

Kültürü yapılan Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Bakteriyel Böbrek Hastalığı (BKD)'nın teşhisi

Dr. Sibel ÖZKÖK¹, Selahattin ŞEN¹, Hikmet ÜN²

¹Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Su Ürünleri Hastalıkları Araştırma ve Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

²Etlik Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Kuduz Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Özet: Bu projede *Renibacterium salmoninarum* izolasyon ve identifikasyonu için, 2005-2007 yılları arasında, Kesikköprü Baraj Göleti'nde yer alan 5 adet alabalık işletmesinden toplam 360 adet; Safranbolu'da yer alan 1 adet alabalık işletmesinden 120 adet 6-12 aylık alabalıklardan böbrek örnekleri aseptik koşullarda alındı. Safranbolu'da yer alan 1 adet alabalık işletmesinde 120 adet olgun dişi balıklardan ovaryum sıvısı uygun koşullarda alındı. Toplanan örneklerden izolasyon için KDM-2 medium kullanıldı. Toplam 600 adet örnekten hiç *R.salmoninarum* izolasyonu olmadı. Aynı örneklerden DFAT ve nested-PCR testleri yapıldı. Örneklerin hiçbirinde etkene rastlanılmadı.

Sonuç olarak Ankara ve Safranbolu'da Bakteriyel Böbrek Hastalığı saptanamamıştır. Laboratuvarımızda alabalıklarda konvansiyonel izolasyon ve identifikasyon yanında DFAT ve nested-PCR gibi testlerle Bakteriyel Böbrek Hastalığı kısa sürede teşhis edilebilir hale gelmiştir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyel Böbrek Hastalığı, DFAT, Gökkuşığı alabalığı, Nested-PCR, *Renibacterium salmoninarum*.

The diagnosis of Bacterial Kidney Disease (BKD) from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Summary: In this project, totally 360 samples from 5 rainbow trout farms on Kesikköprü barrage lake and aseptically 120 kidney tissues about 6-12 months rainbow trout from one rainbow trout farm from 2005 to 2007 were collected for isolation and identification of *R.salmoninarum*. Ovarian (coelemic) fluids were collected from 120 mature females of fish farming on Safranbolu. KDM-2 medium was used for isolation from samples. *R.salmoninarum* was not isolated on totally 600 samples. DFAT and nested-PCR results of all samples were negative.

As a result Bacterial Kindey Disease was not detected in Ankara and Safranbolu. In our laboratories, Bacterial Kindey Disease could be diagnosed rapidly by conventional isolation and identification with DFAT and nested-PCR on rainbow trout.

Key words: Bacterial Kidney Disease, DFAT, Nested-PCR, Rainbow trout, *Renibacterium salmoninarum*.

Giriş

Ülkemizde balık yetiştiriciliğine 1960'ların sonunda tatlı su balıklarında, deniz balıklarında ise 1986 yılında başlanmıştır. Halen ülkemizde 2001 yılı itibariyle 1769 adet onaylı balık çiftliği bulunmakta ve bunların 1423'ü iç sularda, 346'sı denizlerimizde faaliyet göstermektedir. Bu çiftliklerin yanı sıra çiftliklerin yavru ihtiyacını temin için 20 adet kuluçkahane bulunmaktadır. Tatlı sularımızda gökkuşığı alabalığı üretimi oldukça yaygın olarak devam etmektedir. Türkiye'de alabalık üretimi 1990 yılında 3 212 ton iken 1999 yılında 38 570 ton ve 2000 yılında ise 44 533 tona çıkmıştır. Bu rakamlardan da anlaşılacağı üzere ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliği giderek hızla artmakta ve buna paralel olarak da olumsuz çevre şartları, kalitesiz yem ve hastalıklardan ileri gelen bir takım problemler de ar-

tış göstermektedir. Hastalıklar balıklarda ölüme neden olmaları, ihracatı olumsuz yönde etkilemeleri, tedavi masrafları, uygun kullanılmayan ilaçların rezidü sorunu yaratmaları, çevre kirliliği oluşturmaları, bakteriyel direnç neden olmaları ve iş ve zaman kaybına yol açmaları nedeniyle ülke ekonomisine büyük zararlar vermektedir.

Balık yetiştiricilerimizin büyük çoğunluğu ihtiyaç duydukları yavru balıkları ya kendi kuluçkahanelerinde yetiştirmekte ya da mevcut olan kuluçkahanelerden temin etmektedirler. Kuluçkahanelerde var olan enfeksiyonlar birçok balık işletmesinden taşınmakta ve oradan doğal kaynaklara yayılma ihtimali de her zaman mevcut olmaktadır.

OIE standartlarına ve AB'nin 91/67/EEC ve 93/53/EEC sayılı direktifleri çerçevesinde hastalıklı ve hastalıktan arı zonların, işletmelerin ve kuluçka-

hanelerin belirlenmesi, haritalanması, onaylanması, duyurulması, takibi, iyileştirilmesine yönelik tedbirlerin alınması, sertifikalanması, gerek iç piyasaya gerekse ihracata yönelik ürünlerin yetiştirildiği sular ve taşınmasına yönelik tedbirlerin alınması gerekmektedir. Kuluçkahane ve işletmelerin periyodik aralıklarla kontrollerinin yapılması ve bu kontroller sonucunda hastalık riski taşıyan kuluçkahanelerin gözlem altına alınması sağlanmalıdır.

Bakteriyel Böbrek Hastalığı (BKD) salmonidlerde yüksek mortalite ile seyreden sistemik bir enfeksiyondur. Hastalık genellikle kronik olarak seyrederek, ancak özellikle düşük ısılarında (13-18°C) akut hale geçip salgınlar halinde görülebilir. Salgınlar ilk defa İskoçya'da Atlantik salmonlarda bildirilmiştir. Daha sonra ABD'de 1935 yılında hastalık bildiri yapılmıştır (BULLOCK ve HERMAN, 1980).

Etken küçük, hareketsiz, gram pozitif, diplokoklardır. İlk defa Ordal ve Earp (1956), izole etmeyi başarmışlar ve *Corynebacterium* olarak klasifiye etmişlerdir. Sanders ve Fryer (1980), etkenin biyokimyasal özelliklerini dikkate olarak *Renibacterium salmoninarum* olarak isimlendirmişlerdir (BULLOCK ve HERMAN, 1980). Bullock ve Stuckey (1975), oldukça hızlı olan direkt ve indirek FAT ile subklinik ve klinik enfekte hayvanları saptayabilmişlerdir (BULLOCK ve HERMAN, 1980).

R.salmoninarum'un 1990 ve 2002 yılları arasında yapılan izleme programında İskoçya sularında Atlantik salmon ve gökkuşuğu alabalıklarında birçok salgınlar yaptığı tespit edilmiştir. Teşhis için kültür, bakteriyoskopi ve ELISA kullanılmıştır (BRUNO, 2004).

Bakteri yabancı stoklardan yumurta yolu ile hatcherilere taşınmaktadır. Rutin olarak balık ürünleri pastörizasyona tabi olduğu halde stoklardan BKD elemine edilememiştir. Hayli yüksek patojen olan bu etkenin kontrolü için hızlı ve duyarlı test metotları kullanılması oldukça avantaj sağlamaktadır. Bunlara rağmen BKD halen doğal ve kültür alabalıkçılığında ciddi bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (FRYER ve LANNAN, 1993).

Bakteriyel Böbrek Hastalığı ilk olarak 1930 yılında İngiltere'de Atlantik Salmonlarda tanımlanmış. 1935 yılında ABD'de alabalık yavrularında ortaya çıkmıştır. Ancak etken izolasyonu 1950'li yıllarda yapılmıştır. 1995 yılında ABD'de yapılan bir

çalışmada yavru alabalıklarda tespit edilen Bakteriyel Böbrek Hastalığı için kullanılan teşhis yöntemleri karşılaştırılmıştır. Yine 1995 yılında Finlandiya'da balıklarda BKD üzerinde çalışılmıştır. Kanada'da 1995 yılında Atlantic salmon ve *Salmo salar* kuluçkahanelerindeki yavru balıklarda *R.salmoninarum* IFAT testi ile araştırılmış, 424 adet balığın % 13.7'sinde hastalık tespit edilmiştir. 1992 yılında İspanya'da ilk *R.salmoninarum* izolasyonu bildirilmiştir. 1994 yılında ise Polonya'da, 1993 yılında İngiltere'de alabalıklarda bu hastalık araştırılmıştır. 1987 yılında Norveç'te yapılan bir çalışmada 11 işletmede BKD tespit edilmiştir.

Chase ve Pascho (1998), yaptıkları bir çalışmada Salmonid'lerin vücut sıvılarından ve dokularında nükleik asid bazlı testlerle *R.salmoninarum* teşhis etmişlerdir. Nested-PCR yöntemini kullanmışlar, böbreklerden konvansiyonel PCR yönteminden daha çok etken saptamışlardır. Nested-PCR'in yanlış pozitif reaksiyonlar veren ELISA ve FAT tekniklerinden daha hassas olduğunu saptamışlardır. 74 adet doğal enfekte chinook salmondada yaptıkları çalışmada Nested-PCR, ELISA ve FAT oranlarını %61, 47 ve 43 olarak bulmuşlardır.

Pascho ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada doğal enfekte 103 adet chinook salmon ovaryum sıvıları üzerinde çalışmışlar; ELISA ile % 39'unu , nested-PCR ile de hasta olanların % 100'ünü saptamışlardır.

Miriam ve ark. (1997), yaptıkları bir çalışma sonucunda enfekte ovaryum sıvısında çok düşük orandaki *R.salmoninarum*'un da saptanabildiğini ve kültürü yapılamayan veya ölen bakterilerin saptanmasında bu yöntemin güvenle kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

White ve ark. (1995), çalışmalarında kültür, ELISA ve FAT karşılaştırmışlar; yüksek dozla enfekte dokularda ELISA ve FAT daha hassas olduğu halde düşük dozla enfekte dokularda bakteriyolojik kültürden daha düşük hassasiyette olduğunu saptamışlardır.

Magnusson ve ark. (1994), yaptıkları bir diğer çalışmada doğal enfekte balıklardan alınan özellikle ovaryum sıvılarında reverse transcription ve nested-PCR bazlı yöntemlerde 1-10 bakteriye kadar etkenin saptanabildiğini ve 1-2 gün içinde sonuç alınabildiğini bildirmişlerdir.

Jansson (2002), Sueciae’de yaptığı tez çalışmasında 400 adet salmonid balık böbrekleri üzerine ELISA ve kültür yöntemlerini kullanarak *R.salmoninarum* tespit etmeye çalışmış, ancak BKD yönünden hepsini negatif bulmuştur.

Türkiye’de ilk olarak 1977 yılında G. Halıcı, E. İstanbulluoğlu ve M. Arda tarafından Bayındır Barajı alabalık yetiştirme istasyonunda görülen bakteriyel böbrek hastalığı ve sağaltımı üzerinde çalışılmıştır.

M. Sarıeyyüpoğlu, A. Muz ve Y. Özdemir tarafından 1985 yılında yapılan bir çalışmada Ovacık-Tunceli alabalık yetiştirme istasyonunda 10 adet alabalıkta *R.salmoninarum* tespit edilmiştir.

Bu bilgiler ışığında 3285 sayılı Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanunu’nun 4. maddesine göre İhbarı Mecburi Hastalıklar Hakkındaki No: 2007/132 ve 08.05.2007 tarih ve 26580 sayılı Resmi Gazete’de İhbarı Mecburi Hastalıklar grubunda yer alan Bacterial Kidney Disease (Bakteriyel Böbrek Hastalığı, BKD) üzerine bir çalışma yapılması ve bu doğrultuda hastalığın alabalık işletmeleri ve kuluçkahanelerinde yaygınlığı amaçlanmıştır. Bu çalışmada *R.salmoninarum*’un kültürü yapılan alabalıklardan izolasyon ve identifikasyonu, DFAT ve PCR testleri ile tespiti ve antibiyogramı amaçlanmıştır. *R.salmoninarum* ile ilgili olarak daha evvel Türkiye’de DFAT ve PCR testleri ile yapılan bir çalışma

Tablo 1. Alabalık işletmelerinden alınan numune sayısı.

Kesikköprü Baraj Göleti’nde Yer Alan İşletmelerden Alınan Numune Sayısı					
	1.yıl		2.yıl		Toplam
	1. Dönem	2. Dönem	3. Dönem	4. Dönem	
1. İşletme (böbrek)	30	30	30	30	120
2. İşletme (böbrek)	30	30	30	-	90
3. İşletme (böbrek)	30	30	-	-	60
4. İşletme (böbrek)	30	30	-	-	60
5. İşletme (böbrek)	30	-	-	-	30
Safranboluda Yer Alan İşletmeler					
1. İşletme (böbrek)	30	30	30	30	120
Damızlık (Ovaryum sıvısı)	30	30	30	30	120
Toplam	210	180	120	90	600

Besi yeri: İzolasyon için OIE’nin öngördüğü besi yerlerinden % 5-10 fetal sığır serumu bulunan KDM-2 medium kullanıldı (OIE. Manual, 2006).

bulunmamaktadır. Bu araştırmada OIE’nin önerdiği *R.salmoninarum*’un konvansiyonel yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu ile birlikte hızlı ve etkili teşhis yöntemleri olan DFAT ve nested-PCR testleri de kullanılmıştır.

Materyal ve Metot

Örneklerin Toplanması: Bu proje planlanırken her bir işletmeden 2 yıl süresince 2 kez 30’ar adet numune toplanılmasına karar verildi. Ancak global su sorunu nedeni ile Büyük Kızılırmak Projesinden dolayı Kesikköprü Baraj Göleti’nden Ankara’ya su temin edilmesi çalışmaları sonucu alabalık işletmelerinin bir kısmı kapandı, bir kısmı da üretimi durdurdu. Bu nedenle hedeflenen sayıya ulaşılamadı. Ancak Kesikköprüde kapanan işletmelere ilaveten Safranbolu’dan bir adet alabalık işletmesi ve bir adet de damızlık işletmesi projeye dahil edildi. Aşağı verilen tabloda hangi işletmelerden ne kadar numune toplandığı belirtilmiştir (Tablo 1). Bu Projede *R.salmoninarum* izolasyon ve identifikasyonu için, Kesikköprü Baraj Göleti’nde yer alan 5 adet alabalık işletmesinden toplam 360 adet; Safranbolu’da yer alan 1 adet alabalık işletmesinden 120 adet 6-12 aylık alabalıklardan böbrek örnekleri aseptik koşullarda alındı. Safranbolu’da yer alan 1 adet alabalık işletmesinde 120 adet olgun dişi balıklardan ovaryum sıvısı uygun koşullarda alındı.

Strip: İdentifikasyonu için OIE’nin önerdiği API-Zym kullanıldı (OIE. Manual, 2006).

Konjugate: İşaretli antikör olarak “fluorescein labeled affinity purified antibody to

R.salmoninarum, Maryland, 20879 USA” kullanıldı (OIE. Manual, 2006).

Primerler: İlk etapta 75-93 (5'-AGC-TTC-GCA-TGA-G-3';P3) ve reverse 438-458 (5'-GCA-ACA-GGT-TTA-TTT-GCC-GGG-3;M21) primerleri,

- İkincisinde 95-119 (5'-ATT-CTT-CCA-CTT-CAA-CAG-TAC-AAG-G-3';P4) ve reverse 394-415 (5'-CAT-TAT-CGT-TAC-ACC-CGA-AAC-C-3'; M38) primerleri kullanıldı (OIE. Manual, 2006).

İzolasyon: İzolasyon için OIE'nin öngördüğü besi yerlerinden % 5-10 fetal sığır serumu bulunan KDM-2 medium kullanıldı. Ortalama 3 hafta (8-16 hafta) 15°C'de inkübe edildi. *R.salmoninarum* küçük, (0.3-1.5 x 0.1-1 µm) Gram pozitif, PAS pozitif, hareketsiz, sıklıkla çift, kısa çomak veya pleomorfik, “Çin yazısına” benzer formdadır. Katalaz pozitif, oksidaz negatiftir (OIE. Manual, 2006).

İdentifikasyon: İzole edilen bakteriler oksidaz ve katalaz testlerine tabii tutulur. Katalaz pozitif ve oksidaz negatif olan identifikasyonu için OIE'nin önerdiği API-Zym kullanıldı (OIE. Manual, 2006; AUSTİN ve AUSTİN, 1999). *R.salmoninarum*'un API Zym'deki profili şu şekildedir.: -+--+--+--+--+--+ (AUSTİN ve AUSTİN, 1999).

DFAT: Enfekte dokularda *R.salmoninarum*'un tespiti için direkt immunofluoresans testi (DFAT) kullanıldı. DFAT testi *R.salmoninarum*'un tespitinde kullanılan oldukça yaygın bir testtir. Bu testte 3 bölüm yer almaktadır. Böbrek ve ovaryum sıvıları lama fikze edildi, işaretli antikorla boyandı, değerlendirildi. DFAT testi sonuçları OIE Manual 2006'da belirtilen standart kriterler baz alınarak yapıldı.

a) Böbrek örnekleri ve ovaryum sıvıları: Böbrek dokularından ve ovaryum sıvılarından frotiler hazırlandı, kurutuldu ve metanol ile yaklaşık 5-10 dakika tespit edildi.

b) Pozitif ve negatif kontrol: DFAT'inde pozitif kontrol olarak *R.salmoninarum* (ATCC 33209) suşu kullanıldı.

c) Preparatlar karanlık ve nemli ortamda muhafaza edildi. Her preparata bir damla (100µL) spesifik FITC-konjugate ilave edildi.

d) Oda ısısında 60 dakika inkübe edildi.

e) Preparatlar PBS (pH=7.1) ile yıkandı.

f) Havada kurutulup ve bir damla mounting medium ilave edilip, lamel ile kapatıldı.

g) Okuma ve yorum: Preparatlar floresan mikraskopta x1000 büyütmede okundu. Önce pozitif ve negatif kontrole bakıldı (OIE. Manual, 2006).

PCR testi: Doku örneklerinden ve ovaryum sıvılarından nested-PCR yapıldı. Nested-PCR'da Chase D.M. ve Pascho R.J. (1998), Pascho R.J., Chase D. ve McKibben C.L. (1998)'de belirtilen metod baz alındı (OIE. Manual, 2006).

a) Primer dizaynı: Bu metoda göre testte iki adet oligonükleotid primer kullanıldı. Primerler *R.salmoninarum*'un p57 protein sekansına göre dizayn ettirilmiştir.

- İlk aşama PCR'da forward 75-93 (5'-AGC-TTC-GCA-TGA-G-3';P3) ve reverse 438-458 (5'-GCA-ACA-GGT-TTA-TTT-GCC-GGG-3;M21) primerleri kullanıldı.

- İkinci aşama PCR'da (nested) forward 95-119 (5'-ATT-CTT-CCA-CTT-CAA-CAG-TAC-AAG-G-3';P4) ve reverse 394-415 (5'-CAT-TAT-CGT-TAC-ACC-CGA-AAC-C-3'; M38) primerleri kullanıldı.

b) DNA ekstraksiyonu ve purifikasyonu için DNA ekstraksiyon Kit'i kullanıldı (DNeasy Tissue Kit, Qiagen). Elde edilen DNA'lar spektrofotometrede ölçüldü (Nanodrop, ND-1000).

- Böbrek Dokusu: Böbreklerden yaklaşık 25-50 mg doku örnekleri 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.

- Ovaryum sıvıları: 25 ml ovaryum sıvısı 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine alındı.

- *R.salmoninarum*:

c) Nükleik asit örneklerinin saflık kontrolü: DNA örnekleri 260 ve 280 nm absorbance hacimde, moleküler biyolojik kalite su konsantrasyonu 0.01 ve 0.1 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Saf DNA oranı A260/A280'de 1.8-2.0 oranında olmasına dikkat edildi.

d) Birinci basamak PCR protokolü:

PCR reaksiyon miksinin hazırlanması:

- Toplam hacim 50 µl olmalı: 10 µl nükleik asit ve 40 µl reaksiyon miksi olmalı. Reaksiyon miksi içerisinde 0.2 mM her bir nükleotid, 50 mM KCL, 10 mM Tris/HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM her bir primer (P3 ve M21) ve Taq polymerase.

- Template DNA hariç tüm reagentlar “Master Mix” tüpüne yerleştirilir.

- PCR tüplerine 10 µl DNA ekstraksiyonları ilave edilir.

- PCR tüpleri termal cyclera yerleştirilir.

- Termal cyclus programı şu şekilde olur: 30 kez denaturasyon 94°C 30 saniye; annealing 60°C 30 saniye; extending 72°C 1 dakika.

e) İkinci basamak PCR protokolü:

Toplam hacim 50 µl olmalı: 1 µl ilk basamakta elde edilen amplifiye DNA ve 49 µl reaksiyon mixi olmalı. Master mix içerisinde 0.2 mM her bir nükleotid, 50 mM KCL, 10 mM Tris/HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM her bir primer (P4 ve M38) ve Taq polymerase.

- Amplifiye DNA hariç tüm reagentlar “Master Mix” tüpüne yerleştirilir.

- PCR tüplerine 1 µl ilk basamak PCR ürünü ilave edilir.

- PCR tüpleri termal cyclera yerleştirilir.

- Termal cyclus programı şu şekilde olur: 30 kez denaturasyon 94°C 30 saniye; annealing 60°C 30 saniye; extending 72°C 1 dakika.

f) Amplifiye DNA'nın görünür hale getirilmesi:

- Yaklaşık 10 µl PCR ürünü jel elektroforezde (% 2 agaroz jel) yürütülür. Her elektroforezde 1 kb DNA ladder (marker)'da olmalıdır.

- Jel boyanması için 5 mg/ml ethidium bromide kullanılır.

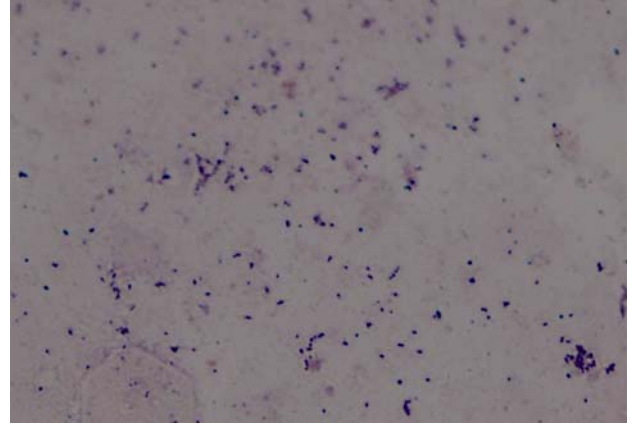
- Jel UV transillumination altında değerlendirilir. *R.salmoninarum* 320 baz çifti olarak tespit edilir (OIE. Manual, 2006).

Antibiyogram: İzole edilen suşların antibiyogram duyarlılık testi ATB-Vet ile yapıldı (OIE. Manual, 2006).

Bulgular

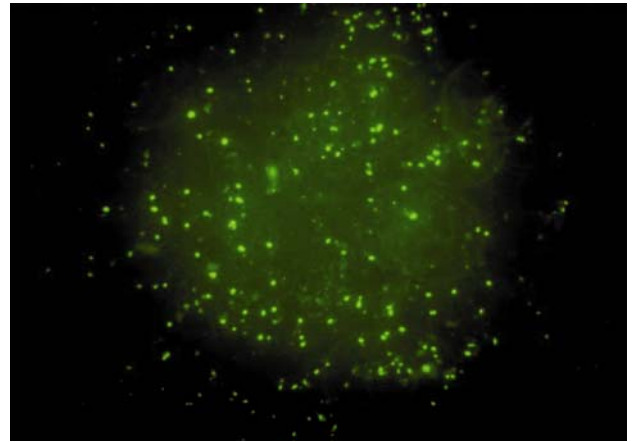
Bu projede *R.salmoninarum* izolasyon ve identifikasyonu için, Kesikköprü Baraj Göleti'nde yer alan 5 adet alabalık işletmesinden toplam 360 adet; Safranbolu'da yer alan 1 adet alabalık işletmesinden 120 adet 6-12 aylık alabalıklardan böbrek örnekleri aseptik koşullarda alındı. Safranbolu'da yer alan 1 adet alabalık işletmesinde 120 adet olgun dişi balıklardan ovaryum sıvısı uygun koşullarda alındı. Toplam 600 adet numune toplandı.

Toplanan örneklerden *R.salmoninarum* izolasyonu için KDM-2 medium kullanıldı. Toplam 600 adet numuneden KDM-2 mediuma aseptik koşullarda ekimler yapıldı ve 15°C'de 4-6 hafta inkübe edildi. Kontrol için standart *R.salmoninarum*'da aynı koşullarda inkübe edildi. Toplam 600 adet böbrek ve ovaryum sıvılarından yapılan hiçbir ekimde *R.salmoninarum* izolasyonu olmadı. *R.salmoninarum* standart suşu ise 48 saat sonra üremeye başladı. API Zym ile yapılan identifikasyonda OIE. Manual 2006'da belirtilen profilin aynısı saptandı (Şekil 1).



Şekil 1. *R.salmoninarum* küçük, (0.3-1.5 x 0.1-1 µm) Gram pozitif, sıklıkla çift, kısa çomak veya pleomorfik, “Çin yazısına” benzer formda mikroskopik görüntüsü.

Bu projede toplanan 600 adet numune işaretli antikorla (fluorescein labeled Affinity purified antibody to *Renibacterium salmoninarum*, Maryland, 20879 USA) DFAT yapıldı. Numunelerin hiçbirinde etkene rastlanılmadı. Pozitif kontrolde ise oldukça kuvvetli fluoresans veren *R.salmoninarum* oldukça yoğun görüldü (Şekil 2).



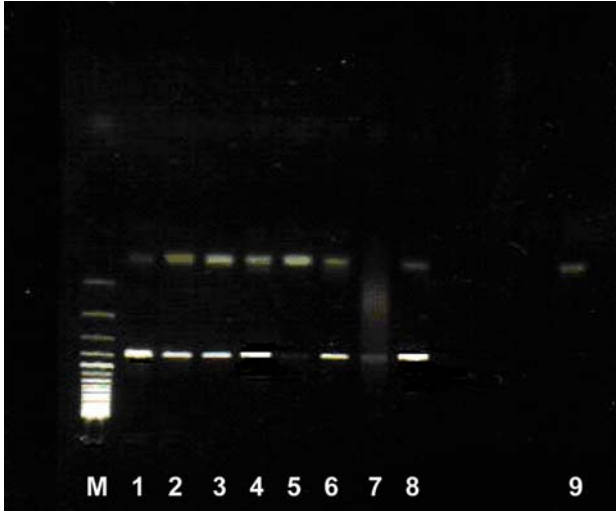
Şekil 2. *R.salmoninarum* standart suşun DFAT ile boyanmış, fluoresans mikroskoptaki görüntüsü.

Nükleik asit örneklerinin saflık kontrolü: DNA örnekleri 260 ve 280 nm absorbance hacimde, moleküler biyolojik kalite su konsantrasyonu 0.01 ve 0.1 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen DNA'lar spektrofotometrede ölçüldü (Nanodrop, ND-1000). Saf DNA oranı A260/A280'de 1.9 oranında bulundu.

Böbreklerden ve ovaryum sıvılarından nested-PCR yapıldı. Nested PCR'da Chase D.M. ve Pascho R.J. (1998), Pascho R.J., Chase D. ve McKibben C.L. (1998)'de belirtilen metod baz alındı (OIE. Manual, 2006). DNA ekstraksiyonu ve purifikasyonu için DNA ekstraksiyon Kit'i kullanıldı (DNeasy Tissue Kit, Qiagen) (OIE. Manual, 2006).

PCR ürünlerinin 10 µl'si % 2'lik agaroz jelde yürütülerek ethidium bromide ile boyanıp, UV transilluminatörde spesifik bantların varlığı izlendi.

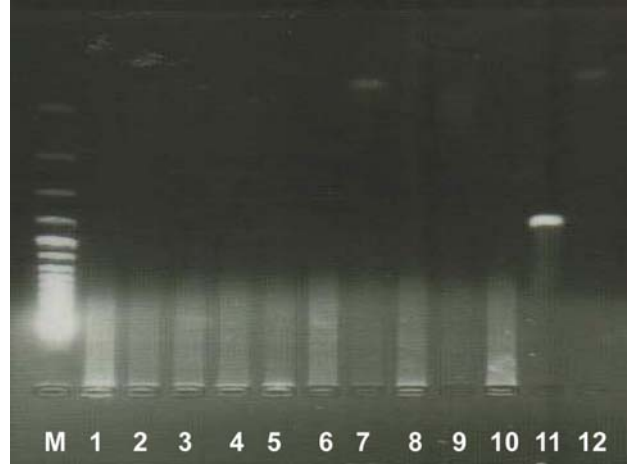
PCR testinin sensitivite ölçümü için içerisinde 1.5×10^2 bakteri/ml bulunan pozitif kontrolün -1'den -7'ye kadar 10 katlı dilusyonları hazırlandı ve hepsi ayrı ayrı PCR işlemine tabii tutuldu. Son dilüsyon basamağında (-7) dahi pozitifliğin saptandığı tespit edildi. Testin sonucunda 150 bakteri/ml'den 15 bakteri/µl'ye kadar etken PCR ile saptanabilmiştir (Şekil 3).



M:Marker, 1:10⁻¹, 2:10⁻², 3:10⁻³, 4:10⁻⁴, 5:10⁻⁵, 6:10⁻⁶, 7:10⁻⁷ (15 bakteri/µl), 8: Saf pozitif kontrol (0.5 Mac Farland: 1.5x10² bakteri/ml), 9: Negatif kontrol

Şekil 3. PCR testinin sensitivitesini ölçmek için yapılan Pozitif kültür ve 10 katlı dilusyonların PCR sonuçları.

Toplam 600 adet numune nested-PCR'a tabii tutuldu. Örneklerin hiçbirinde 320 baz çifti saptanmadı (Şekil 4).



M:Marker, 10 adet alabalık böbrek örneği, 11: Pozitif kontrol, 12: Negatif kontrol.

Şekil 4. Nested-PCR yapılan bazı numunelerin ve pozitif kontrolün oluşturduğu bantlar.

Bu projede Ankara ve Safranbolu'dan toplanan toplam 480 adet böbrek ve 120 adet ovaryum sıvısında konvansiyonel izolasyon, DFAT ve nested-PCR testleri ile *R.salmoninarum* tespit edilememiştir. Bu bölgede Bakteriyel Böbrek Hastalığı'nın olmadığı görülmüştür.

Tartışma ve Sonuç

Bu etkenin teşhisi için DFAT ve Nested-PCR konvansiyonel izolasyon ve identifikasyona göre daha uygun testlerdir. Konvansiyonel izolasyon yönteminde inkübasyon süresi çok uzundur; bu uzun inkübasyon süresi boyunca kontaminasyon riski oldukça artmaktadır. Ayrıca *R.salmoninarum* besi yerinde diğer bilindik bakterilerden farklı tarzda üremektedir. DFAT ve PCR testi oldukça kısa sürede sonuç verebilmekte ve konvansiyonel yöntem göre daha güveniliridir.

Magnusson ve ark. (1994), yaptıkları bir diğer çalışmada, doğal enfekte balıklardan alınan özellikle ovaryum sıvılarında reverse transcription ve nested-PCR bazı yöntemlerde 1-10 bakteriye kadar etkenin saptanabildiğini ve 1-2 gün içinde sonuç alınabildiğini bildirmişlerdir. Bu projede PCR testinin spesivitesini ölçmek için yapılan diluslardan elde edilen PCR sonucunda 15 bakteri/µl'de saptayabildiği görülmüştür. Bu da oldukça düşük bir orandır. Nested-PCR, *R.salmoninarum*'un tespitinde oldukça duyarlı bir metottur.

White ve ark. (1995), çalışmalarında kültür, ELISA ve FAT karşılaştırmışlar. Yüksek dozla enfekte dokularda ELISA ve FAT daha hassas ol-

duğu halde düşük dozla enfekte dokularda bakteriyolojik kültürden daha düşük hassasiyette olduğunu saptamışlardır.

Miriam ve ark. (1997), yaptıkları bir çalışma sonucunda enfekte ovaryum sıvısında çok düşük orandaki *R.salmoninarum*'un da saptanabildiğini ve kültürü yapılamayan veya ölen bakterilerin saptanmasında bu yöntemin güvenle kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Chase ve Pascho (1998), yaptıkları bir çalışmada Salmonid'lerin vücut sıvılarından ve dokularında nükleik asid bazlı testlerle *R.salmoninarum* teşhis etmişlerdir. Nested-PCR yöntemini kullanmışlar, böbreklerden konvansiyonel PCR yönteminden daha çok etken saptamışlardır. Nested-PCR'in yanlış pozitif reaksiyonlar veren ELISA ve FAT tekniklerinden daha hassas olduğunu saptamışlardır. 74 adet doğal enfekte chinook salmonda yaptıkları çalışmada nested-PCR, ELISA ve FAT oranlarını % 61, 47 ve 43 olarak bulmuşlardır. Bu projede herhangi bir izolasyon olmadığı için testler arasında bir karşılaştırılma yapılamamıştır.

Pascho ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada doğal enfekte 103 adet chinook salmon ovaryum sıvıları üzerinde çalışmışlar; ELISA ile % 39'unu , nested-PCR ile de hasta olanların % 100'ünü saptamışlardır.

Jansson (2002), Sueciae'de yaptığı tez çalışmasında 400 adet salmonid balık böbrekleri üzerine ELISA ve kültür yöntemlerini kullanarak *R.salmoninarum* tespit etmeye çalışmış, ancak BKD yönünden hepsini negatif bulmuştur.

Sonuç olarak bu projede Ankara ve Safranbolu'da Bakteriyel Böbrek Hastalığı saptanamamıştır. Vertikal ve horizontal bulaşan *R.salmoninarum*'un neden olduğu bu hastalığın teşhisi yönünden laboratuvarımız alt yapısı uygun hale getirilmiş; konvansiyonel izolasyon ve identifikasyon yanında DFAT ve nested-PCR gibi testlerle alabalıklarda Bakteriyel Böbrek Hastalığı kısa sürede teşhis edilebilir hale gelmiştir. İhbari mecburi hastalıklar arasında yer alan bu hastalık yönünden alabalık işletmelerinin 6 ay aralıklarla yılda iki kez taramaları yapılması gerekmektedir. Bu proje ileride yapılabilecek çalışmalara da bu anlamda ışık tutmaktadır.

Kaynaklar

1. **Austin B, Austin DA**, eds., (1999). *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*, Third Edition. Springer-Praxis, Chichester, UK.
2. **Bruno DW**, (2004). *Prevalance and diagnosis of bacterial kidney disease (BKD) in Scotland between 1990 and 2002*. Dis Aquat Organ. 59 (2), 125-30.
3. **Bullock GL, Herman RL**, (1980). *Bacterial Kidney Disease of Salmonid fishes caused by Renibacterium salmoninarum*. Fish Disease Leaflet 78, U.S. Fish and Wildlife Service, National Fisheries Research Center-Leetown, National Fish Research Laboratory, Box 700, Kearneysville, West Virginia.
4. **Bullock GL, Stuckey HM**, (1975). *Fluorescent antibody identification and detection of the Corynebacterium causing kidney disease in salmonids*. J Fisheries Res Board Can. 32. 2224-2227.
5. **Chase DM, Pascho RJ**, (1998). *Development of a nested polymerase chain reaction for amplification of a sequence of the p57 gene of Renibacterium salmoninarum that provides a highly sensitive method for detection of the bacterium in Salmonid kidney*. Dis Aquat Org. 34. 223-229.
6. **Fryer JL, Lannan CN**, (1993). *The history and current status of Renibacterium salmoninarum causitive agent of bacterial kidney disease in Pacific salmon*. Fisheries Resarch. 17, 15-33.
7. **Hahcı G, İstanbulluoğlu E, Arda M**, (1977). *Bayındır Barajı alabalık yetiştirme istasyonunda görülen bakteriyel böbrek hastalığı ve sağaltımı*. İstanbul Üni Vet Fak Derg 3 (1-2), 22-27.
8. **Jonsson E**, (2002). *Bacterial Kidney Disease in salmonid fish*. PhD Thesis, Acta Universitatis agriculturae Sueciae Veterinaria, vol. 116.
9. **Magnusson HB, Fridjonsson OH, Andresson OS, Benediksdottir E, Gudmundsdottir S, Anderstottir V**, (1994). *Renibacterium salmoninarum, the causitive agent of bacterial kidney disease in salmonid fish, detected by nested reverse transcription-PCR of 16S rRNA sequences*. Appl Environ Microbiol. 60 (12), 4580-4583.
10. **Manual of Diagnostik Tests for Aquatic animals 2006, (OIE)** Bacterial Kidney Disease (*Renibacterium salmoninarum*) Part 2. Section 2.1, Chapter 2.1.11 p:1-19
11. **Miriam A, Griffiths SG, Lovely JE, Lynch WH**, (1997). *PCR and probe-PCR assays to monitor broodstock Atlantic salmon (Salmo salar L.) ovarian fluid and kidney tissue for presence of DNA of the fish pathogen Renibacterium salmoninarum*. J Clin Microbiol. 35(6). 1322-1326.
12. **Ordal EJ, Earp BJ**, (1956). *Cultivation and transmission of etiological agent of kidney disease in salmonid fishes*. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine. 92, 85-88.

13. **Pascho JR, Chase D, McKibben CL**, (1998). *Comparison of the membrane-filtration fluorescent antibody test, the enzyme-linked immunosorbent assay and the polymerase chain reaction to detect Renibacterium salmoninarum in salmonid ovarian fluid*. J Vet Diag Invest. 10, 60-66.
14. **Sarıyüpoğlu M, Muz A, Özdemir Y**, (1985). *Ovacık-Tunceli alabalık yetiştirme istasyonunda oluşan bakteriyel böbrek hastalığı*. Ege Üni Su Ürün Derg. 2 (5-6),71-78.
15. **White MR, Wu CC, Albrechts SR, Wu CC**, (1995). *Comparison of diagnostic tests for bacterial kidney disease in juvenile steelhead trout (Oncorhynchus mykiss)*. J Vet Diag Invest 74, 494-499.