



RESEARCH ARTICLE

Deneysel *Vagococcus salmoninarum* enfeksiyonunda gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) görülen patolojik bulgular

S. Serap Birincioglu^{1*}, Hamdi Avcı¹, T. Tansel Tanrikulu², E. Tuğrul Epikmen¹, M. Lütfi Avsever³

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Batı Kampüsü, 09016, Aydın, ²Katip Çelebi Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Hastalıklar Anabilim Dalı, Balatçık Kampüsü, 35620, İzmir, ³Aksaray Üniversitesi, Eski Meslek Yüksekokulu, Veteriner ve Laboratuvar Bilimleri Bölümü, 68800, Aksaray, Türkiye

Geliş: 31.10.2016, Kabul: 15.12.2016

*sbirincioglu@adu.edu.tr

Deneysel *Vagococcus salmoninarum* enfeksiyonunda gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) görülen patolojik bulgular

Eurasian J Vet Sci, 2017, 33, 1, 46-53

DOI: 10.15312/EurasianJvetSci.2016.135

Öz

Amaç: Çalışmada, *Vagococcus salmoninarum* (*V. salmoninarum*)'un erişkin balıklara farklı yollarla [intra-peritoneal (IP) ve immersiyon (IM)] verilerek oluşan deneysel enfeksiyonun klinik, makroskopik ve histopatolojik bulguları araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Toplam dört grupta (deneme immersiyon-DİM, deneme intra-peritoneal-DİP ve iki kontrol) 60 adet gökkuşuğu alabalığı kullanıldı. Balıklar *Vagococcus salmoninarum* (accession number: KJ685901) izolatı ile enfekte edildi. Histopatolojik inceleme için doku örnekleri %10'luk formalinde tesbit edilerek rutin takibi yapıldı. Kesitler hematoxilen-eozin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Etkenin moleküler analizi için DNA ekstraksiyonunu takiben, PCR ile ilgili primer çiftleri kullanılarak identifikasyon yapıldı. Elde edilen ürünlerde sekans analizi gerçekleştirildi.

Bulgular: Deneme gruplarında mortalite oranı %100 olarak belirlendi. Makroskopik incelemede DİP grubunda daha şiddetli olmak üzere iki deneme grubunda da karında şişkinlik, deride hiperpigmentasyon, yüzgeç diplerinde ve solungaçlarda kanama, böbreklerde şişkinlik ve bağırsak lümeninde sarı-turuncu renkte müköz içerik görüldü. Histopatolojik incelemede, akut dönemde solungaçlarda kanama ve telangiyoektazi, böbreklerde melanomakrofaj merkezlerde artışlar görüldü. Kronik formda, böbreklerde yaygın dejenerasyon ve nekroz, üç olguda (DİP) ise epikarditis görüldü. Sindirim sisteminin submukozasında sayıca artmış ve degranülize olmuş eozinofilik granüler hücreler (EGS) dikkat çekti. Mide bez epitellerinde dejenerasyon, bağırsak mukoza epitellerinde dökülme mevcuttu.

Öneri: Erişkin gökkuşuğu alabalıklarında *V. salmoninarum* enfeksiyonlarına yaklaşımda; doğal enfeksiyonda bilinen bulgular ile deneysel enfeksiyonda şekillenen bulgular arasındaki farklılıkların göz önüne alınması gerektiği önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: Deneysel enfeksiyon, gökkuşuğu alabalığı, patolojik bulgular, PCR, *Vagococcus salmoninarum*.

Abstract

Aim: The aim of this study was to induce *Vagococcus salmoninarum* (*V. salmoninarum*) experimental infection in adult fish through different routes [intra-peritoneal (IP) and immersion (IM)] to investigate clinical, macroscopical and histopathological findings.

Materials and Methods: Totally 4 groups (experiment immersion-EIM, experiment peritoneal-EIP and 2 controls) were used. As material, overall 60 rainbow trout were used. Fishes were infected with *Vagococcus salmoninarum* (accession number: KJ685901) strain. For histopathological examinations, all tissue samples were fixed and than fixation samples routinely were processed. Tissue sections stained with haematoxylin-eosin and examined using light microscope. DNA extractions of the isolate were made for the molecular analysis of the bacteria and then, specific primers were used to identify *V. salmoninarum*. The PCR product from isolate *V. salmoninarum* was used for sequencing.

Results: In both groups, mortality rate was 100%. In macroscopic examination, abdominal swelling, depigmentation of the skin, hemorrhages at the base of the fins, swelling in kidneys and a thick and yellow-orange fluid in the intestine were seen. These findings were observed in both groups, but were more severe in EIP group than in EIM group. In histopathologic examination, the course of the disease ranged from acute form to chronic form in both groups. In acute form, haemorrhage and telangiectasia in the gills and increase in melanomacrophage centers were detected. In chronic form, degeneration and necrosis in the kidney and epicarditis in three cases (EIP) were observed. Elevated numbers and degranulation of eosinophilic granular cells (EGC) in the submucosa of the digestive system were also observed. Degeneration was seen in gastric epithelium and shedding of intestinal mucosa epithelium.

Conclusion: In this study, approaches of *V. salmoninarum* infection in adult rainbow trout, the differences between the findings in experimental infection and natural infection is recommended to be taken into account.

Keywords: Experimental infection, pathological findings, rainbow trout, PCR, *Vagococcus salmoninarum*



Giriş

Soğuk su streptokokkozisi olarak da adlandırılan Vagokokozis, salmonid balıklarda gram(+) bakteri olan *Vagococcus salmoninarum* (*V. salmoninarum*)'un neden olduğu önemli ekonomik kayıplar ile seyreden bir enfeksiyondur (Schmidtke ve Carson 1994, Michel ve ark 1997, Austin 1999, Ghittino ve ark 2003, Baeck ve ark 2006). *V. salmoninarum*'un neden olduğu kokal enfeksiyonlar 12°C ve altındaki su sıcaklıklarında ortaya çıkmaktadır ve ılık su enfeksiyonları kadar yaygın değildir (Ghittino ve ark 2003, Roberts 2012). Avrupa'da *V. salmoninarum*'un 50-200 g ağırlığındaki balıklarda %20-50 oranında mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir (Ghittino ve ark 1999). Hastalık düşük su sıcaklığında ortaya çıktığı için özellikle anaç balıklarda önemli problemlere yol açmaktadır (Vendrell ve ark 2006). Türkiye'deki ilk izolasyon Eğirdir'de anaç gökkuşuğu alabalıklarında bildirilmiştir (Didinen ve ark 2011, Tanrıkul ve ark 2014). *V. salmoninarum* ile enfekte balıklarda durgunluk, anoreksi ve ekzoftalmus gözlenen klinik bulgular olarak tanımlanmıştır (Schmidtke ve Carson 1994, Ghittino ve ark 1999). Nekropside, deride ve ağız etrafında hemorajiler, deride eroziv lezyonlar, anüste prolapsus, visceral hemoraji, karaciğer, dalak ve böbreklerde büyüme ve kalpte fibrinöz epikarditis bildirilmiştir (Michel ve ark 1997). Bu bulgulara ek olarak, karın boşluğunda kanlı olabilen asites, midede kanama ve sıvı içerik birikimi, bağırsak lümenlerinde mukoid yapıda, sarımsak-turuncu renkli ya da kanlı eksudat görülebilmektedir (Didinen ve ark 2011). Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan alabalıklarda, hastalığın yeni ortaya çıktığı gözlemlenmekte ve enfeksiyonun yayılma eğiliminde olduğundan endişe edilmektedir (DPT 2007).

Türkiye'de ilk kez yapılan bu deneysel çalışma ile *V. salmoninarum* enfeksiyonunun erişkin balıklarda, farklı yollarla (intraperitoneal ve immersiyon) oluşturularak, hastalığın patolojik bulgularının kapsamlı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bakteri

Çalışmada, doğal enfeksiyondan izole edilen *V. salmoninarum* (accession number: KJ685901) izolatu kullanıldı. Etke-

nin izolasyonu hastalıktan ölen balıkların böbrek, dalak ve karaciğerinden %5 koyun kanı ilave edilmiş TSA'ya (Merck) aseptik olarak ekim yapılarak besi yerleri 12°C ve 21°C'de 48 saat inkube edildi. 48 saat sonra üreyen etkenler aynı besi yeri ve şartlarda pasaje edilerek saflaştırıldıktan sonra biyokimyasal ve morfolojik özellikleri incelendi. Bakterinin identifikasyonunda API 20STREP ve API 50CH (BioMerieux S.A. France) test kitleri kullanıldı (Kusuda ve Salati 1993, Michel ve ark 1997).

DNA ekstraksiyonu, PCR ve sekans analizi

Etkenden DNA izolasyonu hazır DNA ekstraksiyon kiti (High pure, Almanya; Lot: 11054300) kullanılarak kitin talimatına uygun olarak yapıldı. Moleküler identifikasyon pSal-1 (5'-GTTTGTAGCCGCATGGCTGAGATAT-3') ve pSal-2 kullanılarak PCR yöntemiyle gerçekleştirildi (Wallbanks ve ark 1990). PCR'da master mix toplam 25 µL hacminde olacak şekilde; nükleaz free su, 1xPCR Buffer (MBI Fermentas), 1.5 mM MgCl₂, her birinden 0.2 mM dNTP, 1.0 U Taq polimerase (MBI Fermentas), her birinden 100 pmol primer ve 5 µL template DNA kullanıldı. Çalışmada kullanılan termal cyclus döngüsü: 94°C'de 3 dakika ön denaturasyonun ardından toplam 35 siklus olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denaturasyon, 55°C'de 1 dakika primer bağlanması, 72°C'de 1 dakika uzama ve 72°C'de 10 dakika final uzama şeklindeydi (Techne, TC-412). Çalışmada *V. salmoninarum* NCIMB 13133 pozitif kontrol, distile su ise negative kontrol olarak kullanıldı. Bütün PCR ürünleri ve 100 bp'lik DNA ladder, 2 µg etidyum bromid ile birlikte %1.5'lük agaroz jelin kuyucuklarına yüklenerek elektroforez (Thermo, Primo™) edildi. Bantlar, görüntüleme cihazı (Vilber Lourmant, E-BOX VX5) ile görüntülendi. PCR ile identifiye edilen *V. salmoninarum* PCR ürünü, primer çiftleri ile birlikte sekans analizine gönderildi (Macrogen, Hollanda). Sekans sonuçları, Mega 5.2 programında değerlendirilerek GenBank'a girildi ve accession numarası alındı.

Kullanılan balıklar ve deneysel uygulama

Deneysel aşamada kullanılan balıklar, Aydın ili Bozdoğan ilçesindeki bir alabalık işletmesinden temin edildi. Erişkin (200±20 g) 60 adet gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792*) kullanıldı. Üç haftalık süre ile herhangi bir uygulama yapılmaksızın, optimum koşullarda bakılan balık-

Tablo 1. Grupların sınıflandırılması ve bakteri inokülümü uygulama yolları ve miktarları.

Grup	Grup				Balık
Sayısı	Adı	Uygulama Adı	Bakteri Uygulama Miktarı	Balık Büyüklüğü ve Ağırlığı	Sayısı (n)
Grup I	DİP	Deneme İntraperitoneal	10 ⁶ cfu/mL (0.1 mL)	200 ± 20 g (erişkin)	20
Grup II	KİP	Kontrol İntraperitoneal	Serum fizyolojik (0.1 mL)	200 ± 20 g (erişkin)	10
Grup III	DİM	Deneme İmmersiyon	10 ⁶ cfu/mL (50 mL)	200 ± 20 g (erişkin)	20
Grup IV	KİM	Kontrol İmmersiyon	Serum fizyolojik (0.1 mL)	200 ± 20 g (erişkin)	10





ların adaptasyonu sağlandı. İki deneme ve iki kontrol grubu olmak üzere toplam dört grup halinde yürütülen çalışmada her biri 260 l kapasiteli dört adet havuz kullanıldı. Gruplandırma ve bakterinin verilmiş yolları Tablo 1'de sunuldu.

İntraperitoneal uygulamaya başlamadan önce, balıkların %0.25'lik fenoksiethanol solüsyonu ile anestezileri gerçekleştirildi. (Avcı ve Birincioğlu 2005, Roberts 2012). İntraperitoneal yol ile yapılan uygulamada, DİP grubundaki balıklara 10^6 cfu/mL bakteri içeren inokulattan 0.1 mL intraperitoneal, KİP grubu balıklara ise 0.1 mL serum fizyolojik, intraperitoneal olarak verildi.

İmmersiyon uygulamada, 10^6 cfu/mL bakteri içeren 50 ml miktarındaki inokulat 30 L su içerisine eklendi ve. DİM grubunda bulunan balıklar bu inokulatl su içerisinde 15 dk bekletildikten sonra ilgili havuzlara alındı. Kontrol grubundaki balıklar, normal su içerisinde bekletilerek kontrol havuzlarına alındı. Denemenin ilk günlerinde 13-14°C'de tutulan su sıcaklığı sonradan 11°C'ye düşürüldü ve sıcaklığın 11-12°C'de stabilizasyonu sağlandı. Çalışma süresi boyunca (60 gün)

balıkların tamamı, üç nolu balık yemi ile ağırlıklarının %2'si oranında beslenmeleri sağlandı.

Patolojik inceleme

Makroskobik inceleme: İnokülasyonun başlangıcından itibaren balıkların hareketleri gün boyu izlenerek kaydedildi. Ölenler ile ötanazi edilen kontrol grubu balıklara nekropsi yapıldı ve tüm dokuları %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda tespit edildi. Reizolasyon ve identifikasyon için taze organ örnekleri steril kaplara alınarak soğuk zincirde ilgili mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi. Histopatolojik inceleme: Doku örnekleri, doku takip cihazında (Leica TP1020) otomatik olarak, alkol, ksilol ve parafin serilerinden geçirildikten sonra parafinde bloklandı. Bu bloklardan mikrotomda 5-6 µm kalınlığında alınan doku kesitlerinin tamamı hematoksilin-eozin (HE) ile, gerekli görülenler ise bakteri için Brown-Brenn, yağ için Modifiye McManus's Sudan Black B boyama tekniklerine göre boyanarak (Culling 1985) ışık mikroskopunda incelendi.

Tablo 2. Makroskobik bulgular ve gruplara göre dağılımı.

Makroskobik bulgular	DİP (n/20)	KİP (n/10)	DİM (n/20)	KİM (n/10)
Hiperpigmentasyon	14	3	12	1
Depigmentasyon	4	2	3	2
Ekzoftalmus	4	0	1	0
Yüzgeçte kanama	9	1	6	0
Solungaçta kanama	8	1	6	0
Solungaçta anemi	6	1	7	0
Abdominal şişkinlik	14	2	10	3
Asites	6	0	4	0
Hava kesesinde dilatasyon	12	2	10	3
Hava kesesi duvarında matlaşma	6	0	2	0
Midede dilatasyon ve mukus artışı	12	0	6	0
Peritonda kalınlaşma	9	0	5	0
Bağırsaklarda sarı-turuncu eksudat	12	0	8	0
Bağırsaklarda dilatasyon, hiperemi	13	1	12	1
Hidroperikardium	3	0	7	0
Perikarditis	3	0	2	0
Dalakta büyüme	5	0	3	0
Karaciğerde büyüme	6	1	5	0
Karaciğerde kanama	6	0	6	1
Safra kesesinde dolgunluk	10	1	7	0
Böbreklerde şişkinlik	12	0	12	0
Beyinde hiperemi	8	1	6	0

DİP: Deneme intraperitoneal, KİP: Kontrol intraperitoneal, DİM: Deneme immersiyon, KİM: Kontrol immersiyon

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 04.10.2012 tarih ve B.30.2.A DÜ.0.00.00.00/050.04/2012/087 no'lu kararı ile onaylanmıştır.

Bulgular

Her iki deneme grubunda mortalite oranı %100 olarak belirlendi. Ölümler DİP grubunda 12.-45. günler arasında, DİM grubunda ise 12.-60. günler arasında gerçekleşti. Deneme süresince KİP ve KİM gruplarında ölüm görülmedi.

Klinik bulgular

Düzensiz yüzme hareketleri (dönme, spiral-, dik-, ters yüzme) ve iştahsızlık her iki deneme grubunda da gözlenen ortak klinik bulgulardı. Dik yüzmeler sıklıkla izlendi. Ani dalışlar ve sıçramalar gözlemlendi. Deneme grubundaki balıklarda, ölmeden önce 3-6 gün süre ile su yüzeyine yakın seviyede gerçekleşen ters yüzme hareketleri dikkati çekti.

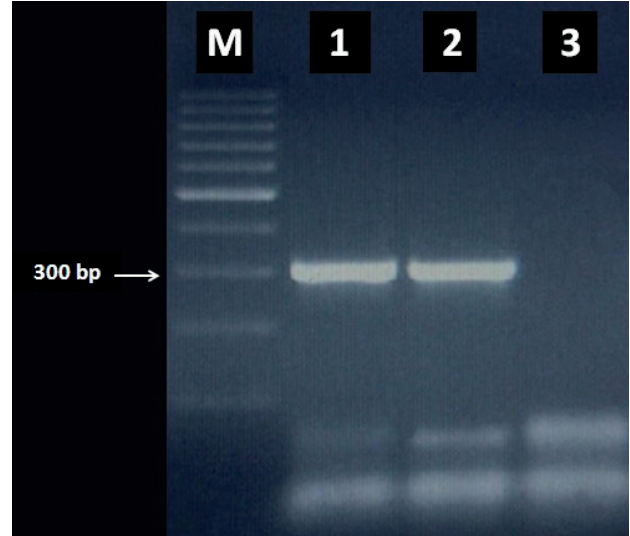
Patolojik bulgular

a. Makroskobik bulgular: Makroskobik bulgular ile balık sayıları arasındaki ilişki Tablo 2'de sunuldu.

Özellikle erken dönem ölen balıklarda yüzgeç diplerinde ve anüste kanamalara rastlandı. Solungaçtaki kanamalar dip kısımlarda peteşiler şeklindeydi (Resim 1A). Ekzoftalmus DİP grubunda dört olguda (2 unilateral, 2 bilateral), DİM grubunda bir olguda (bilateral) görüldü DİP ve DİM gruplarında deri renginde diffuz melanin artışı mevcuttu. Özellikle DİP grubunda daha şiddetli olmak üzere karın boşluğunda kanla karışık eksudat görüldü. Pilorik keseler ve bağırsaktaki içerik ise şeffaf, serömüköz ve sarı-turuncu renkteydi (Resim 1B). Bağırsaklarda dilatasyon, serozalarında hiperemi mevcuttu. DİP grubunda üç, DİM grubunda iki olguda hidroperikardiyum ile birlikte perikarditis saptandı.

Böbreklerde şişkinlik ve yumuşak kıvam oldukça belirgindi. Karaciğerlerde hafif büyüme, kanama ve hiperemi dışında belirgin bir makroskobik bulguya rastlanmadı. Dalakta şişkinlik ile birlikte yumuşak kıvam belirlendi (8 olgu; 5 olgu DİP, 3 olgu DİM).

b. Histopatolojik bulgular: Histopatolojik bulgular DİP ve DİM gruplarında benzer özellikte bulundu. Lezyonların görüldüğü balık sayıları ile lezyonların şiddeti gruplar arasında farklılıklar gösterdi. Solungaçlar dışındaki organların çoğunluğunda DİP grubundaki lezyonlar DİM grubuna göre daha yaygın ve şiddetliydi. Bulgular ile balık sayıları arasındaki ilişki Tablo 3'te sunuldu. Akut dönem ölümlerinde; solungaçlarda ödem, kanama ve telangioektaziler görüldü (Resim 1C). İnterlamellar epitellerde hiperplazi hafif ya da orta şiddetliydi. Enfeksiyonun ilk bir aylık dönemde böbreklerde me-

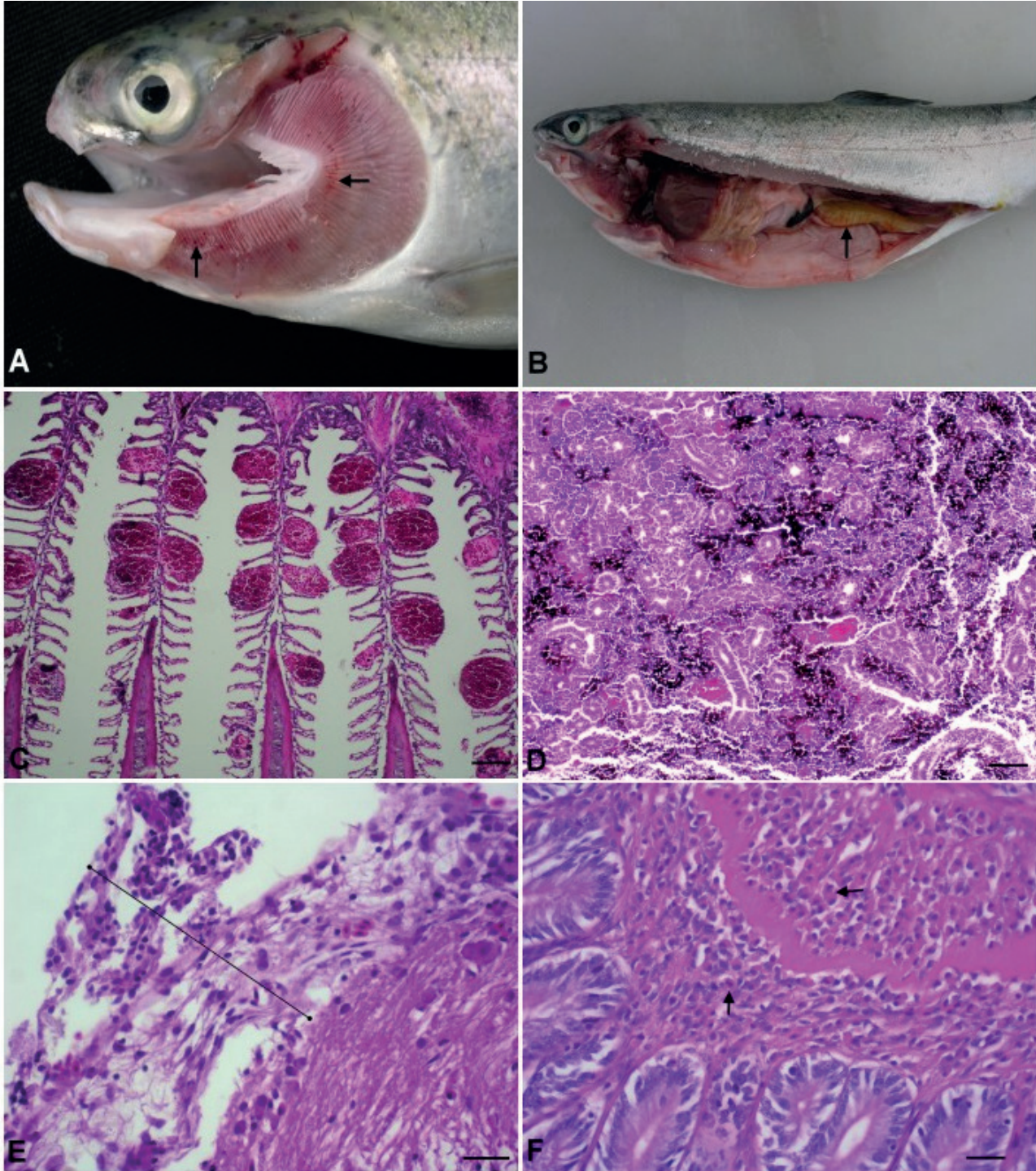


Resim 2. *V. salmoninarum* spesifik PCR, 300 bp. M; 100-1000 bp DNA ladder, 1: Pozitif kontrol, *V. salmoninarum* NCIMB 13133, 2: *V. salmoninarum* saha izolatu, 3: Negatif kontrol, distile su.

lanomakrofaj merkezlerde belirgin artış vardı (Resim 1D). Sonraki dönemlerde bu merkezlerde azalma, tubuluslarda dejenerasyon ve nekrozlar görüldü. Üç olguda (DİP) epikarditis belirlendi (Resim 1E). Epikarddaki fibrin ve yangısal hücre infiltrasyonu sonucu oluşan kalınlaşmalar arasında bakteri kümeleri de seçilebildi. Bakterilerin varlığı Brown-Brenn boyama ile teyit edildi. Toplam 12 balıkta endokardial makrofajlarda aktivasyon görüldü. Sindirim sisteminin submukozasında sayıca çok artmış ve bazıları degranülize olmuş eozinofilik granüler hücreler (EGS) dikkati çekti (Resim 1F). Bu hücreler mide duvarında belirgin kalınlaşmalara neden olmuştu. Midede goblet hücrelerinde ve mukusta artış, bez epitellerinde yaygın dejenerasyon görüldü. Pilorik kese ve bağırsaklarda benzer bulgular belirlendi. Villuslarda önemli bir değişiklik göze çarpmadı. Özellikle dört olguda belirgin olmak üzere, meninkslerde yangısal hücre infiltrasyonları ile birlikte bakteri kümeleri dikkati çekti. Toplam 12 olguda (7 DİP, 5 DİM) peritonda fibrin ve yangısal hücre infiltrasyonlarından oluşan kalınlaşmalar mevcuttu. Karaciğerde subkapsuler kanamalar (13 olgu; 7 olgu DİP, 6 olgu DİM) ve hepatositlerde yağ dejenerasyonu (18 olgu; 11 olgu DİP, 7 olgu DİM) görülmekle birlikte, dalakta melanomakrofajlarda artış (8 olgu; 4 olgu DİP, 4 olgu DİM) ve şiddetli diffuz konjesyon (8 olgu; 5 olgu DİP, 3 olgu DİM) mevcuttu. Motor nöronlar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında büzüşmüş ve hiperkromatik görünümde olmakla birlikte, bazı nöronlarda intranöronal vakuoller (7 olgu; 5 olgu DİP, 2 olgu DİM) dikkati çekti.

Bakteriyolojik bulgular, PCR ve sekans analizleri

Ölen balıklardan reizole edilen bakteriler *V. salmoninarum* açısından morfolojik olarak incelenerek, API50CH ve API 20STREP (BioMerieux S.A. France) test kitleri kullanılarak biyokimyasal yöntemlerle tanımlanıldı. Çalışmada kullanılan *V. salmoninarum* izolatının PCR analizine ilişkin jel



Resim 1: A. Solungaç kemerine yakın alanlarda peteşiyel kanamalar (oklar). B. Bağırsakta şişkinlik, serozadan seçilebilen sarı turuncu renkte içerik (ok). C. Solungaç sekonder lamellerinde telangioektazi. H.E. Bar: 100 µm. D. Böbrekte melanomakrofajlarda artış. H.E. Bar: 100 µm. E. Epikarditis. Epikardda yangısal hücre infiltrasyonu ve fibrinli kalınlaşma (sonlu çizgi). H.E. Bar: 30 µm. F. Mide submukozasında yoğun eozinofil granüler hücre artışı (oklar). H.E. Bar: 50 µm.

elektroforez görüntüsü elde edildi (Şekil 2). Etkene ait PCR ürünlerinden sekans analizi yapılarak sonuçlar GenBank'a KJ685901 accession numarası ile yüklendi.

Tartışma

Yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında kronik ola-

rak seyreden, özellikle soğuk sularda enfeksiyonlara neden olan *Streptococcus* türlerinden dünyada en yaygın olanı *V. salmoninarum*'dur (Carson ve Munday 1990, Schmidtke ve Carson 1994, Michel ve ark 1997, Ghittino ve ark 2003). Hastalık gökkuşağı alabalıklarında Avustralya, Fransa, İtalya ve İspanya ve Türkiye'de bildirilmiştir (Schmidtke ve Carson, 1994, Michel ve ark 1997, Ghittino ve ark 2004, Ruiz-



Tablo 3. Mikroskopik bulgular ve gruplara göre dağılımı.

Mikroskopik bulgular	DİP (n/20)	KİP (n/10)	DİM (n/20)	KİM (n/10)
Deri				
pigment artışı	10	2	8	1
mukus hücrelerinde artış	8	3	5	2
epidermiste dökülme	7	0	7	0
Solungaç				
kanama	7	1	5	0
ödem	12	2	9	2
hiperplazi	12	2	9	1
telengioektazi	6	0	8	0
Hava kesesi				
ödem	9	0	6	0
kanama	6	1	3	0
yangısal hücre infiltrasyonu	3	0	1	0
Mide - Bağırsaklar				
goblet hücrelerinde artış	15	2	10	2
bez epitellerinde dejenerasyon	9	0	7	0
EGH proliferasyonu	12	0	14	0
Periton				
peritonitis	7	0	5	0
Kalp				
epikarditis	3	0	2	0
endokarditis	8	0	4	0
bakteri kümeleri	3	0	1	0
perikarditis	3	0	2	0
Beyin				
hiperemi	10	3	6	1
meningitis	4	0	0	0
bakteri kümeleri	3	0	0	0
nöronlarda dejenerasyon/nekroz	5	0	2	0
Böbrekte				
melanomakrofajlarda artış	13	0	8	0
tubulus epitel dejenerasyonu	13	1	10	2
tubulus epitel nekrozu	10	0	9	0
Dalak				
melanomakrofajlarda artış	4	0	4	0
şiddetli konjesyon	5	0	3	0
Karaciğer				
kanama	7	0	6	1
yağlanma	11	2	7	1

DİP: Deneme intraperitoneal, KİP: Kontrol intraperitoneal, DİM: Deneme immersiyon, KİM: Kontrol immersiyon





Zarzuela ve ark 2005, Didinen ve ark 2011). Ruiz-Zarzuela ve ark (2005) Avrupa ülkelerindeki alabalık kuluçkahanelerinde (10-12°C su sıcaklıklarında) anaç balıklarda mortalite oranının yıllık ortalama %50 oranında olduğunu belirtmiştir. Gökkuşluğu alabalıklarında *L. garvieae* sıcak suda enfeksiyonlara neden olurken, *V. salmoninarum* soğuk sularda özellikle yetişkin damızlık balıklarda kronik seyreden enfeksiyonlara neden olmaktadır (Michel ve ark 1997). Türkiye’de de 2010 yılından itibaren 10-12°C su sıcaklığındaki alabalık kuluçkahanelerinde anaç balıklarda düşük mortaliteyle seyreden *Streptococcus* enfeksiyonları görülmeye başlamıştır (Diler ve ark 2002, Tanrıku ve ark 2014). 2011 yılında Akdeniz Bölgesi’ndeki bir işletmede *V. salmoninarum*’dan kaynaklandığı belirtilen enfeksiyonda %55 mortalite tesbit edildiği bildirilmiştir (Didinen ve ark 2011). Son 5 yılda birçok vakayla karşılaşmış ve özellikle anaç balıkların enfeksiyonu sonucunda kuluçkahanelerdeki yumurta kalitesi ve miktarındaki azalma önemli bir problem olarak karşımıza çıkmıştır.

V. salmoninarum, kuluçkahaneler arasında balık nakilleriyle yayılmakta ve su sıcaklığının düşük olması nedeniyle de özellikle alabalık kuluçkahanelerini tehdit etmektedir (Ghittino ve ark 1999). Fransa’nın güneybatısında bir alabalık çiftliğinde 1993 yılında yoğun ölümlerle seyreden salgında gram pozitif bir bakteri kaydedilmiş, daha sonra her yıl tekrar eden bu ölümlerden yeni bir kok grubu *Vagococcus* izole edilmiştir (Schmidtke ve Carson 1994). Soğuk su *Streptococcosis*’i olarak da bilinen *V. salmoninarum* enfeksiyonunun 10-12°C su sıcaklığında özellikle yumurtlama dönemindeki anaç gökkuşluğu alabalıklarında %50’ye varan ölüm oranı ile alabalık yetiştiriciliği yapılan Avrupa Birliği ülkelerinde giderek önem arz eden bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Ruiz-Zarzuela ve ark 2005). Enfeksiyonun anaç balıklarda olduğu gibi özellikle soğuk sularda, 50-200 g ağırlığındaki balıklarda da %20-50 oranında mortaliteyle seyrettiği bildirilmiştir (Ghittino ve ark 1999). Sunulan bu deneysel çalışmada, denemenin ilk günlerinde 13-14°C’de tutulan su sıcaklığı sonradan 11°C’ye düşürülmüş ve her iki deneme grubunda da mortalite %100 olarak belirlenmiştir. Türkiye’de ilk bildirilen doğal vakada ise 12.6°C’de iki ay süre ile %55 oranında yüksek bir mortalite izlenmiştir (Didinen ve ark 2011, Tanrıku ve ark 2014). Güney Ege Bölgesi’nde 2010 yılından itibaren kuluçkahanelerde aynı su sıcaklıklarında ortaya çıkan vakalarda bu oranda ciddi bir kayıpla karşılaşılması (Tanrıku ve ark 2014).

Genellikle *Vagococcus salmoninarum* izole edilen işletmelerde yıllık olarak anaç balıklardaki mortalite oranının %10 olduğu ifade edilmektedir (Tanrıku ve ark 2014). 1999-2001 yılları arasında İspanya’da gökkuşluğu alabalıklarında %11-36 oranında mortalite bildirilmiştir (Ruiz-Zarzuela ve ark 2005). Michel ve ark (1997)’nin 1.8×10^7 cfu/ml dozunda intraperitoneal enjeksiyon ile gerçekleştirdikleri deneysel enfeksiyonda dahi düşük mortaliteler tesbit edilmiştir. Sunulan çalışmada tüm deneme boyunca izlenen; ani sıçramalar, ters,

dik, spiral yüzme ve dönme hareketleri gibi sinirsel semptomlara literatürlerde rastlanmamıştır. Deneme gruplarında görülen bu anormal yüzme hareketlerinin beyin histopatolojik incelemesinde saptanan, nöronlarda dejeneratif ve nekrotik değişiklikler ile birlikte meningitis bulgularının neden olduğu ortaya kondu. Literatürlerde (Ruiz-Zarzuela ve ark 2005, Didinen ve ark 2011) anaç balıklarda bildirilen renkte koyulaşma ve iştahsızlık bu çalışmada da görülürken, derideki erozyon ve furünküllere rastlanmamıştır. Hastalığa ilişkin Michel ve ark (1997)’nin belirttiği gastroenteritis bulguları deneme gruplarındaki lezyonlar ile örtüşmüş, ancak toplam 26 (12 DİP, 14 DİM) balıkta görülen mide ve bağırsakların submukozalarındaki eozinofilik granüler hücre (EGS) proliferasyonlarına dair bir kayıta rastlanmamıştır. EGS’lerin ana fonksiyonel özelliklerinin, memelilerdeki mast hücrelerine oldukça benzer özellikler gösterdiği; kimyasal efektör ajanların ve bazı histamin türevlerinin ortak olduğu ifade edilmiştir (Reite ve Evensen 2006). Balıkların üzerine yapılan çeşitli bakteriyolojik araştırmalarda bu hücrelerin artışına dikkat çekilmiştir (Avcı ve Birincioğlu 2005, Roberts 2012). Böbreklerde, melanomakrofajlardaki artış çalışmanın en dikkat çeken bulguları arasında yer aldı. Balıkların çeşitli enfeksiyöz hastalıklarında yapılan incelemelerde melanomakrofaj merkezlerin arttığı önceki çalışmalarımızda da (Avcı ve Birincioğlu 2005) saptanmış, ancak bu kadar yoğun bir şekilde görülmemiştir. Bu merkezlerin, bağışıklık sisteminin bir yanıtı olarak, bakteriyel ve paraziter antijenleri işleme; dirençli patojenlerin fagositozisi sonucu fosfolipid ve demir depolama gibi fonksiyonları bulunmaktadır. Artan melanomakrofaj merkez aktivitesi, su ortamında kendini gösteren stres koşullarının hassas göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Agius ve Roberts 2003). Çalışmadaki balıklarda, kronik formda böbrek tubuluslarındaki dejenerasyon, nekroz ve hyalin damlalarının varlığı birçok balıkta görülerek önemli bir ölüm nedeni olarak değerlendirilmiştir. Buna karşın, mevcut literatür bilgide bu lezyonlara rastlanmamıştır. Diğer yandan kimi araştırmacılar (Ghittino ve ark 2004, Michel ve ark 1997) tarafından ölüm nedeni olarak işaret edilen perikarditis ve epikarditis bulguları çalışmamızda sınırlı sayıda balıkta (5 olgu) saptandı. Bulgular tümüyle değerlendirildiğinde hem makroskobik hem de mikroskobik olarak ortaya konan bu farklılıkların; çalışmanın deneysel olması ve deneme gruplarında kullanılan balık büyüklüğü ile ilişkili olabileceği kanısına varılmıştır. Sunulan çalışmada, *V. salmoninarum* enfeksiyonu Türkiye’de gökkuşluğu alabalıklarında ilk kez deneysel olarak oluşturulmuş ve saptanan klinik, makroskobik ve mikroskobik bulgular kapsamlı bir şekilde karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Birincioğlu ve ark 2014).

Öneriler

Bu çalışmada, gökkuşluğu alabalıklarında *V. salmoninarum* enfeksiyonu, Türkiye’de ilk kez deneysel oluşturulmuş ve hastalığın klinik-patolojik bulguları incelenmiştir. Enfeksiyona yaklaşımda; doğal enfeksiyonda bilinen bulgular ile deneysel



enfeksiyonda şekillenen bulgular arasındaki farklılıkların gerek sektördeki yetiştiriciler, gerekse veteriner hekimler ve konu üzerinde çalışan araştırmacılar tarafından dikkate alınması önerilmektedir. Bunun yanı sıra, bakteriye ilişkin yapılan sekans analizleri sonucu da çalışmanın moleküler derinliğiyle takip edecek çalışmalara yön vereceği düşünülmüştür.

Teşekkür

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje no: VTF-13007) tarafından desteklenmiştir. Araştırma özeti VII. Ulusal Veteriner Patoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kars, 8-10 Eylül 2014, sunuldu.

Kaynaklar

- Agius C, Roberts RJ, 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis*, 26, 499-509.
- Austin B, 1999. The effect of pollution on fish health. *J App Mic*, 85,234-242.
- Avcı H, Birincioğlu SS, pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) 2005. Experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. *T J Vet Anim Sci*, 29, 1321-1328.
- Baeck GW, Kim JH, Gomez DK, Park SC, 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. *J Vet Anim Sci*, 7, 53-58.
- Carson J, Munday B, 1990. Streptococcosis-an emerging disease in aquaculture. *Aust Aquac*, 5, 32-33.
- Culling AF, Allison TR, Barr TW, 1985. Cellular pathology technique, In: Cellular Pathology Technique, Ed: Culling, Fourth Edition, Mid-County Press, London, UK, pp: 127-151.
- Didinen B, Kubilay A, Diler O, Ekici S, Onuk E, Findik A, 2011. First isolation of *Vagococcus salmoninarum* from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) broodstocks in Turkey. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 31, 235-243.
- Diler O, Altun S, Adiloğlu AK, Kubilay A, Işıklı B, 2002. First occurrence of streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 22, 21-25.
- DPT, Dokuzuncu Kalkınma Planı (2007-2013), Balıkçılık Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Ankara, (2007).
- Ghittino C, Accornero P, Prearo M, Rogato F, Zlotkin A, Eldar A, 1999. Coldwater streptococcoses in salmonids, with particular reference to *Vagococcus salmoninarum* infection. *Proceeding of Works on Fish Streptococcoses*, IZS-State Veterinary Institute, Turin, Italy, pp: 3
- Ghittino C, Latini M, Agnetti F, Panziera C, Lauro L, Ciappelloni R, Petracca G, 2003. Emerging pathologies in aquaculture: Effects on production and food safety. *Vet Res Com*, 27, 471-479.
- Kusuda R, Salati F, 1993. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Ann Rev of Fish Dis*, 3, 9-85.
- Michel C, Nougayrede P, Eldar A, 1997. *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. *Dis Aquat Org*, 30, 199-208.
- Reite OB, Evensen O, 2006. Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immun*, 20, 192-208.
- Ruiz-Zarzuela I, de Bias I, Girones O, Ghittino C, Muazquiz JL, 2005. Isolation of *Vagococcus salmoninarum* in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), broodstocks: Characterization of the pathogen. *Vet Res Commun*, 29, 553-262.
- Roberts RJ, 2012. The Pathophysiology and systematic pathology of teleosts, In: *Fish Pathology*, Eds: Roberts RJ, Rodger HD, fourth edition, Wiley-Blackwell CRP Press, USA, pp: 62-113.
- Schmidtke LM, Carson J, 1994. Characteristics of *Vagococcus salmoninarum* isolated from diseased salmonid fish. *J App Microbiol*, 77, 229-236.
- Tanrıkul T, Avsever ML, Onuk E, Didinen BI, 2014. *Vagococcus salmoninarum*, a causative agent of disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) broodstocks in the Aegean region of Turkey. *Etlik Vet Mikrobiol Derg*, 25, 11-16.
- Wallbanks S, Martinez-Murcia AJ, Fryer JL, Phillips BA, Collins MD, 1990. 16SrRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* nov. *Inter J Syst Bacteriol*, 40, 224-230.
- Vendrell D, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuela I, Blas ID, Girones O, Muzquiz JL, 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infectious Dis*, 29, 177-198

