

Vibrio Anguillarum ile İnfekte Edilmiş Gökkuşaağı Alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss) Hematolojik İncelemeler¹

Mustafa CEYLAN* Soner ALTUN**

Geliş Tarihi: 21.12.2010

Kabul Tarihi: 25.03.2011

Özet: Bu çalışmada *Vibrio anguillarum* ile deneysel yolla infekte edilerek oluşturulan vibriozis infeksiyonunun gökkuşaağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) meydana getirdiği hematolojik değişimler incelenmiştir. Araştırmada 208.7±8.11 gr. ağırlığında 300 adet gökkuşaağı alabalığı kullanılmıştır. Bunlardan 100 adet balığa, mililitrede 10² *Vibrio anguillarum* bakterisi içeren inokulum periton içine 0.2 ml dozunda enjekte edilerek infekte grup oluşturulmuştur. İnfeksiyonun 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13 ve 15. günlerinde 5'er adet (iki tekerrür) olmak üzere infekte ve kontrol (100 adet gökkuşaağı alabalığına 0.2 ml PBS çözeltisi periton içi enjekte edilerek oluşturulmuş) grubu balıkların kuyruk venasından enjektörle alınan kan örnekleri eritrosit, trombosit ve lökosit sayımları, lökosit tipleri, hemoglobün, hematokrit, eritrosit indeksleri (MCV, MCH, MCHC), total plazma proteini, albümin miktarları ve kortizol seviyeleri yönünden incelenmiştir.

İnceleme neticesinde infekte grup balıklarda eritrosit, hemoglobün, hematokrit, albümin ve toplam plazma proteini değerlerinde (11.günden sonra) istatistiki olarak azalma görülürken, kortizol seviyesi ve trombosit sayısında ise istatistiksel olarak artış tespit edilmiştir. İnfekte balıklarda, toplam lökosit sayıları hastalığın seyrine bağlı olarak 10.güne kadar artış gösterirken 11.günden sonra azalma göstermiş ve lökosit yüzde değerlerinde farklılıklar (nötrofil ve monosit hücrelerinde artış lenfosit hücrelerinde ise azalma) olduğu görülmüştür. Eritrosit, hematokrit, hemoglobün, eritrosit indeks (MCV, MCH, MCHC) değerleri ile total plazma proteini ve albumin miktarlarına yönelik hematolojik sonuçların değerlendirilmesinde ise infekte balıklarda mikrositer normokrom anemi ve hipoproteinemi şekillendiği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hematoloji, gökkuşaağı alabalığı, *Vibrio anguillarum*, vibriozis.

Haematological Parameters of Rainbow Trouts (*Oncorhynchus Mykiss*) Experimentally Infected with *Vibrio Anguillarum*

Abstract: Haematological parameters of rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) infected experimentally with *Vibrio anguillarum* were investigated. A total of 200 rainbow trouts weighing 208.7±8.11 gr were used in the experiment. A total of 100 fishes were infected by intraperitoneal injection of 0.2 mL bacterial suspension containing 10² bacteria/ml of *Vibrio anguillarum*. Blood samples of five fishes from each of infected and control groups were collected from caudal vein on 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13 and 15th day of injection and examined in terms of erythrocyte, platelet and leukocyte counts, leukocyte types, haemoglobin, haematocrit, erythrocyte indices (mean cell volume (MCV), mean cell haemoglobin (MCH), mean cell haemoglobin concentrations (MCHC), total plasma protein, albumin, and cortisol levels.

It has been found that erythrocytes, leukocytes, haemoglobin, haematocrit, albumin and total plasma protein levels were decreased whereas cortisol levels and platelet counts were increased in the infected groups. Total leucocytes counts displayed an increase until 10 th day of injection while they decreased after that time. As well,

* TKB Eğirdir Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Eğirdir-Isparta.

** Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Görükle-BURSA, saltun@uludag.edu.tr

¹ Bu çalışma Mustafa CEYLAN'ın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

percentage distribution of leucocytes cells exhibited changes over the time (increase in neutrophile and monocyte counts and decrease in lymphocyte). Evaluation of erythrocyte, haematocrit, haemoglobin, erythrocyte indices (mean cell volume (MCV) together with total plasma protein and albumin levels revealed the presence of microcyter normochrome anemia and hypoproteinemia in infected fishes.

Key Words: Haematology, rainbow trout, *Vibrio anguillarum*, experimental infection.

Giriş

Vibrionaceae familyasında yer alan *Vibrio (Listonella) anguillarum*, gram negatif, virgül şeklinde, halofilik özellik gösteren bir bakteri olup, doğal ve kültürü yapılan deniz, tatlı su balıklarıyla diğer akuatik hayvanlarda septisemiye neden olan vibriozis hastalığının etkenidir. Vibriozis, hemen hemen tüm dünyada kültür balıkçılığı yapan işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olan bulaşıcı bir hastalık olup pasifik ve atlantik salmonları, gökkuşağı alabalıkları, kalkan, levrek, çipura, çizgili levrek, kod, japon, avrupa yılan balığı ve ayu balığı da dahil olmak üzere hem ılık su hem de soğuk su balık türlerini etkilemektedir^{1,2}. Ülkemizde kültür balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerde özellikle levrek ve son zamanlarda gökkuşağı alabalığı işletmelerinde ciddi ekonomik kayıplara yol açmaktadır³⁻⁵. Vibriozis, gram negatif septisemiyle seyreden bakteriyel hastalıklara (yersiniozis, furunkulozis, ve bakteriyel hemorajik septisemi) benzer semptomlar meydana getirmektedir⁶⁻⁸. Ancak klinik vakalarda balığın ventral ve lateral bölgelerinde kanama ve ülser ile deride melanin pigmentasyonuna bağlı olarak koyulaşma hastalığın karakteristik bulgularıdır^{9,10}.

Balıklarda hematolojik parametrelerin değişiminde hastalıkların yanısıra balık türü, mevsim, sıcaklık, üreme dönemi, beslenme durumu, balık büyüklüğü (ağırlığı ve yaşı), suyun tuzluluğu, toksik maddeler, ağır metal kirliliği, sanayi atıkları ve stres gibi birçok faktör etkili olmaktadır^{8,11,12}. Çevresel ve biyolojik etkilerin etkisi altında olan hayvansal organizmalarda, meydana gelen fizyolojik, biyokimyasal değişikliklerin doğrudan hematopoietik sistemle bağlantılı olduğu bilinmektedir¹³. Hematolojik incelemeler ile değişik yaş gruplarındaki ve değişik yaşam koşullarındaki balıkların, genel metabolizmaları ile fizyolojik durumları incelemek sağlık durumları değerlendirilebilmektedir^{8,14}. Ayrıca balık hematolojisi üzerinde çalışan bazı araştırmacılar, kan parametrelerinin hastalıkların teşhisinde yardımcı olduğunu bildirmektedirler^{8,15}.

V. anguillarum etken olduğu vibriozis hastalığının gökkuşağı alabalıklarında kan pa-

rametrelerine etkilerinin ilk defa incelendiği bu araştırmada; deneysel olarak *V. anguillarum* ile infekte edilerek hastalık oluşturulan balıklarda kan parametrelerinde meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma, ağırlığı 208.7 ± 8.11 g olan gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *V. anguillarum*'un meydana getirdiği bazı hematolojik değişiklikleri araştırmak amacıyla 300 adet balık üzerinde yürütülmüştür. Araştırmada, Eğirdir Su ürünleri Fakültesi mikrobiyoloji laboratuvarında gökkuşağı alabalıklarından izole edilen bir *V. anguillarum* suşu kullanılmıştır. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi alabalık üretim tesisinden temin edilen balıklar, Eğirdir Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ait balık hastalıkları ünitesindeki 1 m^3 hacimli içerisinde 900 litre su bulunan 6 adet yuvarlak fiber tanka konularak, 10 gün içerisinde ortama tamamen adapte edilmiştir. Araştırmada kullanılacak balık grupları içerisinden rastgele seçilen 20 balıkta bakteriyolojik ve parazitolojik açıdan incelenmeler (klasik bakteriyel ve paraziter yöntemlerle) yapılmış ve balıkların bakteriyel ve paraziter infeksiyon taşımadıkları görülmüştür. Araştırma süresince tanklarda su sıcaklığı $13.04 \pm 0.22^\circ\text{C}$, pH 7.51 ve suda çözülmüş oksijen miktarı 5.72 ± 0.46 mg/l olarak ölçülmüştür. Araştırmada kullanılan balıklar bir ticari yem firmasına ait alabalık pelet (No: 4) yemiyle günde iki kez yemlenmiştir. Deneysel infeksiyon oluşturmak için uygun infektif doz (LD_{50}) olarak belirlediğimiz $2,3 \times 10^2$ *V. anguillarum* cfu/ml'lik inokulum iki tankta 50'erli gruplar halinde bulunan toplam 100 adet balığa 0.2 ml miktarda periton içi olarak enjekte edilmiştir. Kontrol grubu oluşturmak için de, her bir balığa 0.2 ml miktarda fosfat tampon solusyonu (PBS Ph 7.2) periton içi enjekte edilerek her birinde 50'er adet balık bulunacak şekilde iki tanka yerleştirilmiştir.

Enjeksiyondan sonra 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13 ve 15.günlerde kontrol ve infekte grup balıklardan rastgele 5'er örnek alınarak hematolojik incelemeler yapılmıştır. *V. anguillarum* inokulumunun enjeksiyonu ve kuyruk venasından kan

alınması sırasında balıklar, 1/20.000 konsant-rasyonda quinaldine ile anestezi edilmiştir¹⁶. Anestezi sonrası ıslak bir havlu ile tespit edilen balıkların kaudal (kuyruk) venasından kanülle girilerek içerisinde EDTA (2.5 mg/ml) bulunan steril tüplere 2 - 2.5ml kadar kan alınmıştır⁸. Kan alma işlemi en geç 45 sn de tamamlanmıştır. Alınan kan örnekleri en kısa zamanda (1 saat) laboratuara getirilerek çalışmaya başlanmıştır.

Eritrosit, total lökosit ve trombosit sayımı aynı anda, kan örneğinin Natt-Herick eriyiği ile

eritrosit sulandırma pipeti aracılığıyla 100 kat sulandırılarak Thoma lamında yapılmıştır^{16,11,26,18}. Hematokrit değeri (%), mikrohematokrit yöntemiyle¹⁷, hemoglobin miktarı (g/100ml), asithematin yöntemiyle sahli hemoglobinometresinde belirlenmiştir¹⁹. May Grünwald-Giemsa karışık boyama yöntemi ile boyanan kan frotilerinden, akyuvar tiplerinin yüzde olarak oranları belirlenmiştir²⁰. Wintrobe eritrosit indeksi değerleri; ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) ve ortalama eritrosit hemoglobini yo-

Tablo 1. Kontrol ve infekte grup balıklarda eritrosit, hematokrit, hemoglobin, mcv, mch, mchc, t.plazma proteini, plazma albümin ve plazma kortizol değerlerinin karşılaştırılması.

Table 1. Comparison of erythrocyte, haematocrit, haemoglobin, MCV, MCH, MCHC, total plasma protein, plasma albumin and plasma cortisol levels in control and infected fish.

Gün		1	2	3	4	5	7	9	11	13	15
Eritrosit 10 ⁹ /mm ³	Kontrol Grup	0,91±0,02	0,92±0,02	0,89±0,01	0,90±0,01	0,84±0,02	0,91±0,04	0,92±0,01	0,92±0,01	1,04±0,07	0,94±0,05
	İnfekte Grup	0,87±0,02	0,82±0,02*	0,78±0,02*	0,72±0,04*	0,66±0,07*	0,60±0,03*	0,62±0,06*	0,56±0,03*	0,52±0,01*	0,48±0,02*
Hematokrit (%)	Kontrol Grup	50,6±0,40	50,4±1,53	47,2±0,86	46,2±1,24	47,9±2,01	46,3±1,29	49,4±0,67	46,4±2,40	51,4±1,32	47,6±2,11
	İnfekte Grup	46,0±1,26*	43,2±0,86*	38,2±0,37*	35,6±0,39*	30,4±3,09*	27±2,94*	26,6±3,07*	25,8±1,52*	25,4±2,52*	27,4±0,50*
Hemoglobin gr/100ml	Kontrol Grup	8,2±0,35	7,92±0,52	7,8±0,15	7,7±0,15	7,96±0,33	7,32±0,30	7,8±0,31	7,48±0,31	8,12±0,12	8,06±0,40
	İnfekte Grup	7,2±0,26	7,36±0,04	7,0±0,34	6,4±0,18*	6,42±0,14*	5,98±0,13*	5,76±0,16*	4,74±0,11*	4,64±0,06*	4,42±0,08*
MCV (µ3)	Kontrol Grup	554,53±19,3	548,43±15,3	528,88±16,3	512,38±13,3	573,48±19,4	515,00±18,6	534,92±9,14	503,20±24,4	498,68±32,7	512,22±35,5
	İnfekte Grup	527,95±20	525,95±16	487,26±12	503,56±11	486,86±22*	443,44±16*	441,55±18*	463,82±28	486,92±51	572,92±29
MCH (µg)	Kontrol Grup	89,9±5,24	86,1±5,24	87,4±2,92	85,5±2,72	95,2±5,37	81,6±7,18	84,4±3,58	81,2±3,97	78,5±4,01	87,1±7,43
	İnfekte Grup	82,5±3,41	89,6±2,79	88,9±3,02	90,4±7,69	104,±16,2	99,6±6,04	97,4±12,5	84,8±6,17	88,6±1,14*	92,4±5,01
MCHC (%)	Kontrol Grup	16,1±0,66	15,8±1,24	16,5±0,22	16,7±0,59	16,7±0,96	15,7±0,30	15,7±0,57	16,2±0,68	15,8±0,37	17,0±1,06
	İnfekte Grup	15,6±0,50	17,0±0,37	18,3±0,93	17,9±0,54	22,0±2,36	23,1±2,51*	23,0±3,22	18,5±0,66*	19,0±2,12	16,1±0,10
T.P.Protein g/100ml	Kontrol Grup	4,76±0,16	4,81±0,44	4,72±0,43	3,69±0,34	3,69±0,55	3,99±0,44	5,04±0,19	4,81±0,40	5,94±0,21	4,81±0,45
	İnfekte Grup	3,92±0,34	5,73±0,41	5,07±0,26	4,65±0,15*	4,78±0,12	4,88±0,18	4,12±0,24*	4,15±0,09	3,35±0,06*	4,08±0,13
Plazma Albumin g/100ml	Kontrol Grup	3,81±0,10	4,70±0,16	4,63±0,02	3,04±0,14	3,55±0,24	3,35±0,48	4,85±0,08	3,50±0,14	4,93±0,13	4,77±0,08
	İnfekte Grup	2,18±0,16*	2,43±0,13*	1,94±0,15*	2,25±0,13*	1,94±0,07*	2,27±0,16	2,02±0,03*	1,98±0,14*	1,84±0,05*	1,95±0,09*
Plazma Kortizol ng ml-1	Kontrol Grup	53,8±3,02	87,4±2,56	60,8±3,58	50,4±2,39	91,2±4,16	81,8±6,10	57,8±3,92	61,8±2,76	46,4±4,16	58,8±3,81
	İnfekte Grup	141,2±12,7*	157,8±10,0*	226,8±11,9*	271,6±13,7*	230,4±5,7*	189,0±8,4*	190,8±6,7*	278,0±12,7*	230,4±12,3*	285,8±9,1*

*: P<0.05 güven aralığına göre gruplar arasındaki istatistiksel farklılık

Tablo 2. Kontrol ve infekte grup balıklarda trombosit, toplam.lökosit sayıları ve farklı lökosit yüzde değerlerinin karşılaştırılması.

Table 2. Comparison of percentages of thrombocyte, total leucocyte and different leucocyte types in control and infected fish.

Gün		1	2	3	4	5	7	9	11	13	15
Trombosit 10 ³ /mm ³	Kontrol Grup	10,0±0,70	12,2±0,58	11,2±0,58	10,8±0,58	11,6±0,74	11,4±0,50	12,8±0,37	11,4±0,50	11,2±0,37	11,0±0,44
	İnfekte Grup	11,8±0,37	15,6±0,50*	18,0±0,31*	17,4±0,92*	15,4±0,74*	16,0±0,44*	13,6±0,50	13,8±0,37*	13,6±0,50*	13,8±0,86*
Toplam Lökosit 10 ⁴ /mm ³	Kontrol Grup	3,50±0,16	3,36±0,16	3,62±0,09	3,34±0,11	3,46±0,14	3,44±0,11	3,56±0,17	3,50±0,15	3,86±0,11	3,62±0,20
	İnfekte Grup	3,96±0,11	4,36±0,21*	4,16±0,24	4,24±0,29*	4,32±0,17*	4,48±0,31*	3,96±0,33	3,26±0,15	2,80±0,14*	2,48±0,21*
Nötrofil %	Kontrol Grup	18,8±1,68	20,0±1,64	17,0±4,13	17,0±2,02	18,2±1,59	14,8±1,28	16,0±1,78	17,0±0,54	18,4±2,44	17,0±1,76
	İnfekte Grup	18,4±0,92	20,0±1,41	21,8±1,88	22,6±1,80	21,2±0,37	19,6±0,92*	18,4±0,97	18,4±0,74	18,6±0,50	20,2±0,48
Monosit %	Kontrol Grup	3,0±0,83	3,2±0,96	2,4±1,02	2,6±1,16	3,4±0,87	2,6±1,07	2,8±0,86	3,2±0,48	3,0±0,83	2,8±0,80
	İnfekte Grup	3,4±0,50	4,6±0,81	5,4±1,02	6,6±1,02*	6,6±0,50*	7,4±0,50*	6,8±0,58*	6,4±0,50*	5,4±0,39*	4,0±0,54
Lenfosit %	Kontrol Grup	78,2±1,31	76,8±2,26	80,6±3,37	80,4±2,56	78,4±1,28	82,6±1,02	81,2±1,98	79,8±0,58	78,6±1,88	80,2±1,95
	İnfekte Grup	78,2±1,24	75,4±1,69	72,8±1,46	70,8±2,13*	72,2±0,19*	73,0±0,94*	74,8±1,39*	75,2±0,58*	76,0±0,89	75,8±0,58

*: P<0.05 güven aralığına göre gruplar arasındaki istatistiksel farklılık

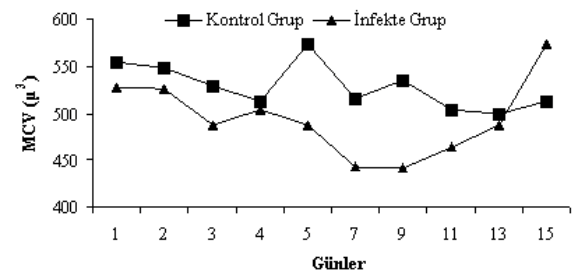
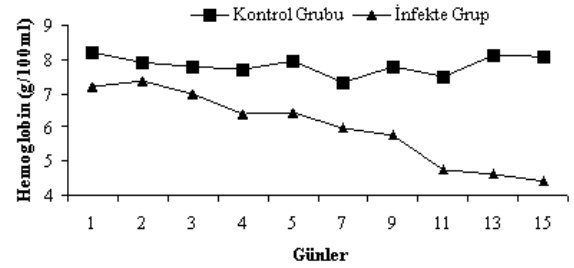
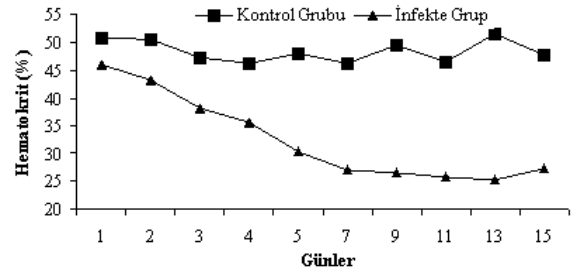
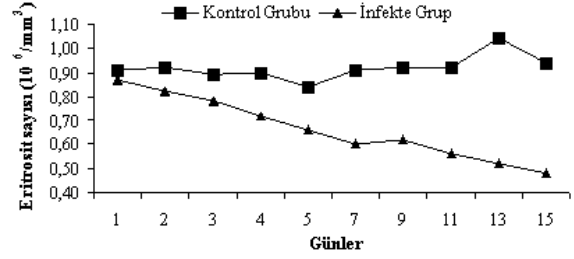
ğunluğu (MCHC), eritrositt sayısı, hematokrit değeri ve hemoglobin miktarından hesaplanarak bulunmuştur²¹. Toplam plazma protein (g/100ml) ve albümin (g/100ml) değerleri, Biolabo firmasının test reaktifleri kullanılarak Biuret ve Brom Creosol Green yöntemleriyle Shimadzu UV-1601 marka spektrofotometre cihazında, Plazma kortizol değerleri ise, Biognosis firmasının 96 testlik Fish Cortisol ELISA kiti kullanılarak (numune haznesi yıkama işlemi Bio-Tek ELx50, okuma işlemi ise Ultra Microplate Reader ELx800 IU marka cihazda) tespit edilmiştir.^{22,23}

Sonuçların istatistiksel analizi kontrol ve infekte gruba ait her bir parametrenin ortalama değerleri, inceleme gününe göre SAS JMP. v8. 0.2 istatistik programı kullanılarak "Student t" testi ile analiz edilmiştir. İstatistiki farklılıklarda önem seviyeleri $P < 0.05$ düzeylerinde değerlendirilmiştir

Bulgular

Araştırmada kullanılan kontrol ve infekte grubuna ait 200 adet balığın 15 gün süreyle, eritrosit, trombosit, toplam lökosit sayıları, hematokrit, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC, farklı lökosit yüzde değerleri, toplam plazma proteini, plazma albümin ve plazma kortizol miktarları Tablo 1 ve 2'de verilerek inceleme gününe göre kontrol ve infekte grupları arasındaki istatistiki farklılıklar belirtilmiştir. Kontrol ve infekte grup balıklarından elde edilen hematolojik değerlerdeki farklılıkların inceleme gününe göre değişimleri Şekil 1a, 1b, Şekil 2 ve Şekil 3'de gösterilmiştir. Bu araştırmada *V. anguillarum* ile infekte edilmiş gökkuşağı alabalıklarında, eritrosit sayısının 2. günden sonra azaldığı ($P < 0.05$), lökosit sayısının infeksiyonun 2.günden 7.güne kadar arttığı ($P < 0.05$), 13. ve 15. günlerde azaldığı ($P < 0.05$), trombosit sayısının ise infeksiyonun 2.,3., 4., 5., 7., 11.,13. ve 15. günlerinde arttığı ($P < 0.05$) görülmüştür. (Tablo 1, 2; Şekil 1a, 1b, 2). Araştırmada kullanılan gökkuşağı alabalıklarında lökosit tiplerinin lenfosit, nötrofil ve monositlerden oluştuğu tespit edilerek bu hücrelerin yüzde değerlerinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir (Tablo 2, Şekil 2). İnfekte grup balıklarda hematokrit, hemoglobin, plazma albümin değerlerinde azalma, plazma protein değerlerinde 2.günden 7. güne kadar artış gösterdiği (4.günde önemli, $P < 0.05$) sonraki günlerde azalma olduğu (9 ve 13. günlerde önemli, $P < 0.05$), plazma kortizol değerlerinde ise inceleme dönemi boyunca artış

şekillendiği ($P < 0.05$) tespit edilmiştir (Tablo 1, Şekil 3).

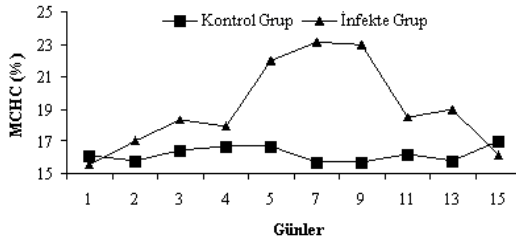
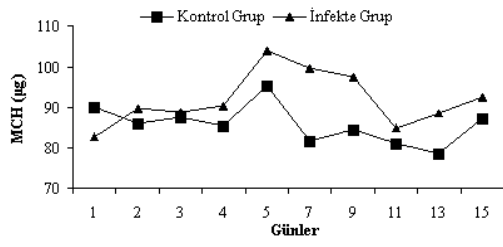


Şekil 1a.

Kontrol ve infekte grup balıklarında eritrosit, hematokrit, hemoglobin, mcv değerlerinin karşılaştırılması.

Figure 1a.

Comparison of erythrocyte, haematocrit, haemoglobin and MCV levels in control and infected fish.

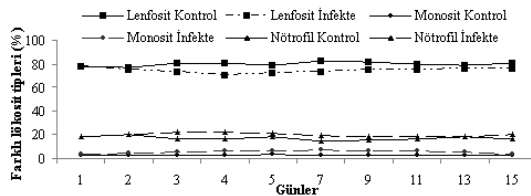
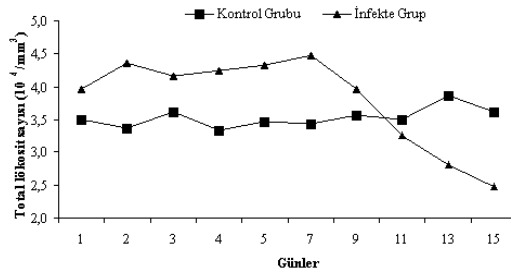
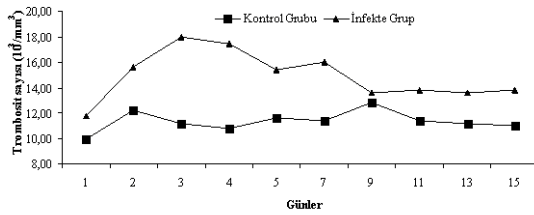


Sekil 1b.

Kontrol ve infekte grup balıklarında MCH, MCHC değerlerinin karşılaştırılması.

Figure 1b.

Comparison of MCH and MCHC levels in control and infected fish.

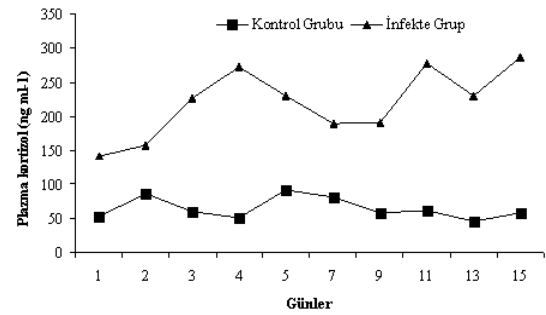
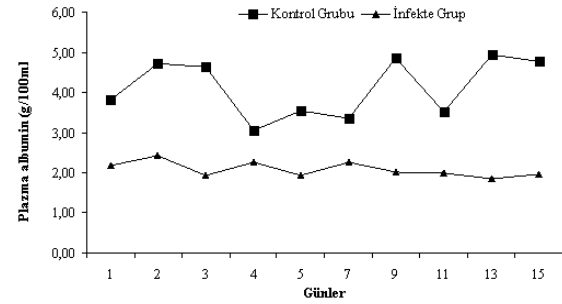
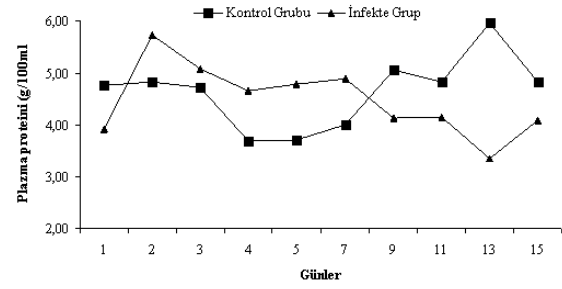


Sekil 2.

Kontrol ve infekte grup balıklarda trombosit, total lökosit ve farklı lökosit değerlerinin karşılaştırılması.

Figure 2.

Comparison of values of thrombocyte, total leucocyte and different leucocyte types in control and infected fish.



Sekil 3.

Kontrol ve infekte grup balıklarında total plazma protein, plazma albümin ve plazma kortizol değerlerinin karşılaştırılması.

Figure 3.

Comparison of thrombocyte, total plasma protein, plasma albumin and plasma cortisol values in control and infected fish.

Tartışma

Araştırmamızda eritrosit sayıları, infekte balıklarda ilk günden itibaren azalma göstererek infeksiyonun 15. gününde normal değer olan $0.94 \times 10^6 / \text{mm}^3$ dan $0.48 \times 10^6 / \text{mm}^3$ ya düşmüş ve eritrositlerdeki azalmanın 2, 3, 4, 7, 9, 11, 13 ve 15. günlerde istatistiki olarak önemli olduğu saptanmıştır ($P < 0.05$). Bakteriyel balık hastalıklarına yönelik hematolojik çalışmalarda (vibriozis, furunkulozis, yersiniozis ve streptokokozis gibi septisemik hastalıklarda), hemapoyetik ve lenfoid dokunun yıkılmanmasına bağlı olarak eritrosit sayılarında önemli oranda azalmalar görüldüğü bildirilmektedir^{22,24-28}. Bakteriyel septisemik hastalıkların (yersiniozis, vibriozis, frunkulozis, bakteriyel hemorajik

septisemi) ilk dönemlerinde lökositoz, ilerlemiş olduğu dönemlerde ise lökopeni görülmektedir²⁹. Deneysel olarak yersiniozis oluşturulmuş gökkuşağı alabalıklarında da infeksiyonun ilerlemiş olduğu durumlarda lökopeni görüldüğü bildirilmiştir^{22,29}. Araştırmamızda infeksiyonun ilk 7 gününde bakteriyel etkene karşı non-spesifik hücresel savunma sisteminin uyarılmasına bağlı olarak lökositoz meydana gelirken 11. günden sonra lökopeni şekillenmiştir. Lökopeni şekillenmesinin nedeni, bakteriyel etkenin etkisi sonucu hemapoyetik dokularda (böbrek ve karaciğer) nekroz meydana gelmesine bağlanabilir.

Trombosit sayılarıyla ilgili araştırmalarda, Lester ve Budd³⁰, coho salmonlarında trombosit sayısını mm³ kanda 26.10³, Kocabatmaz ve Ekingen⁸ ise mm³ kanda 4.10³ olarak bildirmişlerdir. Casillas ve Smith³¹, gökkuşağı alabalıklarında trombosit değerlerinin stresten önce 21.10³, stresten sonra 43.10³/mm³ olduğunu tespit etmişlerdir. Farklı araştırmacılar *Y. ruckeri*, *A. salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum* ile infekte edilmiş alabalıklarda trombosit sayısının infekte grupta kontrol grubuna oranla artış gösterdiğini belirlemiştir^{22,24,26}. Araştırmamızda trombosit sayısı kontrol grubuna oranla artış göstermiş ve infeksiyonun 2. günden sonra infekte balıklarda trombosit sayılarındaki artışın istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (P<0.05). İnfekte balıklarda farklı lökosit tipleri incelediğinde lenfosit yüzdesinde azalma (4. günden itibaren, P<0.05) ve monosit yüzdesinde 4. günden itibaren artış (P<0.05) saptanmıştır. Nötrofil yüzdesinde ise infeksiyonun 3 gününden itibaren bir artış olduğu ancak istatistiksel olarak önemli artışın 7. günde şekillendiği belirlenmiştir. Yapmış olduğumuz literatür taramalarında bakteriyel hastalıklara ilişkin olarak farklı lökosit tipleri değerleriyle ilgili verilerin sınırlı olduğu görülmüştür. Bu konuda yapılan bir çalışmada Bruno ve Munro²⁶; *Renibacterium salmoninarum* ile deneysel olarak infekte edilmiş gökkuşağı alabalıklarında monosit ve nötrofil değerlerinde artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Buch⁶, yersinioz hastalığında hemapoyetik dokuların nekroze olması sonucu anemi şekillendiğini, anemi durumunda ise hematokrit değerinin azalmasına bağlı olarak kandaki retikülosit, eritroblastların sayısının arttığını bildirmektedir. Yaptığımız araştırmada hematokrit değerini inceleme süresince istatistiksel olarak azalmakta olup (P<0.05) infeksiyonunun 13. gününde normal değer olan 51.4'den 25.4'e düşmüştür. Wobeser³², gökkuşağı alabalıklarında

da ortaya çıkan yersiniozis salgınında hematokrit değeri hasta balıklarda 21.5 sağlıklı balıklarda 46.1 olarak tespit etmiştir. Quentel ve Aldrin²⁹, *Y. ruckeri* ile infekte edilmiş gökkuşağı alabalıklarında, Shieh ve Maclean³³, furunkulozis etkeni *Aeromonas salmonicida* ile infekte edilmiş gökkuşağı alabalıklarında, Waagbo ve ark³⁴, soğuk su vibriozu (Hitra Hastalığı) görülen Atlantik salmonlarda hemoglobin miktarının önemli oranda azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmamızda da hemoglobin miktarı infekte balıklarda eritrosit sayısında azalmaya bağlı olarak düşüş göstermiş ve gruplar arasında 4. günden itibaren istatistiksel olarak önemli farklılıklar tespit edilmiştir (P<0.05). Anemilerin oluşum sebebine göre sınıflandırılmasında eritrosit (Wintrobe) indeksleri kullanılmaktadır³⁵. Bu amaçla eritrosit indeksleri incelendiğinde; infekte balıklarda hastalığın, 5., 7. ve 9. günlerindeki eritrosit, hematokrit, hemoglobin ve MCV değerlerinde görülen tabloya göre mikrositer normokrom anemi görüldüğü kanısına varılmıştır. Buna karşılık Quentel ve Aldrin²⁹, *Yersinia ruckeri* ile infekte edilmiş gökkuşağı alabalıklarında makrositler normokrom anemi görüldüğünü bildirmektedirler. Araştırmamızda ise infeksiyonun 5., 7. ve 9. günlerinde mikrositer anemi görülmesinin sebebinin, farklı araştırmacılar tarafından bildirilen Spanggaard ve ark.³⁶, Rodkhuma ve ark.³⁷ bakteriyel etkenin ekstraselüler toksin salgıları (hemolizin, proteaz, dermatotoksin, hemolizin vb.) ve siderofor (*V. anguillarum* da olduğu gibi bakteriler tarafından, konakta bulunan demiri bağlamak için salgılanan maddeler) ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Soğuk su Vibriozu (Hitra hastalığı) görülen Atlantik salmonlarla, deneysel olarak *R. salmoninarum* infekte edilmiş gökkuşağı alabalıklarında plazma Albumini ile total plazma proteininin önemli oranda azaldığı bildirilmiştir^{26,34}. Wobeser³², ise gökkuşağı alabalıklarında ortaya çıkan yersiniozis infeksiyonunda total plazma proteini miktarının yarı yarıya azaldığını saptamıştır. *Y. ruckeri* ile infekte ettiğimiz gökkuşağı alabalıklarında da total plazma proteini ve plazma albumini miktarının kontrol grubuna oranla belirgin bir şekilde azaldığı tespit edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur.

Sonuç olarak *V. anguillarum* ile infekte gökkuşağı alabalıklarında kan parametrelerinde meydana gelen değişimlerin ilk kez tespit edildiği bu araştırmada; eritrosit, hematokrit, hemoglobin albümin ve MCV değerlerinde istatistiksel olarak azalma meydana geldiği saptanmıştır.

Toplam lökosit sayılarında, infekte grup balıklarda hastalığın seyrine bağlı olarak 10.güne kadar artış 11.günden sonra azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca infekte balıklarda trombosit sayılarında artış, lökosit yüzde değerlerinde farklılıklar (nötrofil ve monosit hücrelerinde artış lenfosit hücrelerinde azalma) tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre; infekte balıklarda (*V. anguillarum*'un virulensinde etkili olan hemolizin ve proteolitik enzimler gibi ekstra selüller ürünlerin etkileriyle eritrositlerin hemolize olması nedeniyle) mikrositer normokrom anemi ve plazma proteini ile albumin miktarlarındaki azalmaya bağlı olarak hipoproteinemi şekillendiği söylenebilir.

Kaynaklar

1. Buller, N.B., 2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals. CABI Publishing, UK.
2. Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246: 31-67.
3. Ekici, S., Diler, Ö., Altun, S., 2005. Kültürü yapılan balıklarda görülen Vibriosis enfeksiyonları. XIII Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu. 01-04 Eylül, Çanakkale
4. Akaylı, T., 2001. Kültür Çipura balıklarında (*Sparus aurata*. L., 1758) vibriosisin elisa ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Doktora Tezi. 77s. İstanbul
5. Çağırğan, H., 1993. Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*. L.) ve levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 117s., İzmir
6. Busch, R.A., 1982. "Enteric Redmouth Disease", Symposium International de Talloires 10-12 May., 1982, Les Antigenes Des Microorganismes Pathogènes de Poissons. Collection Fondation Marcel Merieux, 201-224
7. Austin, B., Austin, D.A., 1999. Characteristics of the pathogens: Gram-negative bacteria. In: Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. (Eds.: B. Austin. and D.A. Austin). Third (revised) edition. Praxis Publishing Ltd., New York.
8. Kocabatmaz, M., Ekingen, G., 1984. Değişik tür balıklarda kan örneği alınması ve hematolojik metotların standardizasyonu. *Doğa Bilim Dergisi*. 1 (8): 149-159.
9. Woo, P.T.K., Bruno, D.W., 1999. Viral, bacterial and fungal infections. Fish diseases and disorders. Vol. 3. Oxon, Cabi Publishing, United Kingdom.
10. Korun, J., 2006. *Kültürü Yapılan Çipuralarda (Sparus aurata L.) Görülen Listonella anguillarum Enfeksiyonu Üzerine Bir Çalışma*. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi Cilt/Volume 23. Ek/Suppl. (1/2): 259-263.
11. Shakoori, A.R., Iqbal, M.J., Mughal, A.L., Ali, S.S., 1994. Biochemical Changes Induced by Inorganic Mercury on the Blood. Liver and Muscles of Freshwater Chinese Grass Carp. *Ctenopharyngodon idella*. *J. Ecotoxicol. Environ. Monit.*, 4 (2): 81-92.
12. Pagés, T., Gómez, E., Sünner, O., Viscor, G., Tort, L., 1995. Effects of Daily Management Stress on Haematology and Blood Rheology of the Gilthead Seabream. *J. Fish Biol.*, 46: 775-786.
13. Rimsh, E.Y. and Adamova, L.G., 1973. "Blood Analysis of Herbivorous Fish (Biological Principles and Ways of Increasing the Efficiency of Natural Reproduction and Rearing of Valuable Commercial Fishes)" *Fish. Res. Board of Canada*. Translation series No: 2620
14. Hunter, V., Knittel, M. and Fryer, D., 1980. Stress Induced Transmission of Yersinia ruckeri Infection from Carriers to Recipient Steelhead trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) *J. Fish. Dis.* 3: 267-272,
15. Pickering, A., D., 1989. Factors Affecting the Susceptibility of Salmonid Fish Disease. Reprint from Rep. *Freshwater Biol. Ass.* No.57: 61- 80
16. Post, G., 1987. "Textbook of Fish Health". T.F.H. Publications, Inc., Neptune City, USA.
17. Sandes, K., Lie, O. and Waagbo, R., 1988. "Normal Ranges of Some Blood Chemistry Parameters in Adult Farmed Atlantic Salmon, *Salmo salar*." *J. Fish Biol.*, 32: 129-136
18. Konuk, T., 1981. "Pratik Fizyoloji A.Ü. Vet. Fak. Yay. 378, Ders Kitabı: 276, Ankara
19. Hofmann, R. and Lomel, R. 1984, "Effects of Repeated Blood Sampling on Some Blood Parameters in Freshwater Fish." *J. Fish Biol.* 24: 245-251
20. Amlacher, E., 1992. "Taschenbuch der Fish Krankheiten Grundlagen der Fishpathologic", Gustav Fisher, Stuttgart
21. Mc Leay, D.J. and Gordon, M.R., 1977. "Leucocrit: A simple Hematological Technique for Measuring Acute Stress in Salmonid Fish, Including Stressful Concentrations of Pulpmill effluent." *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 34: 2164-2175
22. Altun, S., Diler, Ö., 1996. Yersinia ruckeri ile infekte edilmiş gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) hematolojik incelemeler. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 23: 301-309.

23. Barry T, Lapp A, Kayes T, Malison J (1993) Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*S. namaycush*). *Aquaculture* 117:351–363
24. Demirdöğen, N., 1997. Deneysel olarak *Aeromonas salmonicida* ile infekte edilen Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) bazı hematolojik Parametreler. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 54, İstanbul.
25. Harbell, S., Hodgins, C., Schiewem, H., 1979. Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 2: 391-404.
26. Bruno, D.W., Munro, A.L.S., 1986. Haematological assessment of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson and Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*. *J. Fish Dis.* 9: 195-204 .
27. Řehulka, J., 2002. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. *Acta Vet. Brno.* 71: 351-360.
28. De Kinkelin, P., Michel, C., Ghittino, P., 1986. Précis de pathologie des poissons. Office International des Epizooties et Institut National de la Recherche Agronomique Editeurs. Paris
29. Quentel, C. and Aldrin C.F., 1986 “Modifications Sanguines Consécutives a l’ Inoculation Intrapéritonéale de *Yersinia ruckeri* chez des Truites Arc-en-ciel, *Salmo gairdneri*, Cathétérisées”. *Aquaculture*, 53: 169-185.
30. Lester, R.J.G., and Budd, J., 1983. Soma Changes in the Blood Cells of diseased coho salmon can. *J. Zool.* 57: 1458-1464.
31. Casillas, E., Smith, L.S., 1977. Effect of stress on blood coagulation and haematology of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.*, 10: 481-491.
32. Wobeser, G., 1973. “An Outbreak of Redmouth Disease in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*), in Saskatchewan”, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 30: 571-575.
33. Shieh, H.S. and Mac Lean, J.R., 1976. “Blood Changes in Brooke Trout Induced by Infection with *Aeromonas salmonicida*.” *J. Wildl. Dis.*, 12: 77-82
34. Waagbo, R., Sandnes, K., Epelid, S. and Lie, O., 1988. “Haematological and Biochemical Analyses of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, L., Suffering From Coldwater Vibriosis (“Hitra disease”), *J. Fish Dis.*, 5: 417-423.
35. Yılmaz, B., “1984. Fiziyojji” Hacettepe Tas Kitapçılık Ltd. Sti. Ankara
36. Spangaard B, Huber I, Nielsen J, Nielsen T, Gram L (2000) Proliferation and location of *Vibrio anguillarum* during infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 23:423–427.
37. Rodkhum C, Hirono I, Crosa JH, Aoki T: Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout. *Microb Pathol* 2005, 39(4):109-119.