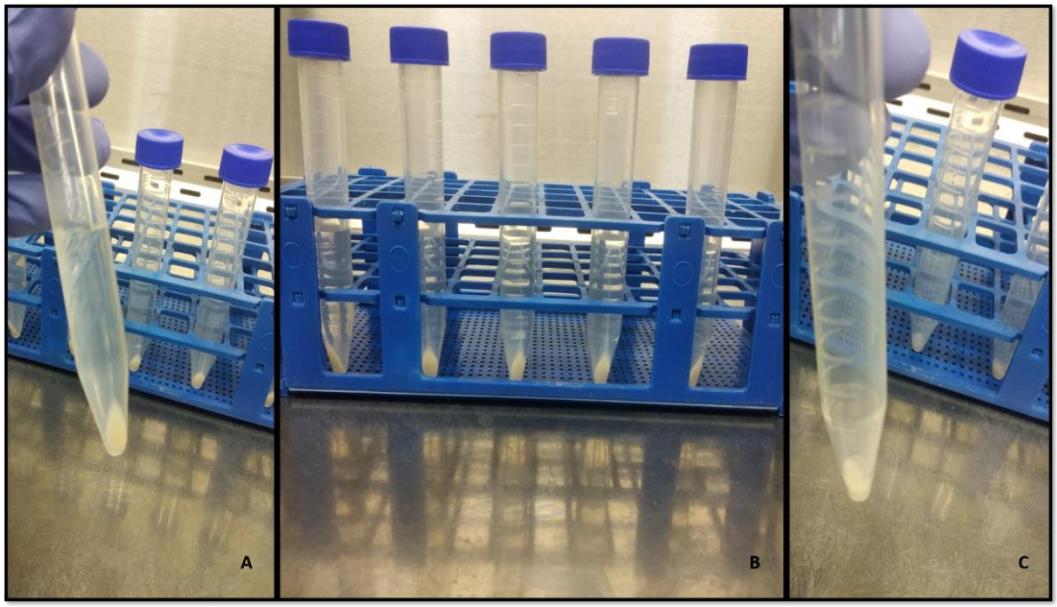
Şekil 3.4: A-B-C: Örneklerin %0,3 formaldehit ile yıkanması; D-E-F: Vorteksleme ve santrifüj işlemleri



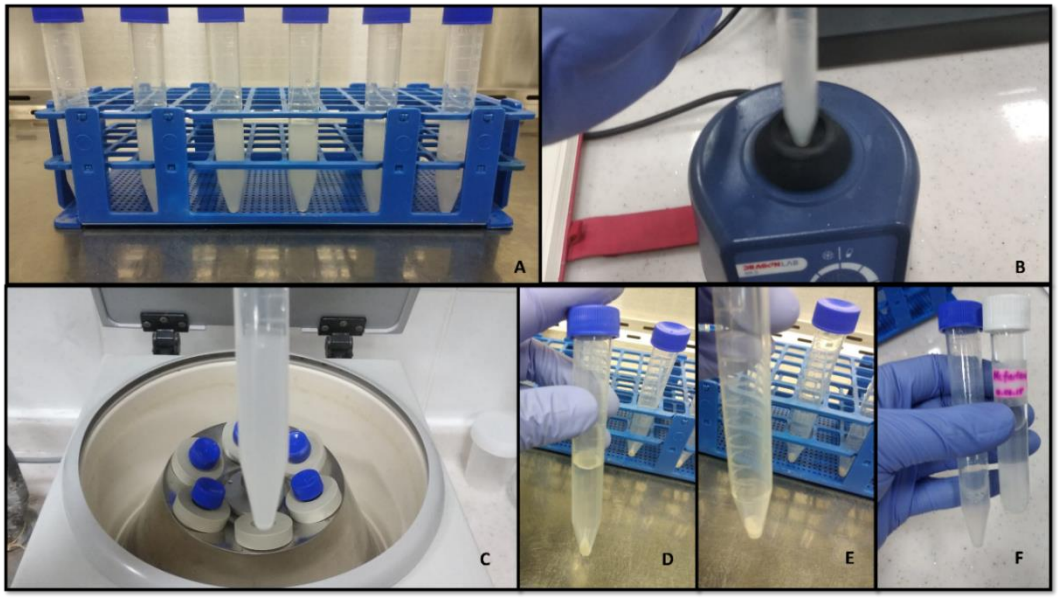
Şekil 3.5: A-B: Pelet görüntü ve süpernatantın ortamdan uzaklaştırılması



Şekil 3.6: A-B: %0,3 formaldehit ile ikinci yıkama; C-D: Santrifüj işlemi



Şekil 3.7: A-B: İkinci yıkama sonrası dibe çöken pelet görüntü; C: Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonraki peletin görüntüsü



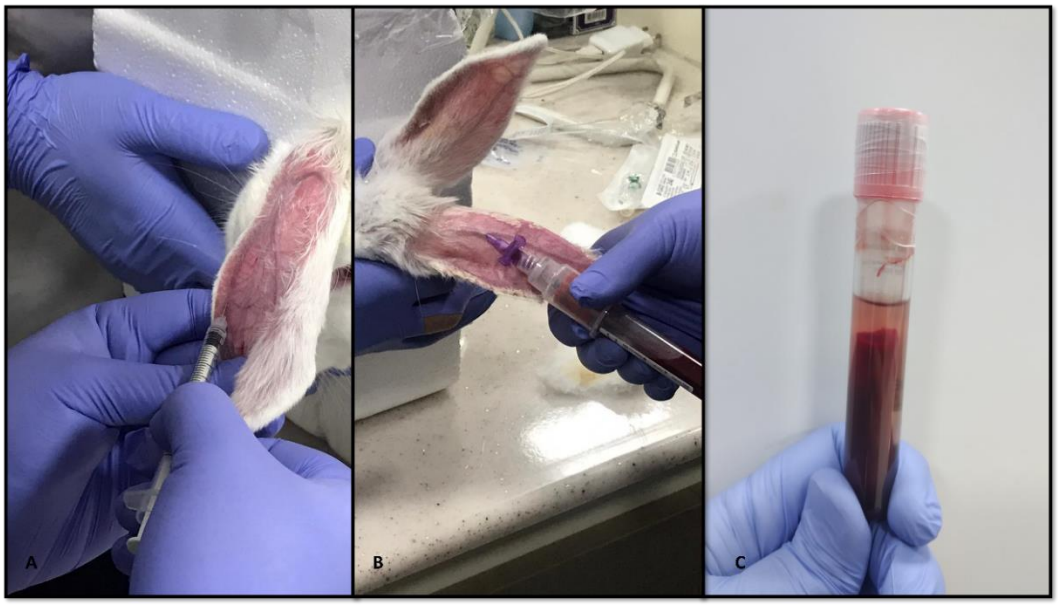
Şekil 3.8: A: Tüplere PBS eklenmesi; B: Vortekslenmesi; C: Santrifüj edilmesi; D: Santrifüj sonrası görünüm; E: Süpernatantın ortamdan uzaklaştırılmasından sonraki görünüm; F: Yoğunluğun McFarland No.3 (10^8 hücre/ml) olarak ayarlanması.

3.3 Antiserum Eldesi

Antiserum üretimi için Yeni Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) tavşanları 3R ilkesine göre kullanılmıştır. Tavşanların kulak veninden intravenöz olarak formalin ile inaktive edilmiş olan bakterilerin, PBS ile yıkanan (10^8 hücre/ml, yoğunluk McFarland No.3 standard) süspansiyonları enjekte edilmiştir. Enjeksiyonlar ardışık dozlarda Toranzo ve diğ. [11]'ne göre 1. gün (0.25 ml), 2. gün (0.50 ml), 3. gün (1 ml), 4.gün (2 ml) ve 11.gün (1 ml) olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9). Son enjeksiyon yapıldıktan bir hafta sonra tavşanın kulak veninden alınan kan (Şekil 3.10) oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiş, ardından 4ºC'de gece boyunca tutulmuştur. Ertesi gün Davies [75]'e göre 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serum ayrılmış ve -20ºC'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır. Çalışma süresince kullanılan her tavşandan 10 ml kan alınmış ve kan örneklerinden yaklaşık olarak 5 ml serum elde edilmiştir.

Kontrol amaçlı kullanılmak üzere antijen uygulanmayan tavşanlardan alınan kandan da serum elde edilmiştir.

Şekil 3.9: A-B-C: Antiserum eldesi için hazırlanan antijenlerin tavşanlara intravenöz enjeksiyonla verilmesi



Şekil 3.10: A-B-C: Son enjeksiyondan bir hafta sonra tavşanlardan kan alınması ve elde edilen antiserum

3.4 Termostabil Somatik "O" Antijenlerinin Hazırlanması

Termostabil O antijenleri Davies [75]'e göre hazırlanarak lam aglütinasyon metodunda serotiplerin belirlenmesi için kullanılmıştır. *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum'*un stok suşları TSA'ya pasajlanarak 21ºC'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Ardından bakteriler PBS'ye (pH 7.2) inoküle edilmiş ve termostabil O antijenlerinin hazırlanması için 100ºC'de 2 saat su banyosuna bekletilmiştir. Su banyosundan çıkan süspansiyonlar santrifüj edildikten sonra yoğunluğu McFarland No.3'e (10^8 hücre/ml) göre ayarlanmış ve termostabil somatik O antijeni olarak lam aglütinasyon testlerinde kullanılmıştır.

3.5 Lam Aglütinasyon Metodu

Temiz bir lam üzerine bir öze FTS eklendikten sonra bakteri inoküle edilmiş, dilüe edilmemiş spesifik antiserum ile hafif bir şekilde karıştırılmıştır. Siyah bir arka planda üzerine ışık tutularak incelenen antijen-antikor reaksiyonlarında anında aglütinasyon veren suşlar pozitif, beş dakika içinde zayıf aglütinasyon veren veya vermeyen suşlar ise negatif sonuç olarak kabul edilmiştir. Kontroller immünizasyon gerçekleştirilmemiş tavşanlardan alınan serumlar ile gerçekleştirilmiştir.

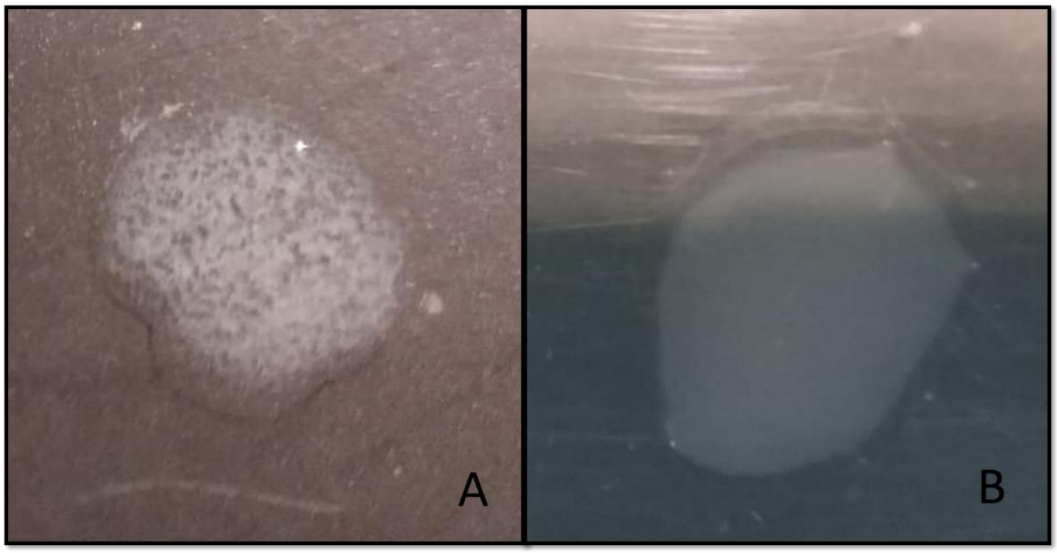
Testlerin değerlendirilmesi aglütinasyon sonuçlarına göre negatif (-), zayıf aglütinasyon (+), orta dereceli aglütinasyon (++), kuvvetli aglütinasyon (+++) ve tam aglütinasyon (++++) olarak gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 4

Bulgular

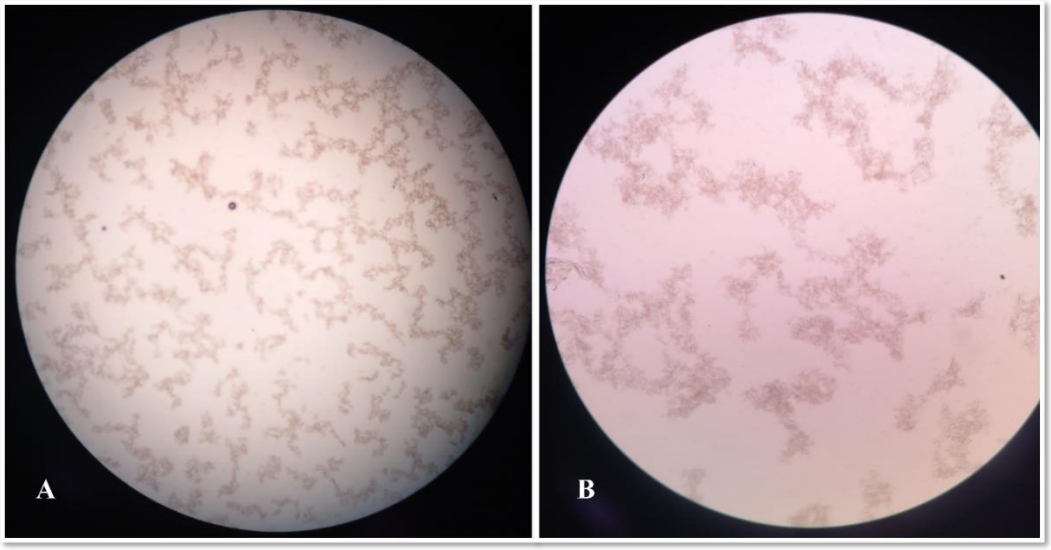
4.1 Lam Aglütinasyon Sonuçları

Lam aglütinasyon metodunda pozitif ve negatif olarak değerlendirilen suşların örnekleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: Lam aglütinasyon testlerin değerlendirilmesi. A: Pozitif sonuç; B: Negatif sonuç

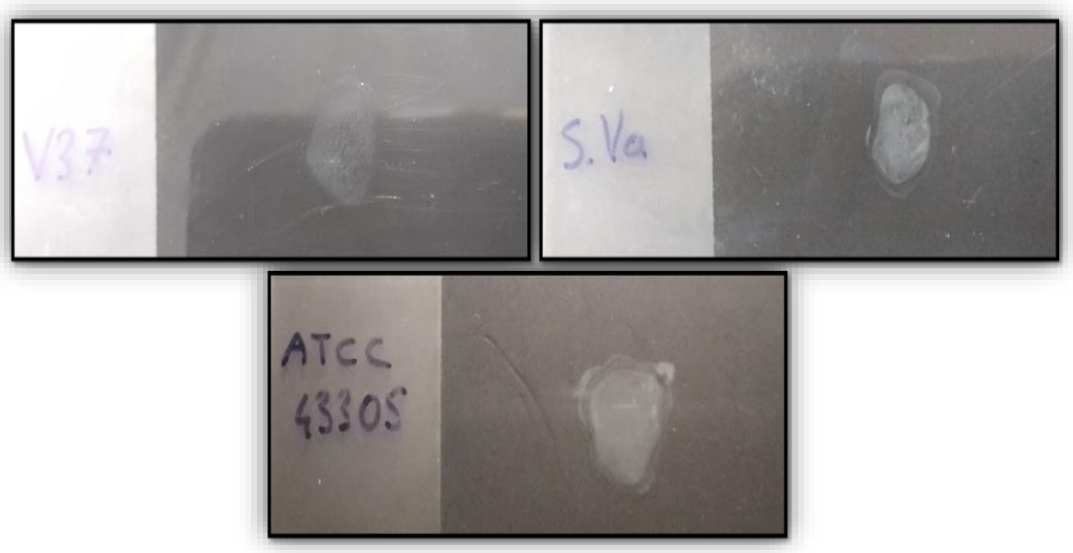
Pozitif aglütinasyon veren suşun ışık mikroskobu altında görünümü Şekil 4.2'de verilmiştir.



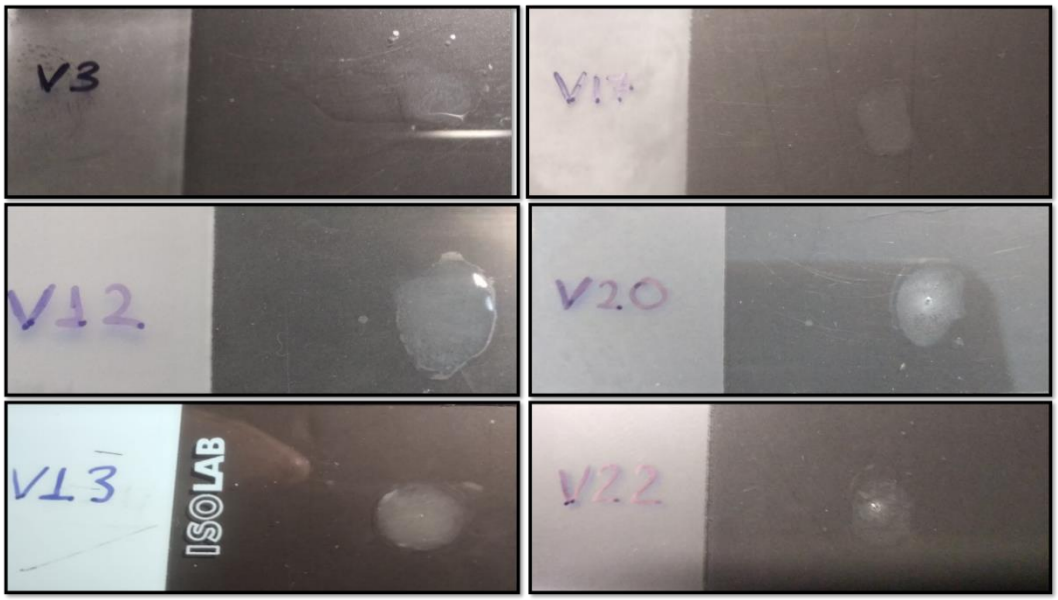
Şekil 4.2: Pozitif aglütinasyon; A: x4 görünümü; B: x10 görünümü (Işık mikroskobu)

4.1.1 *Vibrio anguillarum* Suşlarının Lam Aglütinasyon Sonuçları

V. anguillarum suşlarının tam hücreleri ile gerçekleştirilen lam aglütinasyon testlerinde ATCC 43305, V20, V24, V29, V32, V34, V35, SVA kodlu *V. anguillarum* suşlarının referans O1 (ATCC 43305) antiserumu ile tam aglütinasyon (++++) verdiği, V3, V7, V22, V31 kodlu *V. anguillarum* suşlarının kuvvetli aglütinasyon (+++), V12 ve V13 kodlu suşların ise orta dereceli aglütinasyon (++) oluşturduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1). İncelenen bütün suşlar 15-30 saniye arası aglütinasyon oluşturmuştur (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.3: ATCC 43305, V37, SVA kodlu *V. anguillarum* suşlarının aglütinasyonu



Şekil 4.4: V3, V12, V13, V17, V20, V22 kodlu *V. anguillarum* suşlarının aglütinasyonu

Şekil 4.5: V24, V29, V31, V32, V34, V35 kodlu *V. anguillarum* suşlarının aglütinasyonu

Tablo 4.1: *V. anguillarum* suşları ile gerçekleştirilen lam aglütinasyon sonuçları

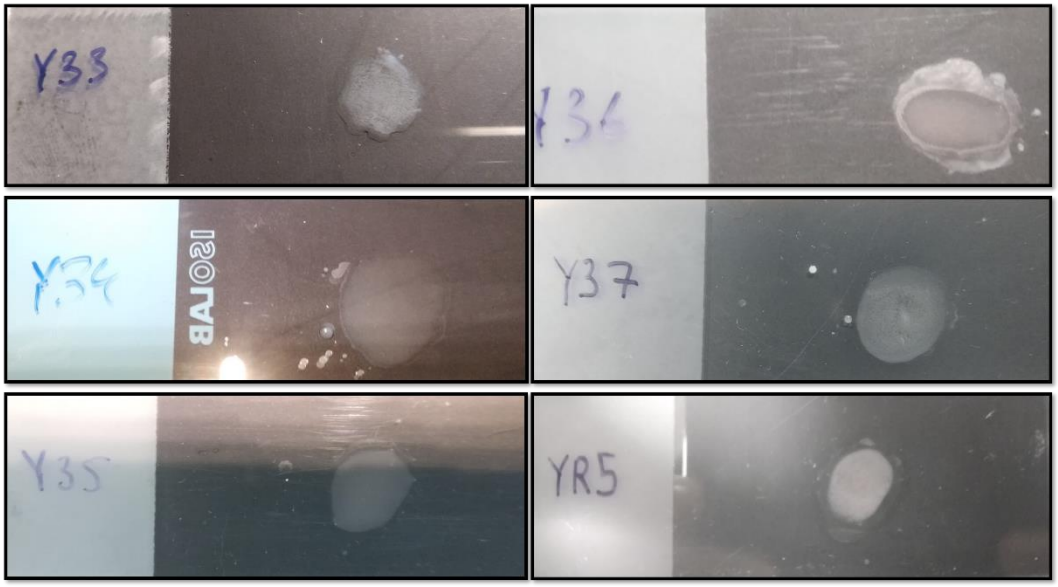
***V. anguillarum* suşları**	***V.anguillarum* ATCC 43305(Serotip O1)**
ATCC 43305	++++
V3	+++
V12	++
V13	++
V17	+++
V20	++++
V22	+++
V24	++++
V29	++++
V31	+++
V32	++++
V34	++++
V35	++++
V37	++++
SVA	++++

Negatif (-); zayıf aglütinasyon (+); orta dereceli aglütinasyon (++); kuvvetli aglütinasyon (+++) ve tam aglütinasyon (++++)

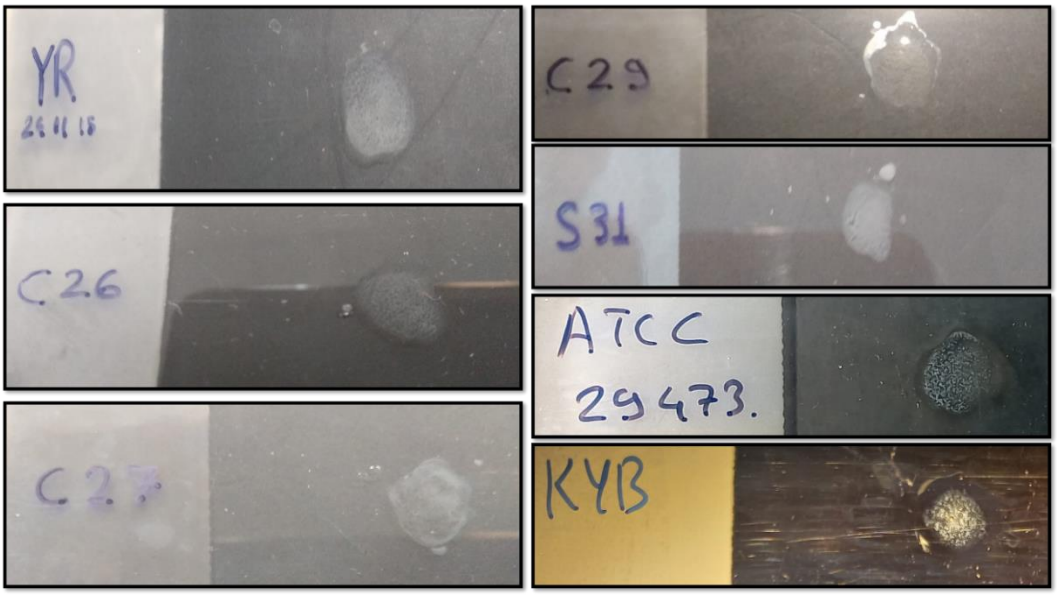
4.1.2 *Yersinia ruckeri* Suşlarının Lam Aglütinasyon Sonuçları

Y. ruckeri suşlarının tam hücreleri ile gerçekleştirilen lam aglütinasyon testlerinde ATCC 29473, YR 241118, YR5, Y1, Y3, Y6, Y33, C26, C27, C29, S31, KYB kodlu suşların referans O1 (ATCC 29473) antiserumu ile tam aglütinasyon, Y12, Y31, Y36, Y37 kodlu suşların kuvvetli aglütinasyon verdiği, Y32, Y34, Y35 kodlu suşların ise aglütinasyon vermediği (-) tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Aglütinasyon oluşturmayan Y32, Y34, Y35 kodlu suşlar üç kez test edilmiştir. İncelenen suşlarda 15-30 saniye arasında aglütinasyon oluşumu görülmüştür (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).

Şekil 4.6: Y1, Y3, Y6, Y12, Y31, Y32 kodlu *Y. ruckeri* suşlarının aglütinasyonu



Şekil 4.7: Y33, Y34, Y35, Y36, Y37, YR5 kodlu *Y. ruckeri* suşlarının aglütinasyonu



Şekil 4.8: YR241118, C26, C27, C29, S31, KYB, ATCC 29473 kodlu *Y. ruckeri* suşlarının aglütinasyonu

Tablo 4.2: *Y. ruckeri* suşları ile gerçekleştirilen aglütinasyon sonuçları

***Y.ruckeri* suşları**	***Y. ruckeri* ATCC 29473(Serotip O1)**
ATCC 29473	++++
YR241118	++++
YR5	++++
Y1	++++
Y3	++++
Y6	++++
Y12	+++
Y31	+++
Y32	-
Y33	++++
Y34	-
Y35	-
Y36	+++
Y37	+++
C26	++++
C27	++++
C29	++++
S31	++++
KYB	++++

Negatif (-); zayıf aglütinasyon (+); orta dereceli aglütinasyon (++); kuvvetli aglütinasyon (+++) ve tam aglütinasyon (++++)

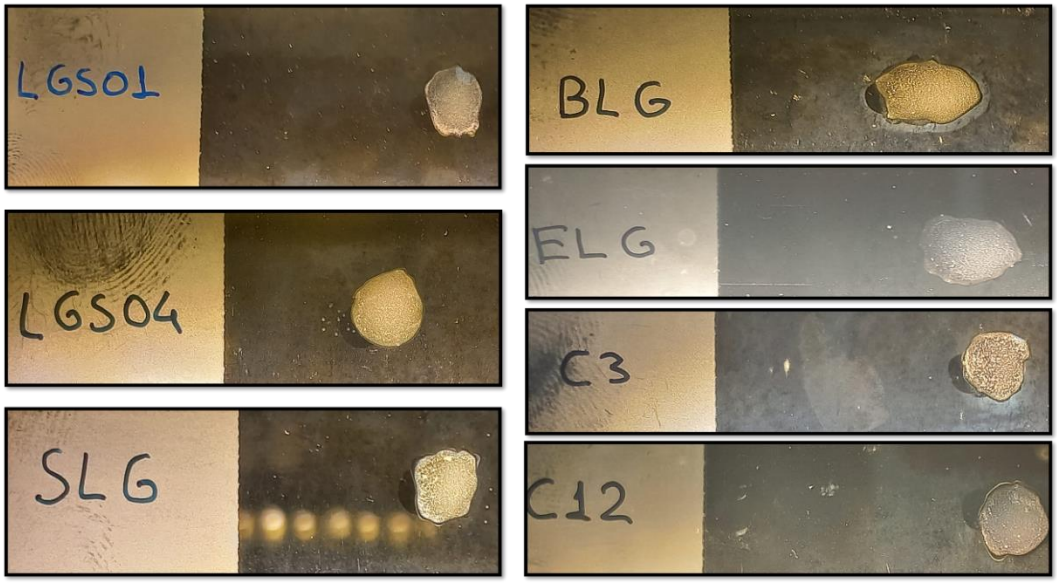
4.1.3 *Lactococcus garvieae* Suşlarının Lam Aglütinasyon Sonuçları

Türkiye'de hasta gökkuşağı alabalığından izole edilen C3, ELG, SLG, LGSO1, LGSO4, BLG kodlu suşların biyokimyasal ve moleküler olarak tanımlı olan Türk KG$^-$ (C3) *L. garvieae* suşundan üretilen antiserum ile tam aglütinasyon (++++) verdiği, C12 kodlu suşun kuvvetli aglütinasyon verdiği (+++) ancak incelenen suşların Japon KG$^-$ antiserumu ile reaksiyona girmediği tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Japon KG$^-$ suşunun sadece kendi antiserumu ile reaksiyona girdiği (++++) gözlemlenmiştir. İncelenen suşlarda 20-40 saniye arasında aglütinasyon oluşumu görülmüştür (Şekil 4.9). Aglütinasyon vermeyen suşlar için testler üç kez tekrar edilmiş ve 5 dakika boyunca izlenmiştir.

Tablo 4.3: *L. garvieae* suşlarının lam aglütinasyon sonuçları

***L. garvieae* suşları**	***L. garvieae* ATCC 49156 (Japon KG$^-$)**	***L. garvieae C3*(Türk KG$^-$)**
ATCC 49156	++++	-
C3	-	++++
C12	-	+++
ELG	-	++++
SLG	-	++++
LGSO1	-	++++
LGSO4	-	++++
BLG	-	++++

Negatif (-); zayıf aglütinasyon (+); orta dereceli aglütinasyon (++); kuvvetli aglütinasyon (+++) ve tam aglütinasyon (++++)



Şekil 4.9: *L. garvieae* suşlarının Türk KG- (C3) antiserumu ile aglütinasyonu

4.1.4 Termostabil "O" Antijeni ile *Vibrio anguillarum* Suşlarının Lam Aglütinasyon Testi

Hazırlanan termostabil O antijenleri ile tavşanda üretilen *V. anguillarum* O1 antiserumu eşit hacimde temiz bir lam üzerinde inoküle edilmiş ve hafifçe karıştırılmıştır. Serolojik incelemelerde bütün suşların 15-30 saniye içinde aglütinasyon oluşturduğu, ATCC 43305, V20, V24, V29, V32, V34, V35, V37, SVA kodlu suşların tam aglütinasyon (++++) verdiği, V3, V17, V22, V31 kodlu suşların kuvvetli aglütinasyon (+++) verdiği, V12, V13 kodlu suşların ise zayıf aglütinasyon (+) verdiği gözlemlenmiştir (Tablo 4.4). Aglütinasyonların 20-35 saniye arasında oluştuğu gözlemlenmiştir. V12, V13 kodlu suşların aglütinasyon testleri üç kez tekrarlanmıştır ve bütün testlerde zayıf reaksiyon tespit edilmiştir. Zayıf reaksiyon veren suşlar hariç pozitif reaksiyon veren bütün suşlar O1 olarak tiplendirilmiştir.

Tablo 4.4: *V. anguillarum* suşlarının termostabil O antijeni ile gerçekleştirilen lam aglütinasyon testi sonuçları

***V. anguillarum* "O antijen"**	**Serotip O1 antiserum**
ATCC 43305	++++
V3	+++
V12	+
V13	+
V17	+++
V20	++++
V22	+++
V24	++++
V29	++++
V31	+++
V32	++++
V34	++++
V35	++++
V37	++++
SVA	++++

Negatif (-); zayıf aglütinasyon (+); orta dereceli aglütinasyon (++); kuvvetli aglütinasyon (+++) ve tam aglütinasyon (++++)

4.1.5 Termostabil "O" Antijeni ile *Yersinia ruckeri* Suşlarının Lam Aglütinasyon Testi

Tavşanda geliştirilen *Y. ruckeri* Serotip O1 antiserumu ve stok *Y. ruckeri* suşlarından hazırlanan termostabil O antijenleri lam aglütinasyon metodu ile incelenmiştir. ATCC 29473, YR 241118, YR5, Y1, Y3, Y6, Y33, C26, C27, C29, S31, KYB kodlu suşların referans O1 (ATCC 29473) antiserumu ile tam aglütinasyon (++++), Y12, Y31, Y36, Y37 kodlu suşların kuvvetli aglütinasyon verdiği (+++), Y32, Y34, Y35 kodlu suşların ise aglütinasyon vermediği (-) tespit edilmiştir (Tablo 4.5). Aglütinasyonların 20-35 saniye arasında oluştuğu gözlemlenmiştir. Reaksiyon veremeyen suşların aglütinasyon testleri üç kez tekrarlanmıştır ve aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 4.5: *Y. ruckeri* suşlarının termostabil O antijeni ile gerçekleştirilen lam aglütinasyon testi sonuçları

***Y. ruckeri* "O antijen"**	**Serotip O1 antiserum**
ATCC 29473	++++
YR5	++++
YR241118	++++
Y1	++++
Y3	++++
Y6	++++
Y12	+++
Y31	+++
Y32	-
Y33	++++
Y34	-
Y35	-
Y36	+++
Y37	+++
C26	++++
C27	++++
C39	++++
S31	++++

Negatif (-); zayıf aglütinasyon (+); orta dereceli aglütinasyon (++); kuvvetli aglütinasyon (+++) ve tam aglütinasyon (++++)

4.2 Kullanılan Suşların Biyokimyasal Test Sonuçları

Çalışmada kullanılan *V. anguillarum* suşlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.6'da *Y. ruckeri* suşlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.7'de, *L. garvieae* suşlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.8'de sunulmuştur.

Tablo 4.6: Stok kültürlerden pasajlanan *V. anguillarum* suşlarının morfolojik ve API 20E test profilleri

	V3	**V12**	**V13**	**V17**	**V20**	**V22**	**V24**	**V29**	**V31**	**V32**	**V34**	**V35**	**V37**	**SVA**
Gram boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
O/129	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: Pozitif; - Negatif, O/F (Oxidative-Fermentative Medium), O/129 (2,4-diamino-6,7- diisopropylpteridine), ONPG (ortho-Nitrophenyl-β-galactoside), ADH (Arginine dihydrolase), LDC (Lysine decarboxylase), ODC (Ornithine decarboxylase), TDA (Deaminase), VP (Asetoin üretimi)

Tablo 4.7: Stok kültürlerden pasajlanan *Y. ruckeri* suşlarının morfolojik ve API 20E test profilleri

	Y1	**Y3**	**Y6**	**Y12**	**Y31**	**Y32**	**Y33**	**Y34**	**Y35**	**Y36**	**Y37**	**C26**	**C27**	**C29**	**S31**	**KYB**	**YR5**	**YR241118**
Gram boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Pozitif; - Negatif, ONPG (ortho-Nitrophenyl-β-galactoside), ADH (Arginine dihydrolase), LDC (Lysine decarboxylase), ODC (Ornithine decarboxylase), TDA (Deaminase), VP (Asetoin üretimi)

Tablo 4.8: Stok kültürlerden pasajlanan *L. garviae* suşlarının morfolojik ve API Rapid ID 32 STREP test profilleri

	C3	C12	LGSO1	LGSO4	SLG	BLG	ELG
Gram boyama	+	+	+	+	+	+	+
Hareket	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	-	-	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	+
βGLU	+	+	+	+	+	+	+
βGAR	-	-	-	-	-	-	-
βGUR	-	-	-	-	-	-	-
GAL	-	-	-	-	-	-	-
PAL	-	-	-	-	-	-	-
RIB	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+
SOR	-	-	-	-	-	-	-
LAC	-	-	-	-	-	-	-
TRE	+	+	+	+	+	+	+
RAF	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	+
APPA	+	+	+	+	+	+	+
βGAL	-	-	-	-	-	-	-
PyrA	+	+	+	+	+	+	+
βNAG	-	-	-	-	-	-	-
GTA	-	-	-	-	-	-	-
HIP	-	-	-	-	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-	-	-
PUL	-	-	-	-	-	-	-
MAL	+	+	+	+	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-
MLZ	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	+	+	+
LARA	-	-	-	-	-	-	-
DARL	-	-	-	-	-	-	-
MβDG	+	+	+	+	+	+	+
TAG	+	+	+	+	+	+	+
βMAN	-	-	-	-	-	-	-
CDEX	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-

+: Pozitif; -: Negatif; ADH: L-arginine, βGLU: β-glucosidase; βGAR: β-Galactosidase; βGUR: β-glucoronidaseα; GAL: α-galactosidase; PAL: alkaline phosphatase; RIB: D-ribose; MAN: Mannitol; SOR: Sorbitol; LAC: Lactose; TRE: D-trehalose; RAF: D-raffinose; VP: Voges Proskauer; APPA: L-alanyl-L-phenylalanyl-Lprolineβ-naphthylamide; βGAL: β-galactosidase; PYRA: pyroglutamic acid- β-naphthylamide; β-NAG: N-Acetylβ- Glucosaminidase; GTA: Glycyl-Tryptophan Arylamidase; HIP: Hydrolysis of HIPpurate; GLYG: GLycogen; PUL: Pullulan; MAL: D-maltose; MEL: D-Melibiose; MLZ: D-melezitose; SAC: D-saccharose; LARA: L-arabinose; DARL: D-arabitol; MβDG: methyl-βD-glucopyranoside; TAG: D-tagatose; β MAN: β-mannosidase; CDEX: Dcyclodextrin; URE: Ureaz

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı ülkemizde bakteriyel balık patojenleri ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Sağlıklı balık üretiminin gerçekleştirilmesi ve balık ölümlerinin önlenmesi için patojenlerin erken teşhis edilmesi ve tedaviye başlanması gerekmektedir. Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan balık türlerinde en çok *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum*'un izole edildiği ve çiftliklerde ciddi ekonomik kayıplara sebep olduğu bildirilmiştir [125]. Bakteriyel balık patojenlerinin hızlı tanımlanması için aglütinasyon testleri dahil birçok serolojik yöntem kullanılmaktadır [11, 42, 75, 78, 94, 126]. İlk teşhis edilmelerinden günümüze birçok farklı bakteriyel balık patojenine ait farklı serotipler bildirilmiştir [11, 41, 73, 127-129]. Bu farklılığın belirli bir bölgede yoğun olarak tek bir serotipe ait uzun süre aşılamanın seçici baskınlık oluşturması ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir [130]. Etkili bir aşılama programının geliştirilmesi ve seroepidemiyolojik çalışmalar için hastalık oluşturan patojenlerin serotiplerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada 2014-2021 yılları içerisinde Ege Bölgesi'nde gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan balık çiftliklerinde ortaya çıkan Lactococcosis, Yersiniosis, Vibriosis vakalarında izole edilen bakteriyel suşlar İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları ve Biyoteknoloji laboratuvarından temin edilmiştir. *V. anguillarum*, *Y. ruckeri* ve *L. garvieae* suşlarının serolojik olarak identifikasyonu ve serotiplerinin belirlenmesi için lam aglütinasyon metodu kullanılmıştır.

V. anguillarum farklı coğrafi bölgelerde yüksek mortalite ile seyreden önemli bir bakteriyel balık patojenidir ve günümüzde 23 serotipinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu serotipler arasında serotip O1 ve O2'nin dünyanın farklı bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan birçok balık türünden izole edildiği ve en virülent serotip olduğu rapor edilirken, serotip O3'ün ise genellikle yetiştiriciliği yapılan ayu ve yılan balıklarından izole edildiği bildirilmiştir [37]. Bu çalışmada, referans *V. anguillarum* serotip O1 suşundan üretilen poliklonal antiserum ile hasta gökkuşağı alabalığından izole edilmiş

olan suşların tam-hücre ve termostabil O antijenleri lam aglütinasyon metodu ile incelenmiştir. Bütün *V. anguillarum* suşlarının tam-hücreleri ile gerçekleştirilen lam aglütinasyon testlerinde suşların referans antiserum ile pozitif reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir. Buna ek olarak termostabil O antijenleri ile yapılan aglütinasyon testlerinde V12 ve V13 kodlu suşlar hariç bütün suşlar serotip O1 olarak tiplendirilmiştir.

Sorensen ve Larsen [42] Danimarka'da 157'si gökkuşağı alabalığından, 64 tanesi morina balığından, 48 tanesi yılan balığından ve 9 tanesi pisi balığından olmak üzere toplam 270 hasta balıktan izole ettikleri *V. anguillarum* suşlarının serotipik dağılımlarını incelemişlerdir. Hasta balıklardan izole ettikleri suşların serotiplerinde önemli ölçüde farklılıklar bulunduğunu bildiren araştırmacılar, yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalığında Vibriosis'e neden olan en baskın serotipin O1 olduğunu (%70), doğadaki hasta balıklarda ise serotip O2'nin genellikle izole edildiğini (%75) bildirmiştir. Larsen ve diğ. [131] Farklı ülkelerde salmonid balık türlerinden izole edilmiş olan toplamda 322 *V. anguillarum* suşunun serolojik dağılımlarını incelemiş ve baskın serotipin O1 (%70,2) olduğunu rapor etmiştir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1: Salmonid türlerden izole edilen *V. anguillarum* suşlarının serotipleri [131]

İzolasyonun gerçekleştiği ülke	**İncelenen toplam suş sayısı**	**Serotip O1**	**(O2-O10 ve tiplendirilemeyenler)**
Danimarka	163	111	52
İsviçre	28	20	8
Norveç	57	46	11
Finlandiya	2	2	0
Birleşmiş Kırallık	6	4	2
Almanya	23	12	9
İtalya	22	18	4
Fransa	4	2	2
A.B.D	5	1	4
Kanada	12	10	2

Austin ve diğ. [132] 16 farklı ülkede 17 farklı balık türünden, su, sediment ve rotiferden izole edilen 260 *V. anguillarum* suşunun serolojik incelemesinde 184 suşun serotip O1 (%71) olduğunu bildirmiştir. Pedersen ve diğ. [133] Finlandiya (156), İsviçre (88) ve Danimarka'da (47) çoğunluğu gökkuşağı alabalığından izole edilmiş olan *V. anguillarum* suşlarının serotipik farklılıklarını incelemiştir. 156 Finlandiya suşundan 151'inin, 88 İsviçre suşundan 73'ünün ve 47 Danimarka suşundan 31'inin serotip O1 olduğunu tespit etmişlerdir.

Tanrıkul [24] Güney Ege bölgesinde sekiz farklı gökkuşağı alabalığı çiftliğinde hasta balıklardan *V. anguillarum* izole etmiş, lam aglütinasyon metodu ile serolojik dağılımlarını inceleyerek bütün suşların tavşanlarda üretilen serotip O1 antiserumu ile aglütinasyon verdiğini bildirmiştir. Çanak ve diğ. [134] Ege bölgesinde bulunan ağırlıkları 3-80 gram olan hasta çipura balıklardan 5 *V. anguillarum* suşu izole etmişlerdir. Tavşanlarda ürettikleri *V. anguillarum* serotip O1, O2 ve O3 antiserumları ile gerçekleştirdikleri serolojik testlerde üç suşun serotip O1 olarak tiplendirildiğini ancak diğer iki suşun test edilen hiçbir referans antiserum ile reaksiyona girmediğini bildirmişlerdir. Avsever ve Ün [135] 2006-2013 yıllarında Ege bölgesinde bulunan balık çiftliklerinden izolasyonunu gerçekleştirdikleri 51 *V. anguillarum* suşun serolojik dağılımlarını belirlemek için aglütinasyon testlerinde serotip O1, O2 ve O3 antiserumları ile karşılaştırmışlardır. Antijen-antikor reaksiyonları değerlendirildikten sonra 42 suşun serotip O1, 9 suşun ise serotip O2 antiserumu aglüte olduğunu bildirmişlerdir. Balta ve Dengiz Balta [47] Aralık 1999- Haziran 2014 tarihleri arasında Karadeniz bölgesinde Rize, Ordu ve Trabzon illerinde denizde bulunan 12 farklı gökkuşağı alabalığı çiftliğinde 32 *V. anguillarum* suşu izole etmişlerdir. Tavşanda ürettikleri *V. anguillarum* O1 antiserumu ile gerçekleştirdikleri lam aglütinasyon testinde bütün suşların serotip O1 olarak tanımlandığını bildirmişlerdir. Akaylı ve Durna [48] Ege Bölgesi'nde bulunan bir çiftlikte hasta levreklerden *V. anguillarum* izole etmiş, lam aglütinasyon testinde suşların sadece serotip O1 antiserumu ile reaksiyona girdiğini bildirmişlerdir. Dinçtürk ve Tanrıkul [49] hasta granyözlerden izole ettikleri *V. anguillarum* suşununun hangi serotipte olduğunu belirlemek için lam aglütinasyon metodunu kullanmış ve bu suşun serotip O1 ile aglütinasyon verdiğini belirtmişlerdir.

Tablo 5.2'de dünyanın farklı bölgelerinden ve Tablo 5.3'de Türkiye'den izole edilmiş *V.anguillarum* suşlarının serolojik farklılıklarına dair yapılmış olan çalışmalardan elde edilen veriler sunulmuştur. Bu çalışmada lam aglütinasyon metodu kullanılarak incelenen *V. anguillarum* suşlarında baskın serotipin O1 olarak tespit edilmesi daha önce yapılan çalışmalarda sunulan veriler ile benzerlik göstermektedir.

Tablo 5.2: Dünya'nın farklı bölgelerinde *V. anguillarum* suşlarının serolojik dağılımları üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler.

Mevcut Çalışma	%86 Serotip O1
Sorensen ve Larsen [42]	%70 Serotip O1
Larsen ve diğ. [131]	%70,2 Serotip O1
Austin ve diğ. [132]	%71 Serotip O1
Pedersen ve diğ. [133]	%86 Serotip O1

Tablo 5.3: Türkiye'de izole edilen *V. anguillarum* suşlarının serolojik dağılımları üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler.

Mevcut çalışma	%86 Serotip O1
Tanrıkul [24]	%100 Serotip O1
Çanak ve diğ. [134]	%60 Serotip O1
Avsever ve Ün [135]	%82 Serotip O1
Balta ve Dengiz Balta [47]	%100 Serotip O1
Akaylı ve Durna [48]	%100 Serotip O1
Dinçtürk ve Tanrıkul [49]	%100 Serotip O1

Enterik kızılağız hastalığının etiyolojik etkeni *Y. ruckeri* yetiştiriciliği yapılan salmonid türlerinde ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. *Y. ruckeri* ile enfekte gökkuşağı alabalığı ve Atlantik somonundan izole edilen suşların farklı serotipik dağılımlarının olabileceği bildirilmiştir [136]. Gökkuşağı alabalıklarında ortaya çıkan *Y.ruckeri* salgınlarının genelinde baskın olarak serotip O1'in, Atlantik somondan izole edilen suşlarda ise genellikle serotip O2, O5 ve O8 'in izole edildiği rapor edilmiştir [136]. Bu çalışma süresince, lam aglütinasyon methodu ile gökkuşağı alabalığından

izole edilmiş olan *Y. ruckeri* suşlarının serolojik teşhişi gerçekleştirilmiş ve serogrupları belirlenmiştir. 2014-2021 yılları arasında Yersiniosis vakalarından izole edilen suşların büyük bir çoğunluğu serotip O1 olarak tanımlanmıştır. Ancak, Y32, Y34, Y35 kodlu *Y.ruckeri* suşları tiplendirilememiştir.

Davies [75] farklı coğrafi bölgelerde ERM vakalarından izole edilmiş olan 127 *Y.ruckeri* suşu (Avrupa'dan 96, Kuzey Amerika'dan 23, Avustralya'dan 6, Güney Afrika'dan 2) ve dört tane referans suşun (ATCC 29473, NCMB 1315, NCMB 1316 ve NCTC 10477) karakteristik özelliklerini incelemiştir. Termostabil O antijeni ile gerçekleştirdiği çalışmada *Y. ruckeri* için yeni bir serotipik şema öneren Davies O1, O2, O5, O6 ve O7 serotiplerini tanımlamıştır. Çalışma süresince farklı ülkelerde izolasyonu gerçekleştirilmiş olan *Y. ruckeri* suşlarının antijen-antikor reaksiyonlarına göre baskın serotipler tespit edilmiştir. İncelenen *Y.ruckeri* suşlarında toplamda 105 suş serotip O1, 11 suş serotip O2, 5 suş serotip O5, 4 suş serotip O6 ve 5 suş serotip O7 olarak tanımlanmıştır. Farklı coğrafi bölgelerdeki baskın serotiplerin dağılımları; Bulgaristan, İtalya, İsviçre'den temin edilen suşların hepsinin serotip O1, Danimarka, Finlandiya, Fransa, Büyük Britanya, Norveç, Batı Almanya, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya ve Güney Afrika'daki *Y.ruckeri* suşlarınında ise baskın serotipin O1 olduğu bildirilmiştir. Romalde ve diğ. [77] farklı coğrafi bölgelerde ERM vakalarından izole edilmiş olan 53 *Y. ruckeri* suşunun serotiplerini incelemiş, serotip O1 (a, b), O2(a, b, c), O3 ve O4 antiserumları ile verdiği antijen-antikor reaksiyonlarına göre İspanya'da izole edilmiş olan *Y. ruckeri* suşlarının hepsinin serotip O1 olduğu belirlenmiştir. Romalde ve diğ. [137] İspanya'da izole ettikleri *Y. ruckeri* suşlarının serotipik özelliklerini tam-hücre ve termostabil O antijenleri ile incelemişlerdir. Tam hücreler ile yaptıkları aglütinasyon testlerinde iki antiserum (O1a ve O2b) ile reaksiyon oluşumu tespit ettikten sonra termostabil O antijeni ile antijen-antikor ilişkisini tekrar incelemiş ve somatik O antijenlerinin kullanımından sonra O1a ile görülen reaksiyonun ortadan kalktığı ve sadece O2b antiserumu ile aglütinasyon oluştuğu rapor edilmiştir. Bastardo ve diğ. [138] 2008 yılında Şili'de yetiştiriciliği yapılan *Salmo salar* çiftliklerinde ağırlığı 2-60 gram olan hasta balıklardan izole ettikleri 11 *Y. ruckeri* suşunun serotipik dağılımlarını antijen-antikor reaksiyonlarına göre değerlendirerek 9 suşun O1b, 1 suşun O1a ve 1 suşun O2b serotipte olduğunu bildirmişlerdir. Ormsby ve diğ. [78] 2001-2014 yıllarında Birleşik Krallık'da 109

tanesini Atlantik somondan ve 26 tanesini gökkuşağı alabalığından izole ettikleri 135 *Y. ruckeri* suşu ile 10 adet referans suşunun serolojik özelliklerini incelemişlerdir. Serolojik testlerde 29 suş serotip O1, 34 suş serotip O2, 14 suş serotip O5 olarak tiplendirirken 58 suşun iki antiserum (O1, O5) ile reaksiyona girdiği gözlemlenmiş, yapılan incelemeler sonrasında bu suşlar serotip O8 olarak tanımlanmış ve gökkuşağı alabalığından izole edilen 26 *Y. ruckeri* suşundan 24'ünün serotip O1, 2 suşun ise serotip O8 olduğu rapor edilmiştir. Wheeler ve diğ. [126] Farklı coğrafi bölgelerde ERM vakalarında izole edilmiş olan 160 *Y.ruckeri* suşu ve 14 referans suşun antijen-antikor reaksiyonlarını incelemiş, serolojik testlerde128 suşun serotip O1, 17 suşun serotip O2, 11 suşun serotip O5, 2 suşun serotip O6 ve 2suşun serotip O7 olduğunu bildirmişlerdir.

Altun ve diğ. [80] Türkiye'nin farklı bölgelerinde meydana gelen ERM vakalarından 19 *Y. ruckeri* suşu izole etmiş, serolojik testlerde bu suşların serotip O1 ve O2 antiserumları yapmış oldukları reaksiyonlara göre 18 suşu serotip O1 ve 1 suşu serotip O2 olarak tanımlamışlardır. Altun ve diğ. [81] 2009-2010 yıllarında hasta gökkuşağı alabalıklarından izole ettikleri 15 *Y. ruckeri* suşunun serotipik dağılımlarını incelemişlerdir. Tavşanlardan üretilen antiserumlar ile gerçekleştirdikleri serolojik testlerde 11 suşu serotip O1, 4 suşu serotip O2 olarak bildirmişlerdir. Balta ve diğ. [79] 2001-2008 yıllarında 16'sı Trabzon'da, 18'i Rize'de, 1'i Erzurum'da, 1'i Erzincan'da ve 1'i Artvin'de bulunan toplam 37 işletmeden 116 *Y. ruckeri* suşu izole etmişlerdir. Tavşanlarda üretilen *Y. ruckeri* O1 antiserumu ile gerçekleştirdikleri lam aglütinasyon testinde, 116 suşun 86 tanesini serotip O1 olarak tanımlamış, kalan 30 suşun tiplendirilemediği rapor edilmiştir. Dünya genelinde *Y. ruckeri* suşlarının serolojik dağılımlarının belirlenmesi epidomiyoloji, patogenez ve aşı geliştirme çalışmaları için büyük önem arz etmektedir. Tablo 5.4'te dünyanın farklı bölgelerinden ve Tablo 5.5'te Türkiye'de izole edilmiş *Y. ruckeri* suşlarının serolojik farklılıklarına dair yapılmış olan çalışma verilerinin benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada Güney Ege Bölgesi'nde bulunan gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde Yersiniosis vakalarında izole edilmiş olan *Y. ruckeri* suşlarının çoğunluğunun serotip O1 olarak tiplendirilmesi diğer çalışmalarda bildirilen veriler ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir.

Tablo 5.4: Dünya'nın farklı bölgelerinde *Y. ruckeri* suşlarının serolojik dağılımları üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler

	Serotip O1	**Diğer serotipler**
Mevcut Çalışma	%84	%16
Davies [75]	%80	%20
Romalde [77]	%100	%0
Romalde [137]	%0	%100
Bastardo ve diğ. [138]	%90	%10
Ormsby ve diğ. [78]	%21	%79
Wheeler ve diğ. [126]	%80	%20

Tablo 5.5: Türkiye'de izole edilen *Y. ruckeri* suşlarının serolojik dağılımları üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen veriler

	Serotip O1	**Diğer serotipler**
Mevcut çalışma	%84	%16
Altun ve diğ [80]	%95	%5
Altun ve diğ [81]	%73	%27
Balta ve Balta [79]	%74	%26

L. garvieae'nin serotipleri kapsül varlığı (serotip KG^-) ve kapsül bulunmamasına (serotip KG^+) bağlı olarak ikiye ayrılmıştır [97]. Ayrıca bu iki serotipin biyokimyasal ve genetik özelliklerinin birbirine çok benzer olduğu rapor edilmiştir [139]. Balık çiftliklerinden izole edilen *L. garvieae*'nin kapsüllü suşlarının oldukça virülent olduğu ancak, kapsülsüz suşların gökkuşağı alabalığında nadir olarak enfeksiyon oluşturabildiği tespit edilmiştir [117]. Buna ek olarak KG^+ antijenlerinin hücre kapsülünde değil hücre yüzeyinde bulunduğu, ancak KG- antijenlerinin kapsül materyalinde bulunduğu bildirilmiştir [140]. Çalışma süresince Ege Bölgesi'nde *Lactococcosis* vakalarında izole edilmiş olan *L. garvieae* suşlarının Japonya'da sarıkuyruktan izole edilmiş olan KG^- antiserumu (ATCC 49156) ve Türkiye'de gökkuşağı alabalığından izole edilmiş olan KG^- antiserumu (biyokimyasal ve moleküler tanımlı C3) ile oluşturdukları antijen-antikor reaksiyonları incelenmiştir. Çalışmada kullanılan *L. garvieae* suşlarının Japon KG^- antiserumu ile reaksiyon vermediği, Japon KG^- suşu dışındaki bütün suşların C3 antiserumu ile aglütinasyon oluşturduğu, Japon KG^- suşunun sadece kendi antiserumu ile reaksiyona girdiği

gözlemlenmiştir. Yoshida ve diğ. [95] Japonya'da yetiştiriciliği yapılan sarıkuyruklardan izole ettikleri *E. seriolicida* suşlarını lam aglütinasyon metoduyla incelemiştir. Serolojik testlerde tavşanlarda üretilen KG^+ ve KG^- antiserumları ile izole edilen suşların antijen-antikor reaksiyonları incelenmiş ve KG^- suşlarının sadece KG^- antiserumu ile aglütinasyon gösterdiği, KG^+ suşlarının ise hem KG^- hemde KG^+ antiserum ile reaksiyon verdiğini tespit edilmiştir. Bununla beraber KG^- serotipine ait suşların KG^+ serotipine ait suşlara oranla çok daha virülent olduğunu rapor etmişlerdir. Barnes ve Ellis [108] Avrupa'nın farklı bölgelerinden (İtalya, Birleşik Krallık, İspanya) izole edilen kapsüllü, kapsülsüz *L. garvieae* suşları ve Japonya'dan izole edilmiş kapsüllü, kapsülsüz *L. garvieae* suşların serolojik dağılımlarını incelemiştir. Serolojik testlerde Avrupa'dan izole edilen kapsüllü suşların, Japonya'dan izole edilen kapsüllü ve kapsülsüz suşlar ile reaksiyon vermediği ve benzer verilerin Japonya'dan izole edilen suşlar ile de elde edildiğini bildirirken kapsülsüz suşların izole edildiği lokasyon fark etmeksizin birbirleri ile reaksiyona girdiğini bildirmiştir. Oinka ve diğ. [109] 2012-2013 yılları arasında hasta sarıkuyruklardan *L. garvieae* izole etmişlerdir. Ancak izole ettikleri patojenin teşhisi için lam aglütinasyon metodunda KG- ve KG+ antiserumları ile aglütinasyon vermediğini gözlemlemiş ve moleküler identifikasyon ile bakteriyi *L. garvieae* olarak tanımlamışlardır. Çağırgan [141] Türkiye'de gökkuşağı alabalığından izole ettiği 20 *L. garvieae* suşunun İspanya'dan temin edilen kapsüllü *L. garvieae* suşundan elde edilen antiserum ile reaksiyonunu lam aglütinasyon metoduyla incelemiş ve bütün suşların pozitif reaksiyon verdiğini bildirmiştir. Bu veriler doğrultusunda Türk *L. garvieae* suşlarının İspanyol KG- suşları ile benzer bir yapıda olduğu gözlemlenmektedir. Bu çalışmada, Türkiye'de Lactococcosis vakalarında izole edilmiş olan *L. garvieae* suşlarının Japon KG^- ve Türk KG^- suşlarından üretilen antiserumlar ile oluşturduğu aglütinasyon sonuçları incelenerek Türk KG^- suşlarının Japon KG^- suşları ile farklı serotipte olduğu tespit edilmiştir. Barnes ve Ellis [108]'in bildirdiği Avrupa KG- suşlarının Japon KG- suşları ile farklı serotiplerde olduğunu tespit etmesi ile bu çalışmada elde edilen veriler benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada bütün veriler karşılaştırıldığında Türk suşlarının Barnes ve Ellis [108] tarafından belirtilen Avrupa serotipine dahil olduğunu ve Japon KG- suşlarının farklı bir serotipte olduğunu desteklemektedir.

BÖLÜM 6

SONUÇ

V. anguillarum, Y. ruckeri ve *L. garvieae*'nin neden olduğu hastalıklar gökkuşağı alabalığında yüksek mortalite ile seyrederek ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu çalışmada lam aglütinasyon testi ile bakteriyel balık patojenlerinin serolojik teşhisi gerçekleştirilmiş ve bölgede salgın hastalıklardan izole edilen suşların serotipleri belirlenmiştir. Lam aglütinasyon metodu balık hastalıklarına sebep olan patojenlerin erken teşhisinin gerçekleştirilmesi ve uygun tedavinin belirlenerek ekonomik kayıpların önüne geçilmesine olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda baskın serotiplerin belirlenmesinin uygulanacak koruma-kontrol yöntemlerinin iyileştirilmesi için kullanılabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

[1] Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 2005; 246(1-4): 37-61.

[2] Austin B, Austin DA. (Ed.) Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish, 6th ed. Springer International Publishing Switzerland; 2016.

[3] Austin B. Methods for the diagnosis of bacterial fish diseases. Marine Life Science and Technology 2019; 1(1): 41-49. https://doi.org/10.1007/s42995-019-00002-5

[4] Kinne O. (Ed.) Diseases of Marine Animals: General aspects, protozoa to gastropoda, Chichester: John Wiley and Sons; 1980.

[5] Austin B, Austin DA. (Ed.) Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish, 5th ed. New York, Springer; 2012.

[6] Toranzo AE, Romalde JL, Magariños B, Barja JL. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. Ed.: Rogers C, Basurco B. The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. Zaragoza. CIHEAM, Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens n. 86; 2009. 155-176.

[7] Toranzo AE. Report about fish bacterial diseases. Ed.: Alvarez-Pellitero P, Barja JL, Basurco B, Berthe F, Toranzo AE. Mediterranean aquaculture diagnostic laboratories. Zaragoza: CIHEAM, Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 49; 2004. 49-89

[8] Ulukoy G, Yildirim P, Kubilay A. Present Status of Bacterial Diseases of Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss, in Turkey. Fish and Shellfish Immunology 2016; 100(53): 117-118.

[9] de la Peña LD. Immunological and molecular biology techniques in disease diagnosis. Ed.: Lio-Po GD, Lavilla CR, Cruz-Lacierda ER. Health Management in Aquaculture. Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center; 2001. 137-158.

[10] Rabb L, Cornick JW, McDermott LA. A macroscopic-slide agglutination test for the presumptive diagnosis of furunculosis in fish. The Progressive Fish-Culturist 1964; 26(3): 118-120.

[11] Toranzo AE, Baya AM, Roberson BS, Barja JL, Grimes DJ, Hetrick FM. Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. Aquaculture 1987; 61(2): 81-97.

[12] Romalde JL, Magarinos B, Fouz B, Bandin I, Nunez S, Toranzo AE. Evaluation of BIONOR Mono-kits for rapid detection of bacterial fish pathogens. Diseases of Aquatic Organisms 1995; 21(1): 25-34.

[13] Saeed MO, Plumb JA. Serological detection of Edwardsiella ictaluri Hawke lipopolysaccharide antibody in serum of channel catfish, Ictalurus punctatus Rafinesque. Journal of Fish Diseases 1987; 10(3): 205-209.

[14] Drouin de Bouville RD. Les maladies des poissons d'eau douce d'Europe. Annales des Sciences agronomiques. 1907.

[15] Canestrini G. La malattia dominante delle anguille. Atti Ist. Veneto Sci. Lett. Arti Cl. Sci. Mat. Nat 1893; 7: 809-814.

[16] Bergman AM. Die rote beulenkrankheit des aals. Bericht aus der Koniglichen Bayerischen Versuchsstation 1909; 2: 10-54.

[17] MacDonell MT, Colwell RR. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, Listonella and Shewanella. Systematic and applied microbiology 1985; 6(2): 171-182.

[18] Bagge J, Bagge O. *Vibrio anguillarum* som arsag til ulcussygdom hos torsk (*Gardus callarias*, Linne). Nordisk Veterinarmedicin 1956; 8: 481-492.

[19] Rucker RR. Status of fish diseases and relation to production. In Report of the Second Governor's Conference on Pacific Salmon, Seattle 1963; 98-101.

[20] Kubota SS, Takakuwa M. Studies on the disease of marine culture fishes. 1. General description and preliminary discussion of fish diseases at Mie Prefecture. J Facul Fish Prefect Uni Mie 1963; 6: 107–124.

[21] Egidius E, Andersen K, Clausen E, Raa J. Cold-water vibriosis or'Hitra disease'in Norwegian salmonid farming. Journal of Fish Diseases 1981; 4(4): 353-354.

[22] Candan A. Çipura (*Sparus aurata* L. 1758) balıklarında *Vibrio anguillarum* infeksiyonu. Türk Mikrobiyoloji Cem. Dergisi 1993; 23: 25-27.

[23] Çağırgan H. Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata* L.) ve levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis 159 ve tedavisi üzerine bir araştırma (doktora Tezi). Ege Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı, İzmir; 1993.

[24] Tanrikul TT. Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) in Turkey. Pakistan journal of biological sciences: PJBS 2007; 10(10): 1733-1737. https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.1733.1737

[25] Austin B, Austin DA. (Ed.) Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish, 4th ed. Praxis Publishing Ltd Chichester, UK; 2007.

[26] Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH. Vibriosis. Ed.: Whoo PTK, Bruno DW. Fish Diseases and Disorders. CABI Publishing, London; 1999. 523-558.

[27] Woo PTK, Bruno DW (Eds) Fish Diseases and Fungal Infections: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing; 1999.

[28] Dinçtürk E. Alabalıklarda bakteriyel balık patojenlerinin teşhisinde yeni izolasyon ve identifikasyon yöntemlerinin uygulanması (doktora tezi). İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü/ Su Ürünleri Anabilim Dalı; 2019.

[29] Noga EJ. Fish Diseases: Diagnosis and Treatment. Iowa State University Press Ames; 2000. 367.

[30] Hjeltnes B, Roberts RJ. Vibriosis Bacterial diseases of fish. 1993.109-121.

[31] Timur G, Timur M. (Ed.) Balık Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayını, İstanbul; 2003.

[32] Gratacap RM. Characterisation of *Vibrio anguillarum* fort he development of vaccine in cod (*Godus morhua*) (Degree of Doctor of Philosophy) University of Stirling, Institue of Aquaculture, Stirling, Scotland; 2008.

[33] Haenen, OLM, Fouz Rodríguez B, Amaro González C, Isern MM, Mikkelsen H, Zrnčić S. ve diğ. Vibriosis in aquaculture. 16th EAFP Conference, Tampere, Finland, 4th September 2013. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 2014, 34(4): 138-147.

[34] Frans I, Michiels CW, Bossier P, Willems KA, Lievens B, Rediers H. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. Journal of fish diseases 2011; 34(9): 643-661.

[35] Ceylan M, Duman M, Sevda I, Ozyigit O., Satıcıoglu IB, Altun S. The Study of histopathologic Changes of Experimental Infection with *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* in Rainbow Trout. Journal of Research in Veterinary Medicine 2019; 38(1): 59-66.

[36] Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH. Vibriosis, Ed.: Whoo PTK, Bruno DW. Fish diseases and disorders. Volume 3: viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, London; 2011. 570-605.

[37] Toranzo AE, Magariños B, Avendaño-Herrera R. Vibriosis: *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii* and *Aliivibrio salmonicida*. Ed: Woo PTK, Cipriano RC. Fish viruses and bacteria: pathobiology and protection. CABI Publishing; 2017. 314-333.

[38] Pacha RE, Kiehn ED. Characterization and relatedness of marine vibrios pathogenic to fish: physiology, serology, and epidemiology. Journal of Bacteriology 1969; 100(3): 1242-1247.

[39] Johnsen GS. Immunological studies on *Vibrio anguillarum*. Aquaculture 1977; 10(3): 221-230.

[40] Strout RG, Sawyer ES, Coutermarsh BA. Pathogenic vibrios in confinement-reared and feral fishes of the Maine–New Hampshire coast. Journal of the Fisheries Board of Canada 1978; 35(4): 403-408.

[41] Kitao T, Aoki T, Fukudome M, Kawano K, Wada Y, Mizuno Y. Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased freshwater fish in Japan. Journal of fish diseases 1983; 6(2): 175-181.

[42] Sørensen UB, Larsen JL. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology 1986; 51(3): 593-597.

[43] Bolinches J, Lemos ML, Fouz B, Cambra M, Larsen JL, Toranzo AE. Serological relationships among *Vibrio anguillarum* strains. Journal of Aquatic Animal Health 1990; 2(1): 21-29.

[44] Kitao T, Aoki T, Muroga K. Three new O-serotypes of *Vibrio anguillarum* [isolated from ayu, *Plecoglossus altivelis*]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan) 1984; 50(11) 1955-

[45] Grisez L, Ollevier F. Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Applied and environmental microbiology 1995; 61(12): 4367-4373.

[46] Pedersen K, Grisez L, Van Houdt R, Tiainen T, Ollevier F, Larsen JL. Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. Current microbiology 1999; 38(3): 183-189.

[47] Balta F, Dengiz Balta Z. Serotyping, genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *Vibrio anguillarum* strains isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the eastern Black Sea. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2017; 64(4): 321-328.

[48] Akaylı T, Durna M. Characterization of *Vibrio anguillarum* Isolates Recovered From Diseased Cultured European Sea Bass (*D. labrax*). Kocatepe Veteriner Dergisi 2017; 10(3): 134-141.

[49] Dinçtürk E, Tanrıkul TT. Clinical listonellosis in meagre (*Argyrosomus regius*) from recirculated aquaculture system in Turkey. Acta Veterinaria Brno 2018; 87(3): 269-275.

[50] Harrell L. Isolation and description of two vibrios pathogenic to Pacific salmon in Puget Sound, Washington. Fisheries bulletin 1976; 74: 447-449.

[51] Gould RW, Antipa R, Amend DF. Immersion vaccination of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) with two pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. Journal of the Fisheries Board of Canada 1979; 36(2): 222-225.

[52] Ezura Y, Tajima K, Yoshimizu M, Kimura T. Studies on the taxonomy and serology of causative organisms of fish vibriosis. Fish Pathology 1980; 14(4): 167-179.

[53] Baudin Laurencin F. Fish vibrio strains antisera in France. In International symposium on Fish biologics: Serodiagnostics and vaccines. Development in Biological Standards 1981; 257-259.

[54] Chart H, Trust TJ. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Canadian journal of microbiology 1984; 30(5): 703-710.

[55] Goerlich, R. Monoclonal antibodies for a comparative serological study of strains of *Vibrio anguillarum*. Journal of Applied Ichthyology 1987; 3(2): 82-87.

[56] Song YL, Chen SN, Kou GH. Serotyping of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish in Taiwan. Fish Pathology 1988; 23(3): 185-189.

[57] Ross AJ, Rucker RR, Ewing WH. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian journal of microbiology 1966; 12(4): 763-770.

[58] Horne MT, Barnes AC, Woo PTK, Bruno DW. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). Fish diseases and disorders 1999; 3: 455-477.

[59] Shaowu L, Di W, Hongbai L, Tongyan L. Isolation of *Yersinia ruckeri* strain H01 from farm-raised amur sturgeon *Acipenser schrencki* in China. Journal of Aquatic Animal Health 2013; 25(1): 9-14.

[60] Fernández L, Méndez J, Guijarro JA. Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. Veterinary microbiology 2007; 125(1-2): 1-10.

[61] Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. Journal of fish diseases 2007; 30(5): 257-268.

[62] Bridle AR, Koop BF, Nowak BF. Identification of surrogates of protection against yersiniosis in immersion vaccinated Atlantic salmon. PLoS One 2012; 7(7): e40841.

[63] Costa AA, Leef MJ, Bridle AR, Carson J, Nowak BF. Effect of vaccination against yersiniosis on the relative percent survival, bactericidal and lysozyme response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 2011; 315(3-4): 201-206.

[64] Ormsby MJ, Grahame E, Burchmore R, Davies RL. Comparative bioinformatic and proteomic approaches to evaluate the outer membrane proteome of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. Journal of proteomics 2019; 199: 135-147.

[65] Davies RL, Frerichs GN. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. Journal of Fish Diseases 1989; 12(4): 357-365.

[66] Çağirgan H, Yüreklitürk O. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout farm in Turkey. In The fifth conference of EAFB, Disease of Fish and Shellfish 1991; 24-29.

[67] Rucker RR. Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin-office international des epizooties 1966; 65(5): 825-830.

[68] Horne MT, Barnes AC. Enteric redmouth disease (*Y. ruckeri*). Ed.: Woo PTK, Bruno DW. Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing, Oxfordshire; 1999. 455–477.

[69] Avci H, Birincioğlu S. Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 2006; 29(6): 1321-1328.

[70] Kubilay A. Gökkuşağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Patojen Bakteri *Yersinia ruckeri*'ye karşı antikor üretimi ve tespiti üzerine bir araştırma. (Doktora tezi) Süleyman Demirel Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü/ Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı; 1997.

[71] O'Leary PJ. Enteric redmouth bacterium of salmonids: a biochemical and serological comparison of selected isolates. (MSc Thesis), Oregon State University, Corvallis, OR; 1977.

[72] Bullock GL, Stuckey HM, Shotts EB. Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic areas. Journal of Fish Diseases 1978; 1: 351–356.

[73] Stevenson RMW, Airdrie DW. Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. Journal of Fish Diseases 1984; 7(4): 247-254.

[74] Daly JG, Lindvik B, Stevenson RMW. Serological heterogeneity of recent isolates of *Yersinia ruckeri* from Ontario and British Columbia. Diseases of Aquatic Organisms 1986; 1(2): 151-153.

[75] Davies RL. O-serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates. Veterinary microbiology 1990; 22(4): 299-307.

[76] De Grandis SA, Stevenson RMW, Airdrie DW, Krell PJ. A systematic study of genetic and other characteristics of *Yersinia ruckeri* strains. In Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol 1984; 128.

[77] Romalde JL, Magarinos B, Barja JL, Toranzo AE. Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* proposal for a new intraspecies classification. Systematic and Applied Microbiology 1993; 16(3): 411-419.

[78] Ormsby MJ, Caws T, Burchmore R, Wallis T, Verner-Jeffreys DW, Davies RL. *Yersinia ruckeri* isolates recovered from diseased Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Scotland are more diverse than those from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and represent distinct subpopulations. Applied and environmental microbiology 2016; 82(19): 5785-5794.

[79] Balta F, Sandalli C, Kayis S, Ozgumus, OB. Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol 2010; 30(6): 211-9.

[80] Altun S, Kubilay A, Diler Ö. *Yersinia ruckeri* suşlarının fenotipik ve serolojik özelliklerinin incelenmesi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2010; 16(Suppl B); 223-229.

[81] Altun S, Onuk EE, Ciftci A, Duman M, Büyükekiz AG. Determination of phenotypic, serotypic and genetic diversity and antibiotyping of *Yersinia ruckeri* isolated from rainbow trout. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2013; 19(2): 225-232.

[82] Kusuda R, Kawai K, Toyoshima T, Komatsu I. A new pathogenic bacterium belonging to the genus Streptococcus isolated from an epizootic of cultured yellowtail. Nippon Suisan Gakkaishi 1976; 42:1345-1352

[83] Kusuda R, Kawai K. Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. Fish pathology 1998; 33(4): 221-227.

[84] Collins MD, Farrow JAE, Phillips BA, Kandler O. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. Microbiology 1983; 129(11): 3427-3431.

[85] Kusuda R, Kawai K, Salati F, Banner CR, Fryer JL. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 1991; 41(3): 406-409.

[86] Domenech A, Prieta J, Fernandez-Garayzabal JF, Collins MD, Jones D, Dominguez L. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garviae* and *Enterococcus seriolicida*. Microbiologia-Madrid 1993; 9: 63-63.

[87] Pot B, Devriese LA, Ursi D, Vandamme P, Haesebrouck F, Kersters K. Phenotypic identification and differentiation of Lactococcus strains isolated from animals. Systematic and applied microbiology 1996; 19(2): 213-222.

[88] Eldar A, Ghittino C, Asanta L, Bozzetta E, Goria M, Prearo M, ve diğ. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. Current microbiology 1996; 32(2): 85-88.

[89] Teixeira LM, Merquior VLC, Vianni MDCE, Carvalho MDGS, Fracalanzza SE, Steigerwalt AG, ve diğ. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 1996; 46(3): 664-668.

[90] Mannion PT, Rothburn MM. Diagnosis of bacterial endocarditis caused by *Streptococcus lactis* and assisted by immunoblotting of serum antibodies. The Journal of infection 1990; 21(3): 317-318.

[91] Elliott JA, Collins MD, Pigott NE, Facklam RR. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. Journal of Clinical Microbiology 1991; 29(12): 2731-2734.

[92] Toranzo AE, Devesa S, Heinen P, Riaza A, Nunez S, Barja JL. Streptococcosis in cultured turbot caused by an *Enterococcus*-like bacterium. Bulletin-European Associatıon of Fish Pathologists 1994; 14: 19-19.

[93] Nieto JM, Devesa S, Quiroga I, Toranzo AE. Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L. Journal of Fish Diseases 1995; 18(1): 21-30.

[94] Kitao T. The methods for detection of *Streptococcus* sp., causative bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) especially, their cultural, biochemical and serological properties. Fish Pathology 1982; 17(1): 17-26.

[95] Yoshida T, Eshima T, Wada Y, Yamada Y, Kakizaki E, Sakai M, ve diğ. Phenotypic variation associated with an anti-phagocytic factor in the bacterial fish pathogen *Enterococcus seriolicida*. Diseases of aquatic organisms 1996; 25(1-2): 81-86.

[96] Yoshida T, Endo M, Sakai M, Inglis V. A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Diseases of aquatic organisms 1997; 29(3): 233-235.

[97] Romalde JL, Toranzo AE. Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. Ed.: Cunningham CO. Molecular diagnosis of salmonid diseases. Springer, Dordrecht; 2002. 211-233.

[98] Çagirgan H, Tanrikul TT. (1995). A new problem *Enterococcus*-like infection in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Turkey. Vet Kont ve Arast Enst Md Derg C 1995; 19: 33.

[99] Diler O, Altun S, Adiloglu AK, Kubilay A, Isıklı B. First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Bulletin-European Association of Fish Pathologists 2002; 22(1), 21-26.

[100] Avcı, H., Aydoğan A, Tanrıkul TT, Birincioğlu, SS. Pathological and microbiological investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) naturally infected with *Lactococcus garvieae*. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2010; 16: 313-318.

[101] Ortega C, Irgang R, Valladares-Carranza B, Collarte C, Avendaño-Herrera, R. First identification and characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in mexico. Animals 2020; 10(9): 1609.

[102] Öztürk T, Didinen BI, Doğan G, Özer A, Bircan R. Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in the middle Black Sea Region in Turkey and antimicrobial susceptibility of the aetiological agent, *Lactococcus garvieae*. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 2013; 24: 7-12.

[103] Austin B, Austin DA. Bacterial Fish Pathogens. Disease of farmed and wild fish. Springer/ Praxis Publishing. Chichester, 1999.

[104] Michel C, Nougayrede P, Eldar A, Sochon E, De Kinkelin P. *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. Diseases of Aquatic Organisms 1997; 30(3): 199-208.

[105] Eldar A, Bejerano Y, Bercovier H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Current Microbiology 1994; 28(3): 139-143.

[106] Frerichs GN. Isolation and identification of fish bacterial pathogens. Ed.: Inglis V, Roberts RI, Bromage NR. Bacterial diseases of fish. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK 1993; 257-286.

[107] Kawahara E, Kusuda R, Direct fluoerescent antibody technique for diagnosis of bacterial disease in eel. Nippon Suisan Gakkaishi 1987; 53: 395-399

[108] Barnes AC, Ellis AE. Role of capsule in serotypic differences and complement fixation by *Lactococcus garvieae*. Fish & shellfish immunology 2004; 16(2): 207-214.

[109] Oinaka D, Yoshimura N, Fukuda Y, Yamashita A, Urasaki S, Wada Y, ve diğ. Isolation of *Lactococcus garvieae* showing no agglutination with anti-KG-phenotype rabbit serum. 魚病研究 The Japanese Society of Fish Pathology 2015; 50(2): 37-43.

[110] Elliott DG. General procedures for bacteriology. American Fisheries Society, Bethesda/ MD, 2003.

[111] Tanrıkul TT, Çağırgan H, Tokşen E. Levrek'lerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) İzole Edilen Vibrio Türlerinin API 20E Yöntemiyle İdentifikasyonu. Su Ürünleri Dergisi 2004; 21(3): 243-247.

[112] Altinok İ, Kurt İ. Molecular diagnosis of fish diseases: a review. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 2003; 3(2): 131-138.

[113] Austin B, Newaj-Fyzul A. (Ed.) Diagnosis and control of diseases of fish and shellfish. John Wiley and Sons, UK; 2017.

[114] Us DA. (Ed.) Temel İmmünoloji ve Seroloji. Hipokrat Kitabevi Sıhhiye/Ankara; 2016.

[115] Darwish IA. Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances. International journal of biomedical science IJBS 2006; 2(3): 217.

[116] Önalan Ş, Çağırgan M, Arabacı M, Çağırgan H. Serological Methods Used for Classification of Bacterial Fish Pathogens. Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences 2016; 1(3): 77-82.

[117] Barnes AC, Guyot C, Hansen BG, Mackenzie K, Horne MT, Ellis AE. Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates ofLactococcus garvieae to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). Fish & shellfish immunology 2002; 12(2): 155-168.

[118] Hansen CB, Lingg AJ. Inert particle agglutination tests for detection of antibody to enteric redmouth bacterium. Journal of the Fisheries Board of Canada 1976; 33(12): 2857-2860.

[119] McCarthy DH, Whitehead P. An Immuno-India Ink Technique for Rapid Laboratory Diagnosis of Fish Furunculosis. Journal of Applied Bacteriology 1977; 42(3): 429-431.

[120] Geck P. India-ink immune-reaction for the rapid detection of enteric pathogens. Acta microbiologica Academiae scientiarum hungaricae 1972; 18(3): 191-6.

[121] Çağırgan H. Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) Serumlarında Kompetitif Elisa ile İnfeskiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN) ve Viral Hemorajik Septisemi (VHS) Antikorlarının Aranmasında Görülen Sorun. Su Ürünleri Dergisi 1997; 14: 25-36.

[122] Değirmenci U. Alabalıklarda (*Oncorhynchus Mykıss*, Walbaum) Viral Hemorajik Septisemi (VHS) Hastalığının Teşhisi İçin Elısa Yönteminin Geliştirilmesi (Doktora tezi) Ege Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü/ Yetiştiriclik Anabilim Dalı; 2010.

[123] Aydın N. (Ed.) İmmunoloji ve Seroloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; 1987.

[124] Longyant S, Chaiyasittrakul K, Rukpratanporn S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul P. Simple and direct detection of *Aeromonas hydrophila* infection in the goldfish, *Carassius auratus* (L.), by dot blotting using specific monoclonal antibodies. Journal of fish diseases 2010; 33(12): 973-984.

[125] Uluköy G, Baba E, Sayın Z. *Listonella anguillarum* ve *Yersinia ruckeri* Balık Patojenleri Üzerine Mantar ve Bitki Ekstraktlarının In Vitro Antibakteriyel Aktivitesinin. Su Ürünleri Dergisi 2013; *28*(2): 119-134.

[126] Wheeler RW, Davies RL, Dalsgaard I, Garcia J, Welch TJ, Wagley S, ve diğ. *Yersinia ruckeri* biotype 2 isolates from mainland Europe and the UK likely represent different clonal groups. Diseases of aquatic organisms 2009; 84(1): 25-33.

[127] Leblanc D, Mittal KR, Olivier G, Lallier R. Serogrouping of motile Aeromonas species isolated from healthy and moribund fish. Applied and Environmental Microbiology 1981; 42(1): 56-60.

[128] Nakai T, Muroga K, Wakabayashi H. Serological properties of Pseudomonas anguilliseptica. Bull. Jpn. Sot. Sci. Fish 1981; 47: 699-703.

[129] Nomura J, Aoki T. Morphological analysis of lipopolysaccharide from gram-negative fish pathogenic bacteria. Fish Pathology 1985; 20(2-3): 193-197.

[130] Bachrach G, Zlotkin A, Hurvitz A, Evans DL, Eldar A. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a Streptococcus vaccine. Applied and environmental microbiology 2001; 67(8): 3756-3758.

[131] Larsen JL, Pedersen K, Dalsgaard I. *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. Journal of Fish Diseases 1994; 17(3), 259-267.

[132] Austin B, Alsina M, Austin DA, Blanch AR, Grimont F, Grimont PAD, ve diğ. Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: a comparison of different methods. Systematic and Applied Microbiology 1995; 18(2): 285-302.

[133] Pedersen K, Kühn I, Seppänen J, Hellström A, Tiainen T, Rimaila-Pärnänen E, ve diğ. Clonality of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish from the Scandinavian countries, Sweden, Finland and Denmark. Journal of applied microbiology 1999 ; 86(2): 337-347.

[134] Çanak Ö, Akaylı T, Toranzo AE, Castro N. Characterization of *Vibrio anguillarum* isolated from cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*) in turkey. Aquaculture Europe 14 Conferance San Sebastian/ Spain, 2004.

[135] Avsever ML, Ün C. Distribution of hemolysin genes in Turkish *Vibrio anguillarum* isolates. Bull Eur Ass Fish Pathol 2015; 35: 75-84.

[136] Ormsby MJ, Davies RL. Diversification of OmpA and OmpF of *Yersinia ruckeri* is independent of the underlying species phylogeny and evidence of virulence-related selection. Scientific reports 2021; 11(1): 1-13.

[137] Romalde JL, Planas E, Sotelo JM, Toranzo AE. First description of *Yersinia ruckeri* serotype O2 in Spain. Bulletın-European Assocıatıon Of Fısh Pathologısts 2003; 23(3): 135-138.

[138] Bastardo A, Bohle H, Ravelo C, Toranzo AE, Romalde JL. Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. Diseases of aquatic organisms 2011; 93(3): 207-214.

[139] Eldar A, Ghittino C, Asanta L, Bozzetta E, Goria M, Prearo M, ve diğ. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. Current microbiology 1996; 32(2): 85-88.

[140] Ooyama T, Hirokawa Y, Minami T, Yasuda H, Nakai T, Endo M, ve diğ. Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Diseases of aquatic organisms 2002; 51(3): 169-177.

[141] Çağırgan H. Biotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated from Turkey. Su Ürünleri Dergisi 2004; 21(3-4): 267-269.

Ekler

Ek A

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Konferans Bildirileri

1. Kumaş K, Tanrıkul TT. Diagnosis of Bacterial Fish Pathogens with Using Slide Agglutination Method. ICVAS2021: 6th International Congress on Veterinary and Animal Sciences Congress; 2021 September, 2-4; Online. p122. ISBN:978-605-70057-6-2.

Projeler

1. İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2021-TYL-FEBE-0012 numaralı projesi

Ek B

Etik Kurul Onayı

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2021/027 24.03.2021
KONU: Onay

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **"LAM AGLÜTİNASYON METODU İLE BAKTERİYEL BALIK HASTALIKLARININ TEŞHİSİ"** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Prof. Dr. T. Tansel TANRIKUL, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi
Arş. Gör. Kaan KUMAŞ, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda 12 adet her iki cinsiyetten Yeni Zelanda Tavşanı deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Prof. Dr. Ayşül ÖNAL

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. Tigen KIRKPINAR

Prof. Dr. Hasmet ÇAĞIRGAN

Prof. Dr. Uğur KAYA

Dr. Öğr. Üyesi Sunura SÖZER KARADAĞLI

Vet. Hek. F. Burak SOYLU

Özcan NALBANTOĞLU

Melek Merve AFŞAROĞLU

Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Kaan KUMAŞ

EĞİTİM

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi/ Su Ürünleri Mühendisliği bölümü (Mezuniyet Tarihi: 18.01.2019)

West Pomeranian University of Technology Faculty of Food Sciences and Fisheries (Erasmus+ programme 27.02.2017- 30.06.2017)

Anadolu Universitesi/ Açıköğretim Fakültesi/ Sağlık Programları Bölümü/ Laborant ve Veteriner Sağlık (Mezuniyet Tarihi: 08.06.2021)

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/ Su Ürünleri Anabilim Dalı (Tezli Yüksek Lisans)

İŞ DENEYİMİ

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Araştırma ve Geliştirme tesisinde 30 (otuz) iş günü staj.

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Balık Hastalıkları ve Biyoteknoloji Laboratuvarında 9 (dokuz) iş günü staj.

West Pomeranian University of Technology, Faculty of Food Sciences and Fisheries, Department of Aquaculture. Szczecin/Poland bünyesinde 02.07.2018- 12.10.2018 tarihleri arası staj.

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi (04.01.2021- devam ediyor)

YAYINLAR VE BİLDİRİLER

Dinçtürk E, Tanrıkul TT, **Kumaş K**. *Lernea cyprinacea* Infesttions in Balloon Molly. ICVAS2021: 6th International Congress on Veterinary and Animal Sciences Congress; 2021 September, 2-4; Online. p133. ISBN:978-605-70057-6-2.

Kumaş K, Tanrıkul TT. Diagnosis of Bacterial Fish Pathogens with Using Slide Agglutination Method. ICVAS2021: 6th International Congress on Veterinary and Animal Sciences Congress; 2021 September, 2-4; Online. p122. ISBN:978-605-70057-6-2.

Karadal O, Dinçtürk E, **Kumaş K**. Melanized Lesions in Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*) Reared in the Laboratory Conditions. Oceanography & Fisheries 2021; 12(2).

Dinçtürk E, Tanrıkul TT, **Kumaş K.** Gökkuşağı Alabalıklarında Görülen Deri Hastalıkları. 21. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu; 2021 Kasım, 15-16. p14. ISBN: 978-625-7960-6