



Kültür Balıklarındaki *Vibrio anguillarum*'un İmmunohistokimyasal Yöntemle Teşhisi*

Tülay AKAYLI, Buket AYDIN

İstanbul Üniversitesi, Su Bilimleri Fakültesi, Balık Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışma ile yurdumuzda kültürü yapılan levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarında görülen *Vibrio (Listonella) anguillarum* kaynaklı enfeksiyonların bakteriyolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak teşhisinin yapılması amaçlanmıştır. Hastalık belirtisi gösteren ağırlıkları 150-220 gr arasında değişen toplam 10 adet levrek balığı ve ağırlıkları 150-200 gr arasında değişen toplam sekiz adet çipura balığı örneği bakteriyolojik ve histopatolojik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Etkenin dokulardaki varlığı ve lokalizasyonu ise immunohistokimyasal yöntem (streptavidin-biotin boyama) kullanılarak tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bakteriyolojik, histolojik ve immunohistokimyasal çalışmalar sonucunda, hastalığın klinik semptomlarını gösteren levrek ve çipura balıklarında vibriosis hastalığının teşhisi yapılmış ve etkenin dokulardaki varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada bakterinin enfekte balık dokularındaki varlığının tespiti amacıyla kullanılan ve indirekt immunoenzimatik yöntemlerden olan streptavidin-biotin boyama yöntemi (StrepABC-IHC) *Listonella anguillarum*'un teşhisinde ilk kez kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Balık, immunohistokimya, *V. anguillarum*, vibriosis

Diagnosis of *Vibrio anguillarum* by Using Immunohistochemical Method in Cultured Fish

Summary: In this study, diagnosis of *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey by using bacteriological, histopathological and immunohistochemical methods was aimed. In total, 10 European sea bass samples weighing between 150-220 g and eight gilt-head sea bream samples weighing between 150-200 g showing disease signs were investigated by using bacteriological and histopathological methods. The presence and the distribution of the agent in the tissues were detected by using immunohistochemical method (streptavidin-biotin staining). As a result of the bacteriological, histological and immunohistochemical studies, the diagnosis of vibriosis was made and the presence of *V. anguillarum* was detected in the tissues of affected European sea bass and gilt-head sea bream samples showing clinical symptoms. Also an immunoenzimatic method, streptavidin-biotin staining method (StrepABC-IHC) was used for the first time in this study for the detection of the presence of this bacterium in the infected fish tissues.

Key words: Fish, immunohistochemistry, *V. anguillarum*, vibriosis

Giriş

Levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura balıkları (*Sparus aurata*) yetiştiricilik koşullarında hızlı büyüyen önemli deniz balığı türlerindedir. Bu nedenle bu iki balık türünün Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi yurdumuzda da yetiştiriciliği başarılı bir şekilde yapılmaktadır (2). *Vibrio* türü bakterilerin neden olduğu vibriosis bakteriyel ve bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalık dünya genelinde kültür balıkçılığı yapan tatlı su ve deniz işletmelerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (3,17). Kültürü yapılan levrek ve çipura gibi de-

niz balıklarında (10,16) vibriosise neden olan en önemli patojen *Vibrio (Listonella) anguillarum*'dur (3,12,13,20). Araştırmacılar daha çok adı geçen patojen bakterinin virülans mekanizmasını aydınlatılması, hızlı tespiti ve neden olduğu hastalığın önlemesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Günümüzde etkenin teşhisinde mikrobiyolojik, serolojik, moleküler, histopatolojik ve immunohistokimyasal teknikler farklı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (3,4,11,12,19).

L. anguillarum ile ilgili yapılan immunohistokimyasal çalışmalar; enfekte balık ve su canlılarının dokularındaki bakteri varlığının teyit edilmesi, dokulardaki lokalizasyonunun belirlenmesi, antijenin dokulardaki yoğunluğunun tespit edilmesi ve patojenin patogenezesinin belirlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır (5,6,8,11). Ayrıca *L. anguillarum*'a karşı probiyotik etkisi olan bakterilerin

Geliş Tarihi/Submission Date : 04.04.2017
Kabul Tarihi/Accepted Date : 17.10.2017

*Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 41630 no'lu proje ile desteklenmiş ve World Aquaculture Adelaide- Australia 2014'te sunulmuştur.

tespit edilmesi ve aşı etkinliğinin belirlenmesine yönelik araştırmalarda da immunohistokimyasal yöntemlerden yararlanılmıştır (1,17). Ülkemizde ise *L. anguillarum* serotip O1 ile deneysel olarak enfekte edilen gökkuşuğu alabalıklarının doku ve organlarındaki antijenlerin varlığını ve dokudaki dağılımının belirlenmesi amacıyla immunohistokimyasal teknikler kullanılmıştır (4).

Bu çalışmada; ülkemizde kültürü yapılan levrek ve çipura balıklarında görülen *V. anguillarum* kaynaklı enfeksiyonların bakteriyolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak teşhisinin yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada kullanılan balık materyali

Bu çalışmada incelenen balık materyalleri Ege Bölgesi'nde bulunan farklı deniz işletmelerinden temin edilmiştir. Hastalık belirtisi gösteren ve ağırlıkları 150-220 g arasında değişen toplam on adet levrek balığı ve ağırlıkları 150-200 g arasında değişen toplam sekiz adet çipura balığı incelenmiştir. İşletme sahiplerinden alınan bilgeye göre en yüksek ölüm oranı hasta levrek balıklarında görülürken (%70), çipuralarda ise ölüm oranının oldukça düşük olduğu (%10) belirtilmiştir.

Bakteriyolojik örnekleme

Hastalık belirtisi gösteren balıkların iç organlarından (dalak, böbrek ve karaciğer) %1.5 NaCl içeren Trypticase Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458, Almanya) besiyerine ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan petriyeler 22-23 °C'de 48-72 saat boyunca inkübe edilmiş ve izole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tespiti için rutin bakteriyolojik metotlar kullanılmıştır (3,7,18). Bu çalışmada referans bakteri (R) olarak İspanyadaki çipura balığından izole edilmiş olan bir adet *V. anguillarum* suşu kullanılmıştır.

Histopatolojik muayene

Histopatolojik inceleme için hasta balık örneklerine ventral, lateral ve operkular insizyon teknikleri uygulanarak iç organları ortaya çıkartılmıştır. Daha sonra balıkların dalak, karaciğer ve böbrek gibi iç organları yanı sıra solungaç ve kas dokularından da makas yardımı ile 0.5-1cm³ büyüklüğünde örnekler alınarak %10'luk formaldehit içerisinde 72 saat fikse edilmiştir. Tespit edilen doku örneklerinden rutin doku işleme prosedürü uygulanarak 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitler Hematoksilen-Eosin boyama yöntemi ile boyanarak histolojik olarak incelenmiştir (9,18).

İmmunohistokimyasal boyama (streptavidin-biotin yöntemi)

Araştırmada immunohistokimyasal metot olarak immunoenzimatik yöntemlerden streptavidin-biotin boyama yöntemi (StrepABC-IHC) kullanılmıştır. Hasta balıkların iç organlarından alınan doku örnekleri formalin ile fikse edildikten sonra rutin doku işleme basamağının ardından parafine gömülmüş ve bu parafin bloklardan 4µm kalınlığında kesitler poly-L-lysin kaplı lam üzerine alınmıştır. Daha sonra kesitler %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 30 dakika bekletilmiş ve sonrasında PBS ile yıkanmıştır. Lamaların üzerine 1:1000 oranında sulandırılmış anti-*V. anguillarum* monoklonal antikorundan (İbt FM -040AX-5) 30µL ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. Kesitlere biotin ile işaretli sekonder antikor eklenmiş, 15 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında PBS ile yıkanan kesitlere streptavidin peroksidaz eklenmiş ve 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Yıkamadan sonra doku kesitleri üzerine 30µL AEC (Three-amino-9-ethylcarbazole) solüsyonu damlatılarak 15-20 dakika nemli ortamda bekletildikten sonra yıkanmıştır. İmmun boyamanın ardından preparatlar Mayer's hematoxylin ile boyanmış, entellan ile kapatılarak ışıklı mikroskop altında incelenmiştir. Antijen-antikor birleşmesinin gerçekleştiği immün pozitif odaklar, normal doku hücrelerinden farklı olarak kahverengi boyanmaları ile tespit edilmiştir (5,16,18).

Bulgular

Klinik ve nekropsi bulguları

Hasta balıklarda dış bakıda genel olarak hareketlerde durgunluk, iştahsızlık, solungaçlarda solgunluk ve vücut yüzeyinde az miktarda pul kaybı gibi benzer klinik bulgular dikkati çekmiş



Şekil 1. (a) Hasta çipura balıklarının yüzgeç diplerinde kanama (b) solungaç filamentlerinde erozyon ve karaciğerde solgunluk



Şekil 2. (a) Levrek balıklarının baş bölgesindeki hemorajik odaklar ve **(b)** karaciğer üzerinde peteşiyel kanama odakları, iç organlarda aşırı yağlanma ve iç organların genel görünümü

tir. Çipura balıklarının pelvik, anal ve pektoral yüzgeç diplerinde hemoraji görülürken (Şekil 1a.) hasta levrek balıklarında ise bu bölgeler yanı sıra baş ve karın bölgesinde yoğun hemorajik alanlar dikkati çekmiştir (Şekil 2a). Çipura balıklarının iç bakışında solungaç filamentlerinde erozyon yanı sıra karaciğerin anemik görünüşü dikkati çekmiştir (Şekil 1b). Levrek balıklarında aşırı solgun karaciğer üzerinde hemorajik odaklar, dalakta büyüme, bağırsakta sarı renkli ve kokulu sıvı birikimi ve iç organlarda yağlanmanın olduğu gözlenmiştir (Şekil 2b).

Tablo 1. Örneklemeler sonucu izole edilen bakteri izolatlarının biyokimyasal özellikleri

Karakterler	1	2	3	4	5	6	7	8	R
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Sitokrom Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TCBS'de üreme	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VAM'da üreme	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sitrat kullanımı	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-galaktosidaz (ONPG)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metil Red	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arjinin dihidrolaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat indirgeme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Üreaz üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz üretimi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nişasta	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukoz, gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glukoz, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinoz, asit	-	+	+	+	+	+	+	+	-
myo-İnositol, asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoz, asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannoz, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltoz, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sukroz, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İnositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salisin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 0 NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 3 NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% 8 NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 10NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37 °C'de büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/129'a duyarlılık	+	+	+	+	+	+	+	+	+

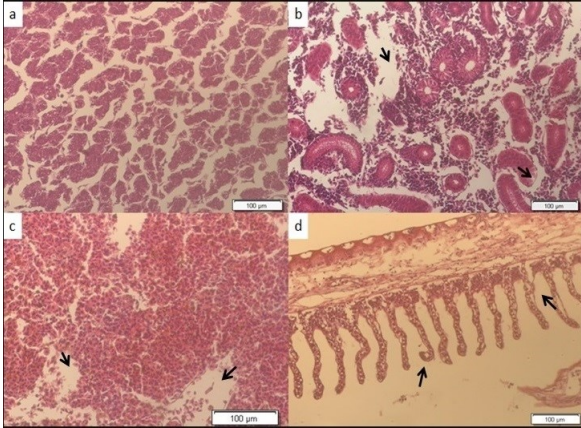
(+): Pozitif reaksiyon, (-): Negatif reaksiyon, S: Sarı, F: Fermantatif, VAM: *Vibrio anguillarum* Medium, TCBS: Tiyosülfat sitrat safra tuzu, O/F: oksidatif/fermentatif

Bakteriyolojik bulgular

%1.5 NaCl içeren TSA besiyerine yapılan ekimlerin inkübasyonu sonucu yuvarlak, konveks, hafif kabarık, parlak ve krem renkli 20 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların 8 tanesi referans suşa benzer şekilde, Gram-negatif karakterli, hareketli bakteriler olmaları, O/F glukoz testinde fermantatif özellik göstermeleri, O/129 vibriostat testine duyarlı olmaları ile genus düzeyinde *Listonella* genusuna mensup olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca izolatlar sitokrom oksidaz, katalaz, indol, β -galaktosidaz (ONPG) gibi testlere pozitif reaksiyon vermeleri yanı sıra yapılan diğer biyokimyasal özellikleri nedeniyle *L. anguillarum* olarak teşhis edilmiştir (Tablo 1).

Histolojik bulgular

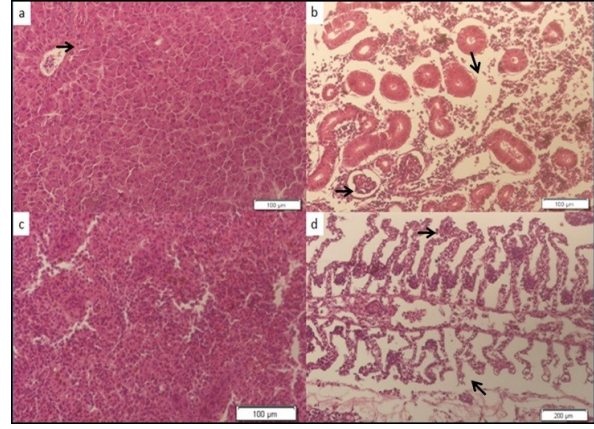
L. anguillarum ile enfekte çipura balıklarının karaciğer hücrelerinde vakuoler dejenerasyon, ve nekroz (Şekil 3a), böbrek dokusunda interstisyel alanda hücre ve matriks kaybı, böbrek tübül-lerinde dejenerasyon (Şekil 3b), dalak dokusunda nekroz (Şekil 3c) ve solungaç lamellalarının epitel hücrelerinde nekroz (Şekil 3d) ve solungaç lamellalarının



Şekil 3. (a) Hasta çipura balığının karaciğer hücrelerinde vakuoler dejenerasyon, (b) böbrek dokusunda interstisyel alanda hücre ve matriks kaybı (oklar), böbrek tübül-lerinde dejenerasyon (c) dalak dokusunda nekroz (d) solungaç lamellalarının epitel hücrelerinde nekroz (oklar).

epitel hücrelerinde nekroz dikkati çekmiştir (Şekil 3d).

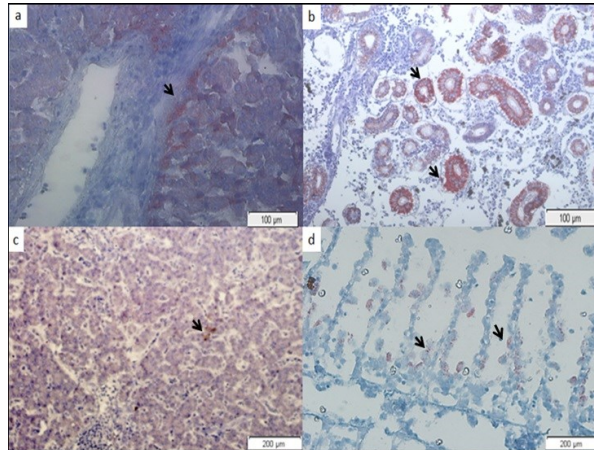
Hasta levrek balıklarının iç organlarının ve solungaçlarının histopatolojik incelemesinde karaciğerde küçük hemorajik odaklar (Şekil 4a), böbrek dokusunda interstisyel alanda hücre ve matriks kaybı, böbrek tübül-lerinde dejenerasyon, melanomakrofaj merkezlerinde hemosiderin depozitleri (Şekil 4b), dalak dokusunda nekroz (Şekil 4c) ve solungaç filamentlerinin yanı sıra solungaç lamellalarının epitel hücrelerinde nekroz tespit edilmiştir (Şekil 4d).



Şekil 4. (a) Levrek balıklarının karaciğerinde küçük hemorajik odaklar (okla gösterilmiştir) (b) böbrek dokusunda interstisyel alanda hücre ve matriks kaybı, periglomeruler ödem (oklar), böbrek tübül-lerinde dejenerasyon (okla gösterilmiştir), melanomakrofaj merkezlerinde hemosiderin depozitleri (c) dalak dokusunda nekroz (d) solungaç lamellalarında nekroz (oklar).

İmmunohistokimyasal bulgular

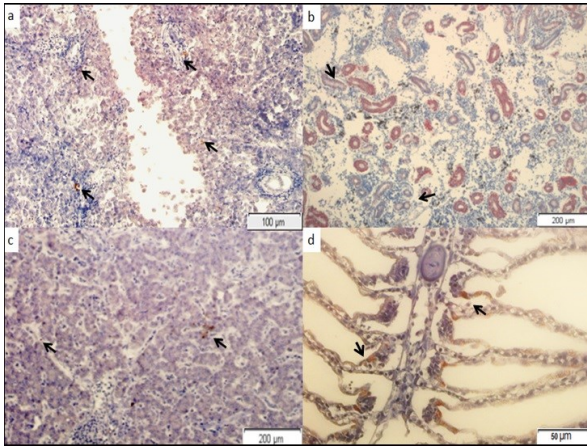
Çalışmada incelenen *V. anguillarum* ile enfekte çipura balıklarının solungaç ve iç organlarının immunohistokimyasal incelemesi sonucunda; karaciğerde bir arterin etrafındaki karaciğer hücrelerinde koyu kahverengi renkte boyanmış immun pozitif odaklar (Şekil 5a), böbrek tübül-lerinde (Şekil 5b), dalak dokusunda sinuslarda (Şekil 5c) ve solungaç filamentlerinde ve özellikle filament diplerinde immun pozitif alanlar görülmüş-tür (Şekil 5d).



Şekil 5. (a) Enfekte çipura balığının karaciğerinde arterin etrafındaki karaciğer hücrelerinde, (b) böbrek tübül-lerinde, (c) dalak dokusunda ve (d) solungaçlarda kahverengi renkte boyanmış immun pozitif odakların görünümü (oklar)

Hasta levrek balıklarının iç organlarının immunohistokimyasal incelemesi sonucunda; karaciğerde sinuzoidlerde, nekrotik alanlar içinde ve

damar etrafında (Şekil 6a), böbrekte tübüllerde (Şekil 6b), dalakta sinuslarda, damar kenarlarında ve nekrotik alanlarda (Şekil 6c), solungaç ve solungaç filamentlerinde antijen antikor birleşmesi sonucu oluşan kahverengi renkteki immun pozitif odaklar gözlenmiştir (Şekil 6d).



Şekil 6. (a) Hasta levrek balığının karaciğer dokusunun nekrotik alanlarında, sinuzoidlerinde ve damar etrafında, (b) böbrek dokusundaki tübüllerde, (c) dalak dokusunun sinuslarında ve (d) solungaçlarda kırmızı renge boyanmış immun pozitif alanlar (oklar)

Tartışma ve Sonuç

Vibrio anguillarum' un neden olduğu klasik vibriosis, deniz ve tatlı sularda yetiştiriciliği yapılan balıklarda yüksek mortalitelere neden olmaktadır (4,7,13,19). Bu çalışma ile Türkiye'de kültürü yapılan levrek ve çipura balığı işletmelerindeki vibriosisin klinik belirtilerini gösteren hasta balık örneklerinden *V. anguillarum* izole ve identifiye edilmiş ve bu patojenin balık dokularında sebep olduğu hasar histopatolojik olarak tespit edilmiş ve streptavidin-biotin boyama yöntemi kullanılarak etkenin immunohistokimyasal olarak teşhisi yapılmıştır.

Hasta levrek ve çipura balıklarının iç organlarının ve solungaçlarının histopatolojik yönden incelenmesi sonucunda diğer araştırmacılara benzer olarak karaciğerde küçük hemorajik odaklar, böbrek tübüllerinde dejenerasyon gibi bulgularda benzerlik gözlenmiştir (14,18). Enfekte çipura balık dokularının histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda ise Korun ve Timur (14)'un bildirdiği gibi böbrek dokusunda interstisyel alanda hücre ve matris kaybı, böbrek tübüllerinde dejenerasyon, dalakta doku kaybı, yanı sıra solungaç lamellalarının yapısal düzeyinde bozulma tespit edilirken incelediğimiz *L. anguillarum* ile yapılan çalışmalarda daha çok

immunokimyasal yöntemlerden olan peroksidaz antiperoksidaz (4,8) ve avidine-biotin-alkaline fosfataz metodu kullanırken (11), Planas ve ark. (17) probiyotik özelliği olan *Roseobacter sp.*'nin kalkan balıklarında görülen *V. anguillarum* enfeksiyonunda enfekte balık dokuları üzerindeki etkisinin belirlenmesinde streptavidin-biotin tekniğini tercih etmişlerdir. Balıkların solungaçlarında yoğun antijen antikor birleşmesine bağlı olarak kahverengi renkte immun pozitif alanların görülmesi diğer araştırmacıların verileri ile benzerlik gösterirken (4,11), Laurencin ve Germon (15) tarafından belirtildiği gibi *L. anguillarum*'un solungaçları birincil giriş yolu olarak kullandığının göstergesi olabileceği düşünülmektedir.

Karaciğer dokularında immun pozitif alanların sinuzoidlerde, nekrotik alanlarda gözlenmesi diğer araştırmacıların hasta gökkuşuğu alabalığı (4) ve kalkan balıklarındaki (12) bulgularına benzerlik göstermesine rağmen bu çalışmada incelenen balıkların karaciğer dokularında özellikle arter etrafındaki hücrelerde yaygın immun pozitif alanlara rastlanılmıştır. Balıkların böbrek dokularında ise immun pozitif alanların daha önce yapılan araştırmaların sonuçlarına benzer şekilde sadece böbrek tübüllerinde yoğun olduğu tespit edilmiştir (4).

Dalak dokularında immunohistokimyasal incelemeler sonucunda levrek ve çipura balıklarının dalak kesitlerinde immun pozitif alanlar Avcı ve ark. (4)' nın yaptığı çalışmanın sonucuna benzer şekilde sinus ve nekrotik alanlarda tespit edilmiştir. Bu çalışmada daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak levrek balıklarına ait dalak dokularında damara yakın bölgelerde immun pozitif reaksiyonlara rastlanırken çipura balığına ait balık dokularında gözlenmemiştir. İki balık türüne ait dalak ve karaciğer dokularında damara yakın bölgelerde de immun pozitif alanlara rastlanması Grisez ve ark. (12)'nin belirttiği gibi bu bakterilerin bağırsağın lamina propria-sından kan yolu ile karaciğer ve diğer iç organlara taşındığının bir göstergesidir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile *L. anguillarum*'un streptavidin-biotin yöntemi ile teşhisi levrek ve çipura balıklarının dokularında ilk kez yapılmış olup elde edilen verilerin bu yöntemin immun hassasiyetinin yüksek olması nedeniyle bu bakterinin tanısında güvenilirliğinin de yüksek olabileceğini göstermiştir. Dolayısı ile çalışmanın sonuçları *V. anguillarum* kaynaklı enfeksiyonların teşhisinde diğer immun yöntemlere göre daha yaygın kullanımının önünü açacaktır.

Kaynaklar

1. Afonso A, Gomes S, Silva J, Marques F, Henrique M. Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. *Fish Shellfish Immunol* 2005; 19 (1): 1-16.
2. Albaz A ed. Su Ürünleri Yetiştiriciliği. İkinci Baskı. Bornova-İzmir: Alp Yayınları, 2005; s. 576.
3. Austin B, Austin A. Vibrionaceae representatives. Austin B, Austin A. eds. In: *Bacterial Fish Pathogens: Diseased of Farmed and Wild Fish*. Third Edition. Chichester: Praxis Publ, 1999; pp. 369-89.
4. Avcı H, Birincioğlu S, Çağırğan H. Pathological and immunohistochemical investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) experimentally infected with *Vibrio anguillarum*. *Rev Med Vet* 2012; 163 (1): 31-9.
5. Bancroft JD ed. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Seventh Edition. Nottingham: Elsevier, 2008; p. 654.
6. Bergh O. Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. *Fish Dis* 1995; 18(1): 31-9.
7. Buller NB, ed. *Bacteria from Fish and other Aquatic Animals: A practical Identification Manual*. UK: CABI Publishing, 2004; p. 361.
8. Chaves-Pozo E, Pelegrin P, Garcia-Ayala J, Garcia-Ayala A, Mulero V, Meseguer J. Acidophilic granulocytes of the marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.) produce interleukin-1b following infection with *Vibrio anguillarum*. *Cell Tissue Res* 2004; 316(2): 189-95.
9. Culling CFA. *Handbook of Histopathological Techniques*. Culling CFA ed. Second Edition. London: Butterworth Co Ltd, 1963; p. 683.
10. Çağırğan H. A study on diagnosis and treatment of bacterial diseases in cultured sea bass (*Sparus aurata* L.) and sea bream (*Dicentrarchus labrax* L.), Doktora tezi, Ege Üniv Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1993; s. 117.
11. Engelsens AR, Sandlund N, Fiksdal IU, Bergh O. Immunohistochemistry of atlantic cod larvae *Gadus morhua* experimentally challenged with *Vibrio anguillarum*. *Dis Aqua Org* 2008; 80(1): 13-20.
12. Grisez L, Chair M, Sorgeloos P, Ollevier F. Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Dis Aqua Org* 1996; 26(3): 181-87.
13. Knappskog DH, Rødseth OM, Slinde E, Endersen C. Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from vibriosis. *Fish Dis* 1993; 16(4): 327-38.
14. Korun J, Timur G. Marine vibrios associated with diseases sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *J Fishscicom* 2008; 2(1), 66-76.
15. Laurencin, FB, Germon E. Experimental infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., by dipping in suspension of *Vibrio anguillarum*: Ways of bacterial penetration; influence of temperature and salinity. *Aquaculture* 1987; 67 (1-2): 203-72.
16. Öztay F. The functional morphology of the pulmonary neuroendocrine cells in the lung of larval and adult *Rana ridibunda* (Amphibia-Anura). *IUFS J Biol* 2008; 67(2): 145-51.
17. Planas M, Perez-Lorenzo M, Hjelm M, Gram L, Fiksdal IU, Bergh O, Pintado J. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio (Listonella) anguillarum* infections in Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 2006; 255(1-4): 323-33.
18. Timur G, Timur M. eds. *Balık Hastalıkları*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayını, 2003; s. 519.
19. Toranzo AE, Barj JL. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Dis Aqua Org* 1990; 9 (1): 73-82.
20. Toranzo AE, Magarinos B, Romalde JL. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 2005; 246 (1-4): 31-67.

Sorumlu Yazar:

Prof. Dr. Tülay Akaylı
 İstanbul Üniversitesi, Su Bilimleri Fakültesi,
 Balık Hastalıkları Anabilim Dalı.
 İstanbul-TÜRKİYE
 Tel: +90 212 4555700 (Dahili: 16473)
 Fax: 0212-5140369
 E-posta: takayli@istanbul.edu.tr