

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YERİNE KALAN
DOKTORA TEZİ

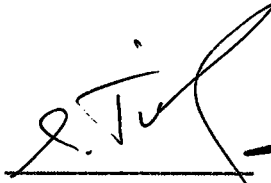
GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*) PATOJEN
BAKTERİ *Yersinia ruckeri* 'ye KARŞI ANTİKOR ÜRETİMİ VE TESPİTİ
ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA

AYŞEGÜL KUBİLAY

DOKTORA TEZİ

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14.04.1997 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Gülşen TİMUR
(Danışman)



Prof. Dr. M. Yaşar AKSOYLAR
(Jüri Üyesi)



Prof. Dr. Mustafa SARIEYÜOĞLU
(Jüri Üyesi)

ÖZET

Gökkuşığı alabalıklarında *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunizasyonu takiben oluşan antikor reaksiyonunun lam aglutinasyon, mikroaglutinasyon, pasif hemaglutinasyon, immunodiffüzyon, indirekt fluoresans antikor tekniği (IFAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELİSA) gibi çeşitli serolojik testlerle tayini üzerinde bir araştırma yürütülmüştür.

Freund's incomplete adjuvant veya PBS içinde *Yersinia ruckeri* bakterininin intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonu ile immunizasyonunu takiben oluşan humoral immunité seviyesi 20 haftalık periyod süresince çalışılmıştır. Deneme grupları ve kontrol grubu için 20 balıktan oluşan gruplar kullanılmıştır. Kuvvetlendirici enjeksiyon PBS içinde *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen gruba uygulanmıştır. Denemeler 11-12°C çevre sıcaklığında yürütülmüştür.

Patojen *Yersinia ruckeri* bakterisinin gökkuşığı alabalıklarına intramuscular (i.m) enjeksiyonu takiben oluşan humoral immunité seviyesinde 13 haftalık periyodda çalışılmıştır. Deneme grubu için 20 balıktan oluşan grup kullanılmıştır. Deneme 11-12°C çevre sıcaklığında yürütülmüştür.

Gökkuşığı alabalıklarının gerek *Yersinia ruckeri* bakterini ile intraperitoneal immunizasyonu ve gerekse patojen *Yersinia ruckeri* bakterisinin intramuscular enjeksiyonu ile oluşan enfeksiyon balıkların kan sirkülasyonunda yüksek antikor titresi oluşturmuştur. Bu yüksek antikor titresi deneme periyodu süresince (20 hafta) devam etmiştir.

İmmunizasyondan bir hafta sonra *Yersinia ruckeri* bakterinine karşı humoral antikor üretimi görülmemiştir. İmmunizasyondan 2-3 hafta sonra mikroaglutinasyon pasif hemaglutinasyon ve ELİSA testleri ile düşük antikor titresi, lam aglutinasyon ile zayıf aglutinasyon, IFAT testi ile zayıf fakat belirgin fluoresans tespit edilmiştir. Humoral antikor üretimi 5-6 hafta sonra artmış ve 19-20 hafta bu seviyeyi korumuştur.

Formalinle öldürülmüş *Yersinia ruckeri* bakterisi içeren Freund's incomplete adjuvant veya PBS enjeksiyonu ile immunize edilen balıkların tümünde 35 gün sonra patojen bakteri enjeksiyonuna karşı tam bir koruma oluşmuştur.

ABSTRACT

A Study On Antibody Production And Detection In Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Against Pathogen *Yersinia ruckeri*

An investigation was carried out in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to detect antibody response following immunization with *Yersinia ruckeri* bacterins using by various serological techniques such as slide agglutination, microagglutination, passive haemagglutination, immunodiffusion, indirect fluorescent antibody technique (IFAT), enzyme-linked immunoserbent assay (ELISA).

The level of humoral immunity in rainbow trout following immunization by intraperitoneal (i.p.) injection *Yersinia ruckeri* bacterin in Freund's incomplete adjuvant or PBS was studied a period of 20 weeks. Groups of 20 fish were used for the experimental and the control groups. A booster injection was carried out for the group of immunized fish with the *Yersinia ruckeri* bakterin in PBS. Experiments were carried out at 11-12°C environmental temprature.

The level of humoral immunity in rainbow trout following intramuscular (i.m.) injection of pathogen *Yersinia ruckeri* bakteria was also studied in the period of 13 weeks. Groups of 20 fish were used for the experimental group . Experiment was carried out at 11-12°C enviromental temprature.

Both immunization by i.p. injection of *Yersinia ruckeri* bacterins and infection by i.m. injection of pathogen *Yersinia ruckeri* bakteria induced high antibody titres in the circulating blood of rainbow trout which continued for the period of experiments (20 weeks).

No production of humoral antibody was observed one week after immunization against *Yersinia ruckeri* bakterin. Low antibody titres were detected by microagglutination, passive haemagglutination and ELISA, slight agglutination by slide agglutination and faint and distinct fluorecence by IFAT, 2-3 weeks after immunization. Humoral antibody production was improved after 5-6 weeks and persisted up to 19-20 weeks.

All fish were protected against experimental challenge 35 days after immunization by formalin killed *Yersinia ruckeri* bakteria in Freund's incomplete adjuvant or in PBS.

ÖNSÖZ

Ülkemizde son yıllarda gelişme gösteren kültür balıkçılığı umut verici bir düzeye erişmiştir. Tatlı sularda alabalık ve sazan, denizlerde çipura ve levrek her iki ortamda salmon üretimine dayalı işletmeler hızla çoğalmaktadır. Kültür balıkçılığında hızlı gelişme beraberinde enfeksiyöz hastalıkları ortaya çıkarmıştır. Uygun ve zamanında bir tedavi uygulanmadığı takdirde balık işletmelerinde büyük ekonomik kayıplarla karşı karşıya gelinir. Bu nedenle balık hastalıkları ülkemizde de son yıllarda büyük önem kazanmıştır. *Yersinia ruckeri* 'nin neden olduğu enterik kızıl ağız hastalığı yurdumuzda 1991 yılında saptanmış ve daha sonra alabalık çiftliklerinde yaygınlaşmasıyla ekonomik kayıplara neden olmuştur. Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde geleneksel bakteriyolojik ve histopatolojik yöntemler uygulanmaktadır. İnsan ve veteriner hekimliğinde rutin olarak yıllardır kullanılan serolojik testler balık hastalıklarında son 20 yıldır ilerleme kaydetmiştir.

Bu araştırmada gökkuşağı alabalıklarının immunizasyonu için inaktive edilmiş *Yersinia ruckeri* antijeni intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. İmmunize edilen balıkların serumlarında antikor oluşumu; aglutinasyon, mikroaglutinasyon, pasif hemaglutinasyon, immunodiffüzyon, indirekt fluoresans antikor tekniği (IFAT) ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gibi serolojik testler ile tespit edilmiştir.

Bu konuyu bana öneren ve araştırmayı yöneten tez danışmanım Sayın Hocam, Prof. Dr. Gülşen Timur'a, çalışmalarımı yakından takip ederek yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam, Prof. Dr. Metin Timur'a, deneysel çalışmalarına imkan sağlayan Fakültemiz Dekanı, Sayın Hocam, Prof. Dr. Yaşar Aksoylar'a, IFAT çalışmalarında yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi, Doç. Dr. Tümer Vural'a, ELISA, Pasif Hemaglutinasyon, İmmunodiffüzyon testlerini gerçekleştirmemde ve sonuçlarını değerlendirmemde yardımcı olan, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Ziya Alkan, Doç. Dr. Yusuf Özbek'e ve tüm Parazitoloji Personeline, Antijenin sonike edilmesinde her türlü fikir ve yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr. Hakan Yardımcı'ya, eriyik antijenlerin protein değerlerinin saptanmasında yardımcı olan Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyelerinden Yard. Doç. Mehmet Akdoğan'a en içten teşekkürlerimi arz ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
RESİMLER LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1. Gökkuşluğu Alabalığının Sistematikteki Yeri ve Morfolojik Özellikleri	3
2.2. Balıklarda İmmunite (Bağışıklık)	4
2.2.1. Primer (Doğal) İmmunite	5
2.2.2. Adaptive (Kazanılmış) İmmunite	6
2.2.2.1. Humoral İmmunite	6
2.2.2.2. Cell Mediated Immunity (CMI)	7
2.3. İmmun Yanıtta Rol Oynayan Organlar	8
2.4. İmmunoglobulinler (Antikorlar)	9
2.5 Antikor Üretimi ve Üretimi Etkileyen Faktörler	10
2.5.1 Suyun Sıcaklığı	11
2.5.2. Balığın Vücut Ağırlığı	12
2.5.3 Antijenin Fiziksel Durumu	12
2.5.4. Antijenin Dozu	13
2.5.5. Antijenin Veriliş Yöntemleri	13
2.5.6. Antijenik Kompetisyon (Antijenik Rekabet)	13
2.5.7. Adjuvantlar ve İmmunostimulanlar	14
2.5.8. Mevsimsel Etkiler	14
2.5.9. İmmun Yanıtı Baskılayan Faktörler	14
2.5.10. Beslenmenin Etkisi	15
2.6. Antijen	15
2.7. Enfeksiyöz Hastalıklarda Kullanılan Serolojik Yöntemler	16
2.7.1. Aglutinasyon ve Hemaglutinasyon	17
2.7.2. İmmunodiffüzyon ve İmmunoelektroforezis	19
2.7.3. Floresans Antikor Testi (FAT)	21

2.7.4. Enzyme - linked Immunosorbent Assay (ELISA)	22
2.8. Enterik Kızıl Ağız Hastalığı (ERM)	24
2.8.1. Hastalığın Tarihçesi	24
2.8.2. Epizootiyoloji ve Patogenezis	25
2.8.2.1. ERM Hastalığının Konakçıları	25
2.8.2.2. ERM Hastalığının Rezervuarları ve Taşınması	26
2.8.3. ERM Hastalığının İnkübasyon Süresi	27
2.8.4. ERM Hastalığının Klinik ve Otopsi Bulguları	27
2.8.5. Histopatolojik Değişiklikler	28
2.8.6. Morbitide ve Mortalite	28
2.8.7. Doğal Kazanılan İmmünite ve Nükseden Enfeksiyonlar	29
2.8.8. Teşhis	29
2.8.9. ERM' nin Kontrolü	31
2.8.9.1. Tedavi	31
2.8.9.2. Aşılar	32
2.9. <i>Yersinia ruckeri</i>	35
2.9.1. Etiyoloji	35
2.9.1.1. Klasifikasyon	35
2.9.1.2. Morfolojik Özellikleri	35
2.9.1.3. Koloni Morfolojisi	36
2.9.1.4. Üreme İhtiyaçları	36
2.9.1.5. Antijenite ve Serolojik Özellikleri	36
2.9.1.6. Biyokimyasal Karakterleri	37
2.9.1.7. Patojenite ve Virülens	38
3. MATERYAL VE METOD	41
3.1. Materyal	40
3.1.1. Balık Materyali	40
3.1.2. Deneysel Enfeksiyon ve İmmünizasyon Uygulama Yeri	40
3.1.3. Serolojik Testlerin Yapıldığı Kuruluşlar ve Laboratuvarlar	40
3.1.4. Uygulama Tankları ve Uygulamada Kullanılan Su	41
3.1.5. Yem	42

3.1.6. Denemede Kullanılan <i>Yersinia ruckeri</i> Suşu	42
3.1.7. İmmunizasyon Çalışmalarında Kullanılan Adjuvantlar	42
3.1.8. ELİSA ve IFAT Serolojik Testlerinde Kullanılan Antiserum	42
3.1.9. Konjugatlar	42
3.2. Metod	43
3.2.1. Gökkuşığı Alabalıklarında <i>Yersinia ruckeri</i> İnokulatının Hazırlanması ve Deneysel Olarak Enfeksiyon Oluşturma	43
3.2.2. Enfekte Balıklardan Bakterilerin Re-İzolasyonu, Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Tespiti	43
3.2.3. Enfekte Balıkların Klinik , Otopsi ve Histopatolojik Muayenesi	44
3.2.4. Antikor Üretimi İçin Bakterin hazırlanması ve İmmunizasyon Uygulamaları	44
3.2.4.1. Bakterin Hazırlanması	44
3.2.4.2. İmmunizasyon Uygulamaları	45
3.2.5. Pozitif Kontrol Serumun Hazırlanması	46
3.2.6. İmmun Balıklara Patojen Bakteri Uygulanması (Challenge)	46
3.2.7. Serum Elde Edilmesi	47
3.2.8. İmmun Alabalık Serumlarında Antikor Tespiti İçin Serolojik Testler	47
3.2.8.1. Aglutinasyon Testi	47
3.2.8.1.1. Aglutinasyon Testi İçin Antijen Hazırlanması	47
3.2.8.1.2. Lam Aglutinasyon Testinin Uygulanması	48
3.2.8.1.3. Mikroaglutinasyon Testinin Uygulanması	48
3.2.8.2. Pasif Hemaglutinasyon Testi	49
3.2.8.2.1. Pasif Hemaglutinasyon Testi İçin Antijen Hazırlama.	49
3.2.8.2.2. Pasif Hemaglutinasyon Testinin Uygulanması	49
3.2.8.3. İmmunodiffüzyon Testi	50
3.2.8.3.1. İmmünodiffüzyon Testi İçin Antijen Hazırlama.	50
3.2.8.3.2. İmmunodiffüzyon Testinin Uygulanması	51
3.2.8.4. İndirekt Floresans Antikor Tekniği (IFAT)	52
3.2.8.4.1. İndirekt Floresans Antikor Tekniği İçin Antijen Hazırlama.	52

3.2.8.4.2. İndirekt Floresans Antikor Tekniğinin Uygulanması	52
3.2.8.5. Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	53
3.2.8.5.1. ELISA Tekniği İçin Antijen Hazırlama.	53
3.2.8.5.2. Antijen, Antiserum Konjugat Titrasyonu	54
3.2.8.5.3. ELISA Testi İçin Antijen Kaplı Plakların Hazırlanması	54
3.2.8.5.4. ELISA Testinin Uygulanması	55
3.2.8.5.4.1. Testin Uygulanması	56
3.2.8.5.4.2. Sonuçların Okunması ve Değerlendirilmesi	57
4- BULGULAR	58
4.1. <i>Yersinia ruckeri</i> Suşu Re-İzolatının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular	58
4.2. Deneysel Enfeksiyon Oluşturan Balıklarda Otopsi ve Histopatoloji Bulguları	63
4.3. Enfekte Edilen Balıklarda ERM' nin İnkübasyon Süresi ve Mortalitesi İle İlgili Bulgular	71
4.4. İmmun Balıklara Patojen Bakteri Verilerek (Challenge) Koruyucu İmmunitenin Kontrolü	72
4.5. Antikor Tespitinde Kullanılan Serolojik Yöntemlerle İlgili Bulgular	73
4.5.1. Lam Aglutinasyon Testi İle İlgili Bulgular	73
4.5.1.1. <i>Yersinia ruckeri</i> Bakterini ile İmmunize Edilen Alabalık Serumları ile İlgili Lam Aglutinasyon Bulguları	75
4.5.1.2. Deneysel Olarak Patojen Bakteri ile Enfekte Edilen Alabalıkların Serumlarıyla İlgili Lam Aglutinasyon Bulguları	76
4.5.2. Mikroaglutinasyon Testi ile İlgili Bulgular	76
4.5.2.1. <i>Yersinia ruckeri</i> Bakterini İle İmmunize Edilen Alabalık Serumlarıyla İlgili Mikroaglutinasyon Bulguları	77
4.5.2.2. Deneysel Olarak Patojen Bakteri İle Enfekte Edilen Alabalık serumları İle İlgili Mikroaglutinasyon Bulguları	79
4.5.3. Pasif Hemaglutinasyon Testi İle İlgili Bulgular	80
4.5.3.1. <i>Yersinia ruckeri</i> Bakterini İle İmmunize Edilen Alabalık Serumlarıyla İlgili Pasif Hemaglutinasyon Test Bulguları	81

4.5.3.2. Deneysel Olarak Patojen Bakteri ile Enfekte Edilen Alabalık Serumları ile İlgili Pasif Hemaglutinasyon Test Bulguları	83
4.5.4. İmmunodiffüzyon (ID) Testi ile İlgili Bulgular	84
4.5.5. İndirekt Floresans Antikor Testi (IFAT) İlgili Bulgular	85
4.5.5.1. <i>Yersinia ruckeri</i> Bakterini İle İmmunize Edilen Alabalık Serumlarına Ait IFAT Testi ile Bulgular	86
4.5.5.2. Deneysel Olarak Patojen Bakteri ile Enfekte Edilen Alabalıkların Serumlarıyla İlgili IFAT Test Bulguları	87
4.5.6. Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Testi ile İlgili Bulgular	88
4.5.6.1. <i>Yersinia ruckeri</i> Bakterini İle İmmunize Edilen Alabalık Serumlarına Ait ELİSA Testi ile İlgili Bulgular	90
4.5.6.2. Deneysel Olarak Patojen Bakteri ile Enfekte Edilen Alabalıkların Serumlarıyla İlgili Test Bulguları	92
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	93
KAYNAKLAR	100
ÖZGEÇMİŞ	118

ÇİZELGELER LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 4.1a. <i>Yersinia ruckeri</i> bakterisinin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile ilgili bulgular (21°C' de 48 saat inkübasyon)	61
Çizelge 4.1b. <i>Yersinia ruckeri</i> 'nin antibiyotiklere duyarlılığı	62
Çizelge 4.3. Enfeksiyondan ölen gökkuşağı alabalıklarının günlere göre dağılımı	72
Çizelge 4.4. Patojen bakteri verilen (challenge) immun gökkuşağı alabalıklarında hayatta kalma yüzdeleri	73
Çizelge 4.5.1.1. Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren <i>Yersinia ruckeri</i> antijeni ile immunize edilen alabalık gruplarının serumlarıyla yapılan lam aglutinasyon test sonuçları	75
Çizelge 4.5.1.2. Deneysel olarak oluşturulan enfeksiyondan hayatta kalan alabalıkların serumlarına ait deneme süresince haftalık lam aglutinasyon sonuçları	76
Çizelge 4.5.2.1. Adjuvantlı ve PBS'li bakterin ile immunize edilen balıkların immunizasyondan sonraki haftalarda mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri	78
Çizelge 4.5.2.2. Deneysel olarak enfekte edilen balıklardan hayatta kalanlarının serumlarındaki mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri	79
Çizelge 4.5.3.1. Freund's incomplete adjuvant ve PBS içiren <i>Yersinia ruckeri</i> bakterini ile immunize edilen balıkların pasif hemaglutinasyon testi ile belirlenen haftalık antikor titreleri	82
Çizelge 4.5.3.2. Deneysel olarak patojen <i>Yersinia ruckeri</i> ile enfekte edilen balıkların serumlarındaki antikor titresine ait pasif hemaglutinasyon test sonuçları	83
Çizelge 4.5.5.1. Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren <i>Yersinia ruckeri</i> bakterini ile immunize edilen alabalık gruplarının serumlarına ait haftalık IFAT sonuçları	87
Çizelge 4.5.5.2. Deneysel olarak patojen <i>Yersinia ruckeri</i> ile enfekte edilen alabalıkların serumlarındaki antikor seviyelerine ait IFAT test	

sonuçları (Deneme süresince)	88
Çizelge 4.5.6.1. Freund's incomplete adjuvant PBS İçeren <i>Yersinia ruckeri</i> bakterini ile immunize edilen alabalıkların ELİSA testi ile belirlenen haftalık antikor titreleri	91
Çizelge 4.5.6.2. Deneysel olarak patojen <i>Yersinia ruckeri</i> ile enfekte edilen alabalıkların serumlarındaki antikor seviyelerine ait haftalık ELİSA test sonuçları	92



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 4.4. Patojen bakteri verilen (challenge) immun ve kontrol grubu balıklarda hayatta kalma yüzdesi	73
Şekil 4.5.2.1. Freund's incomplete adjuvanlı ve PBS'li bakterinin i.p. enjeksiyonundan sonra alabalıkların kan serumunda oluşan aglutinin titrelerinin (Log_2) haftalık dağılımı	79
Şekil 4.5.3.1. Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren <i>Yersinia ruckeri</i> bakterini ile immunize edilen balıkların pasif hemaglutinasyon testi ile belirlenen antikorlar titrelerinin haftalık dağılımı	83
Şekil 4.5.6.1 Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren <i>Yersinia ruckeri</i> bakterini ile immunize edilen alabalıkların kan serumunda oluşan antikor titrelerinin ELISA testine göre haftalık dağılımı	92

RESİMLER LİSTESİ

	Sayfa
Resim 1. Denemede kullanılan sirküler fiber tanklar.	41
Resim 2. İntraperitoneal enjeksiyonunun yapıldığı bölge	45
Resim 3. <i>Yersinia ruckeri</i> re-izolatının TSA vasatındaki koloni yapısı	58
Resim 4. <i>Yersinia ruckeri</i> suşunun SWM ortamındaki yeşil renkli kolonileri ve koloniler etrafındaki hidroliz zonu.	59
Resim 5. Gram negatif <i>Yersinia ruckeri</i> bakterisi	60
Resim 6. <i>Yersinia ruckeri</i> 'nin duyarlı olduğu antibiyotiklerden üçüne (CTX, CEP, CXM) karşı antibiyogram test sonucu	63
Resim 7. Patojen bakteri enjeksiyonundan bir kaç saat sonra renkleri koyulaşmış alabalıklar.	64
Resim 8. Deneysel olarak enfekte edilen alabalığın yüzgeçlerinde, gözlerinde ve enjeksiyon bölgesinde (dorsal yüzgecin hemen altında) hemorajiler	64
Resim 9. Deneysel olarak enfekte edilen alabalığın yüzgeçlerinde ve anüs bölgesinde hemorajiler	65
Resim 10. Deneysel olarak enfekte edilen alabalığın ağız bölgesinde alt ve üst çenede, dil üzerinde hemorajik bölgeler	65
Resim 11. Pilorik sekalarda ve yağ dokusunda peteşiyal hemoraji	66
Resim 12. Hava kesesinde hemoraji	66
Resim 13. Karaciğerde ekimoze şeklinde hemorajiler, müköz bir sıvı ile dolu hemorajik bağırsak	67
Resim 14. Gonadlarda hemoraji ve dalakta büyüme	67
Resim 15. Nekrotik karaciğer hücreleri ve selüler infiltrasyon (lökosit ve eritrosit)	68
Resim 16. Karaciğer hücrelerinde dejenerasyon, nekroz ve kapillar hiperemi	69
Resim 17. Karaciğer parankim dokusunda ekimoz	69
Resim 18. Renal doku ve interrenal lenfoid dokuda nekroz	70
Resim 19. Barsak mukoza epitelyumunda dökülme ve barsak duvarında selüler infiltrasyon	70
Resim 20. Dalakta hemapoietik hücrelerde boşalma.	71

Resim 21. <i>Yersinia ruckeri</i> suşu ile hazırlanan aglutinasyon antijeni ile immün test serumlarının oluşturduğu lam aglutinasyon testinde oluşan beyaz çökelekler (çıplak gözle).	74
Resim 22. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antijenin oluşturduğu kümelerin ışık mikroskopunda görünümü. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antijenin oluşturduğu kümelerin ışık mikroskopunda görünümü	74
Resim 23. Pozitif ve negatif test serumlarını içeren microwell aglutinasyon plate çukurları	77
Resim 24. Microwell aglutinasyon plate çukurlarında pozitif ve negatif pasif hemaglutinasyon reaksiyonu	80
Resim 25. Kontrol plate'nin tüm çukurlarında oluşan negatif pasif hemaglutinasyon reaksiyon	81
Resim 26. Lam üzerinde immunodiffüzyon testi	84
Resim 27. FITC ile işaretli anti-tavşan immunoglobulin, salmon antikoruna karşı oluşturulmuş ticari polyclonal tavşan antiserumu ve <i>Yersinia ruckeri</i> antijen-antikor kompleksinin fluoresans mikroskopta görünümü	86
Resim 28. ELİSA testine ait en iyi pozitif reaksiyon oluşturduğu antijen protein değeri antiserum (1/400) ve konjugat dilüsyonlarının (1/1000) tespit edildiği microwell plate (Yeşil renk pozitif reaksiyon)	89
Resim 29. ELİSA testinin uygulandığı microwell plate'de renk reaksiyonları (Yeşil renk pozitif reaksiyonu gösterir)	90

1. GİRİŞ

Akuakültür dünyanın birçok ülkesinde son 20 yıldan beri çok hızlı gelişen bir endüstri haline gelmiştir. Bir çok gelişmiş ülkede balıkların intensif olarak yüksek popülasyon yoğunluğunda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu nedenle enfeksiyöz hastalıklar başarılı bir balık yetiştiriciliği için büyük bir tehlike oluşturur (Ellis 1988).

İnsan beslenmesinde büyük bir yeri olan balık geleneksel olarak deniz ve iç sulardan avlanan bir besin kaynağıdır. On dokuzuncu yüzyılın başlarından itibaren hızlı artan dünya nüfusuna paralel olarak ortaya çıkan çevre sorunları ve yoğun avlama balık üretiminde yetersizliğe ve dolayısıyla da kültür balıkçılığında hızlı gelişmelere neden olmuştur (Timur 1985). Yurdumuzda 1970'li yıllarda gökkuşağı alabalığı ile başlayan kültür balıkçılığı son yıllarda denizlerde yapılan çipura ve levrek yetiştiriciliği ile çok geniş boyutlar kazanmıştır (Alpbaz 1990). Yurdumuzdaki kültür balıkçılığının gelişimine paralel olarak bu işletmelerde bakteriyel (Baran vd. 1980, Timur ve Timur 1985, Ergüven ve Soylu 1988, Timur and Timur 1991, Çağrgan and Yürekli Türk 1991, Diler ve Kubilay 1996, Timur vd. 1996 a,b.) viral (Timur 1991, Timur vd.1993b) ve paraziter (Timur vd. 1993a) hastalıklar da görülmeye başlamıştır.

Ekonomik olarak ağır kayıplara neden olan balık hastalıkları konusundaki çalışmalar da dünyanın diğer ülkelerinde olduğu gibi yurdumuzda da son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde bakteriyolojik yöntemler yanısıra histopatolojik yöntemler uygulanmaktadır (Bullock 1989). Bugün bu ana teknik yöntemlerin yanısıra gerek insan hekimliği ve gerekse veteriner hekimliğinde kullanılan çeşitli serolojik yöntemler balık hastalıklarının teşhisinde uygulanmaya başlanmıştır (Anderson 1974, Plumb and Bowser 1983, Austin 1988, Bullock 1989, Schill *et al.* 1989, Austin and Austin 1993). Bu amaçla aglutinasyon, immüno-diffüzyon, immüno-fluoresans, hemaglutinasyon, radioimmün assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), komplement fiksasyon, immünoelektroforezis gibi sıcak kanlı hayvanlarda uygulanan testler balık hastalıklarına adapte edilerek bu hastalıkların çok kısa sürede teşhisine yardımcı olduğu gibi diğer mikrobiyolojik ve histopatolojik teşhis yöntemlerine de destek sağlamış olmaktadır (Anderson 1974, Timur 1985, Dixon 1985, Toranzo *et al.* 1987, Austin 1988, Bullock 1989, Austin and Austin 1993, Mananos *et al.* 1994).

Balık hastalıklarının teşhisinde serolojik teknikler ; hastalığın hızlı teşhisine ve hemen tedavisine başlanmasına olanak sağlaması ve dolayısıyla çıkan hastalığın zararının azaltılması, hastalığın yayılmasını önleyici uygun tedbirlerin alınabilmesine; zaman, insan gücü, maliyeti azaltması ve saha çalışmalarında hızlı test uygulanmasına imkan vermesi gibi nedenlerle kullanılmaktadır (Voller *et al.* 1976 , Dixon 1985, Schill *et al.*1989).

İngilizce enteric red mouth (ERM) yada yersiniosis olarak bilinen enterik kızıl ağız hastalığı ilk defa 1950'li yıllarda ABD'deki gökkuşacağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde yüksek mortalite ile seyreden septisemik bir hastalık olarak rapor edilmiştir (Ross *et al.* 1966, Bullock *et al.* 1977, Busch 1982, Frerichs and Roberts 1989). ERM, *Yersinia ruckeri*'nin sebep olduğu bakteriyel bir hastalık olup alabalık yetiştiriciliği yapılan işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. ERM hastalığı dünyanın birçok bölgesinde yayılmış durumdadır (Bullock *et al.*1977, Stevenson and Daly 1982, Roberts 1983, Lesel *et al.* 1983, Fuhrman *et al.* 1983, Bragg and Henton 1986). ERM hastalığı ülkemizde ilk olarak 1991 yılında Denizli'deki bir işletmede gökkuşacağı alabalıklarında tespit edilmiştir (Timur and Timur 1991). Daha sonra bu hastalık diğer alabalık işletmelerinde görülmüştür ve önemli bir sorun haline gelmiştir (Çağırğan and Yürekli Türk 1991, Timur 1997).

Bu araştırmada, bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde hızlı sonuç veren serolojik yöntemlerin Türkiye'de ilk defa deneysel olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaçla yurdumuzda endemik bir hastalık haline gelen enterik kızıl ağız hastalığının etkeni olan *Yersinia ruckeri* bakterisinin antijen olarak kullanılması uygun bulunarak inaktive edilmiş ve denemede kullanılan gökkuşacağı alabalıklarına verilerek bu antijenle immunizasyon sağlanmıştır. İmmunize edilen balıkların aglutinasyon, hemaglutinasyon, immunodiffüzyon, indirekt fluoresans antikor tekniği (IFAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gibi serolojik testlerle serumlarında antikor varlığının tespiti ve 20 haftalık deneme süresinde bu balıkların serumda antikor titreşiminin izlenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Gökkuşığı Alabalığının Sistematikteki Yeri ve Morfolojik Özellikleri

Kuzey Amerika orijinli alabalık türlerinin "*Salmo*" cins isminin geçerliliği konusunda 1988 yılında Amerikan Balıkçılık Balık İsimlendirme Komitesinin (American Fisheries Society's Committee on Names of Fishes) yaptığı toplantı sonucunda gökkuşığı alabalığının Pasifik salmon (*Oncorhynchus*) türlerine Atlantik salmonundan daha yakın olması nedeniyle *Oncorhynchus* cins isminin verilmesinin daha uygun olacağı kabul edilmiştir. Buna ek olarak taksonomistler gökkuşığı alabalığının Kamchatkan alabalığı (*S.mykiss*) ile tek bir türü oluşturmaları ve *mykiss*'in nomankletürdeki önceliği nedeniyle ikisine birden *Oncorhynchus mykiss* olarak isimlendirilmesini kabul etmişlerdir. (Gall and De Groot 1990). Gökkuşığı alabalığının sistematikteki yeri aşağıdaki şekilde belirlenmiştir (Blanc *et al.* 1971).

Phylum : Chordata
 Superclass : Pisces
 Class : Osteichthyes
 Subclass : Actinopterygii
 Superorder : Teleostei
 Order : Salmoniformes
 Suborder : Salmonidei
 Family : Salmonidae
 Subfamily : Salmoninae
 Genus : *Oncorhynchus*
 Species : *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792

Gökkuşığı alabalığında sırt koyu yeşil, mavi-yeşil veya gri-yeşildir. Karnın alt kısmı genellikle gümüşü renktedir. Vücudün her iki yanında baştan kuyruğa kadar uzanan gökkuşığı renginde kalın bir bant bulunur. Erkek balıklarda özellikle üreme döneminde bu bant daha parlak ve belirgin bir hal alır. Baş, sırt, yanlar, dorsal bölge, adipoz ve kuyruk yüzgeçleri küçük koyu beneklerle kaplanmıştır. Pektoral ve pelvik yüzgeçler çoğunlukla hafif kahverengi-gri veya pembesidir. Bu balıklar en fazla 70 cm boy uzunluğuna ve 7 kg vücut ağırlığına ulaşır (Atay 1980, Timur 1987 , Çelikkale 1988).

Gökkuşığı alabalıkları cinsi olgunluğa iki yılda ulaşabilirler. Üreme mevsimi bölgelere göre farklılık gösterirse de çoğunlukla Aralık-Mayıs ayları arasında gerçekleşir (Timur 1987, Çelikkale 1988). Gökkuşığı alabalığı yapay dölllenme ile üretilen hızlı gelişim gösteren bir balıktır. Bu balıklar bol oksijenli soğuk suları severler (Timur 1987).

Gökkuşığı alabalıklarının kültür balıkçılığında tercih edilmesinin başlıca sebepleri ; diğer alabalık türlerine göre daha kolay çevreye adapte olması, pelet yeme alışması ve yem değerlendirme katsayısının yüksek olması, su sıcaklığındaki artışa dayanıklı olması, büyüme hızı ve hastalıklara karşı direncinin daha fazla olmasındandır (Timur 1987 , Çelikkale 1988).

Gökkuşığı alabalığının ilk kültür yerinin Kaliforniya'daki Cloud River olarak bilinen küçük bir nehir olduğu bildirilmiştir (Gall and Crandel 1992). Avrupa'ya 1882 yılında getirilen gökkuşığı alabalığının ülkemizde yetiştiriciliği 1970 yılında başlayarak bu balığın yetiştiriciliği bugün yurdumuzda oldukça yaygınlaşmıştır (Atay 1980, Baran ve Timur 1985, Timur 1987 , Çelikkale 1988, Timur 1990).

2.2. Balıklarda İmmunite

Balıklarda immunité temel olarak yüksek vertebralılarla aynı yapıdadır. İmmun yanıtta başlıca farklılıklar balıklardaki diğer fizyolojik olaylarda olduğu gibi sıcaklığa bağlı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle uzun bir süre balıkların immunité kabiliyetleri konusunda bir anlaşma sağlanamamıştır. Çünkü bazı araştırmacılar sıcaklık ve zaman faktörlerini dikkate almamışlardır (Ellis 1978, Bly 1984, Ellis 1989).

Balıkların immün sistemi memelilerin immün sistemine göre daha az karışık sistem olmasına rağmen cell mediated immunité ve humoral immunité gibi çeşitli müdafaa mekanizmalarını içermektedir (Ellis 1978, 1988a, 1989).

İmmunité hayvanlarda enfeksiyonlara karşı korunmada en önemli bir fizyolojik mekanizmadır. Vertebralılarda immunité; primer (doğal) ve adaptive (kazanılmış) immunité olmak üzere iki tiptir. Primer immunité, doğuştan savunma mekanizmalarına dayanır ve vücuda girebilecek çok geniş bir zarar verme mekanizmasına karşı non-spesifik olarak çalışır. Bu savunma mekanizması (non-spesifik immün sistem) fagositik hücrelerin faaliyetini, interferonları ve vücutta çeşitli doğal olarak oluşan lizozim, C-reaktive protein, aglutinin ve lizin gibi maddelerin etkisini içerir. Adaptive immunité kazanılmış bir bağışıklık

durumudur ve vücudun reaksiyon verme kabiliyetine bağlı olarak zarar verici spesifik partiküler mikroorganizmalara karşı, spesifik reaktif lenfosit (cell mediated immunite) veya serum antikorlarının (humoral immunite) oluşmasıdır (Timur G. 1975, Ellis 1978, Busch 1981, Bly 1984, Pelczar *et al.* 1986, Trust 1986, Ellis 1988a, 1989, Janeway and Travers1996). Yeni yumurtadan çıkan larva balıklarda immun sistemin gelişmesi sırasında antijenle uyarılara karşı etkin lenfosit ve antikor üretim kapasitesi sınırlıdır. Bu eksiklik nedeniyle genç balıklar uyarıcılara karşı hassastırlar ve dolayısıyla hastalıklara karşı dirençleri zayıftır. Halbuki yüksek vertebralıların gençleri hayatlarının ilk bağımsızlık dönemi periyodunda annelerinden gelen pasif immunite ile donatılmış bir savunma kabiliyetine sahiptirler. Bu kolaylık anne tarafından çevresel antijenlere karşı aktif bir şekilde üretilen antikorların hazır bir şekilde annenin dolaşım sisteminden yavrusuna plenta aracılığı ile veya ağız sütündeki (clostrum) antikorların yavru tarafından 2-40 gün içinde emilmesi suretiyle sindirim kanalından kan dolaşımıyla transferiyle sağlanmaktadır(Bly 1984).

2.2.1. Primer (Doğal) İmmunite

Non-spesifik savunmalar patojenik etkenlere karşı geniş spektrumlu gerçek engellerdir. Bu engeller yapay olarak oluşturulan spesifik antikorlara göre sürekli kalıcı engellerdir. Genellikle vücudu istila eden cansız etkenlere karşı koruyucu olarak hizmet ettiği gibi potansiyel patojenlere karşı da koruyucu etki gösterirler. Non-spesifik sistemin koruyucu faaliyeti genellikle istila edici (invasive agent) etkenin antijenik yapısı ile direkt olarak ilgili değildir. Non-spesifik savunma daha çok balığın belirli bir hastalığa olan hassasiyeti ile ilgili temel sebeplerle alakalıdır. Non-spesifik savunma daha sıkı ve az geçirgen epidermisi, mukusu, makrofajlar tarafından sindirilen mikroorganizmaları opsonize eden kanın kimyasal komponentlerini ve konakçıyı geniş spektrumlu virüslere karşı koruyan interferonları içerir (Anderson 1974, Pelczar *et al.* 1986). Patojenlere karşı ilk müdafaa non-spesifik engeller ve inflamatory reaksiyon ile sağlanır (Timur G 1975 ,Timur M 1975). Daha sonra spesifik immun reaksiyon gerçekleşir. Bu reaksiyon önceki non-spesifik reaksiyonlardan spesifik olması ile ayrılır. İmmun reaksiyon patojen tarafından balığın sistemlerini başarılı bir istilasından sonra başlar (Anderson 1974).

Mukus ve epidermis balıklarda ilk müdafaa hattını oluşturur. Bu engellerle koruma çok etkilidir. Epidermal mukoza hücrelerinde devamlı olarak yenilenmek suretiyle salgılanır ve mukus balığın yüzeyinde birikmiş döküntülerin ve mikroorganizmaları kolayca kendisiyle birlikte uzaklaşmasını sağlar. Pullar, epidermis ve dermis fiziksel yaralanmaların neden olacağı açık yaralar ve bunun sonucu muhtemel enfeksiyonların oluşmasında koruyucu kalkan olarak görev yürütür (Anderson 1974).

Mukus balığın eksternal yüzey bölgelerinde paraziter mikroorganizmaların yerleşmesini ve gelişmesini engelleyici faktörler içerir. Mukusun patojenlerle savaşma mekanizması konusundaki aktivitesi hakkında çok az çalışma yapılmasına rağmen genellikle epidermal mukus hücre ürünlerinde yüksek hayvanlar tarafından salgılanan göz yaşı, burun sekresyonu ve insan tükürüğünde bulunduğu bildirilen lizozim enzimlerinin analoglarının bulunduğu düşünülmektedir. Bilindiği gibi bu lizozim enzimler birçok bakterinin mukopeptit tabakasının parçalanmasında rol almaktadır (Anderson 1974).

2.2.2. Adaptive (Kazanılmış) İmmunite

Kazanılmış immunitede savunma mekanizmasının merkezi lenfositlerdir. Lenfositler kazanılmış immunitenin, humoral immunité, cell-mediated immunité (CMI) ve bellek gibi üç safhanın başlatılmasından ve yürütülmesinden sorumludur.

2.2.2.1. Humoral İmmunite

Antijenin vücuda ilk kez girmesi halinde T ve B lenfositleri birlikte reaksiyon verirler. B lenfositler plazma hücrelerine veya bellek hücrelerine dönüşürler.(Ellis 1978, 1988a, Minbay 1988, Ellis 1989, Arda 1994a,d). Plazma hücreleri kendilerinin oluşmasını uyarıcı antijene karşı özel antikor üretirken bellek hücrelerine ve daha sonra aynı antijenin ikinci kez vücuda girmesi halinde plazma hücrelerine dönüşebilecek özelliğe sahip hücrelerdir. T hücreleri farklı bir fonksiyona sahiptir. Başlangıçtaki T hücreleri, yardımcı hücreler olarak isimlendirilirler. Bu klon hücreleri antijenin başlangıç stimülasyonu ile çoğalırlar. Uzun süre hayatta kalabilen yardımcı bellek hücrelerine dönüşürler. Böylece ikinci bir uyarıda T hücrelerinin sayısı artar. Bunlar sayıları artan B bellek hücreleri ile işbirliği yaparlar. Böylece

ikinci uyarıda kandaki antikor üretimi daha hızlı gerçekleşir ve birinci uyarıya göre daha yüksek konsantrasyona ulaşır(Ellis 1988a, Arda 1994g). Bellek hücrelerinin hızlı ve yüksek seviyede reaksiyon kabiliyeti nedeniyle patojen ve aşuların uygulanmasını takiben dikkate değer artan bir resistans oluşturur (Ellis 1988a, Timur 1992).

2.2.2.2. Cell Mediated Immunity (CMI)

T lenfosit popülasyonu T yardımcı klonlarının yanı sıra CMI dan sorumlu klonlara da sahiptir. İmmun yanıtın bu bölümü geniş bir sahayı içine alır ve vücudu istila eden mikroorganizmaları fagosite ederek sindirmek suretiyle vücudun non-spesifik koruma mekanizmasını oluşturan makrofajların teminini sağlar (Ellis 1988a, Arda 1994a, Timur 1992).

Primer antijen stimülasyonunda T lenfosit klonları CMI da rol alan çeşitli farklı fonksiyonel hücrelere dönüşür. Bunlar arasında öldürücü hücreler, supresör hücreler ve lenfokin üreten hücreler bulunur (Ellis 1988a).

Öldürücü hücreler : Bu sitotoksik T hücresi ile hedef hücrenin arasında fiziksel temas sonucunda oluşan bir mekanizma ile yabancı hücreleri eritme özelliğine sahiptirler (Trust 1986, Ellis 1988a).

Lenfokin üreten hücreler : Antijen stimülasyonu sonucunda bazı T hücresi klonları lenfokin adı verilen bir takım humoral faktörler üretirler. Bu faktörler makrofajların non-spesifik defans mekanizmasını artırır. Bu aktive olmuş makrofajlar non-spesifik olarak enfeksiyonla daha fazla mücadele etme kabiliyetine sahip hale gelirler (Trust 1986, Ellis 1988a).

Öldürücü hücreler ve lenfokin üreten hücrelerin yanıtları pozitif immunitiyi oluşturur (Ellis 1988a).

Supresör Cells) : İmmun yanıt oluşumu sırasında antikorların ve lenfokinlerin üretiminin kontrol edilmesi gerekir. Bu kontrol immün yanıtı bitiren veya negatif immunitenin oluşmasını sağlayan baskı yapıcı yani suppressor hücrelerin oluşmasıyla sağlanır (Ellis 1988a).

2.3. İmmun Yanıtta Rol Oynayan Organlar

Antikor üreten lenfositler özellikle bazı organlarda yoğunlaşmış olarak veya dolaşım sisteminde serbest olarak bulunurlar. Antikor uyarılması ve üretimi bir çok organı ilgilendirir. Antikor üretimi ve uyarılması ile ilgili organlar insanda timus, lenf düğümü ve kemik iliğini içerir. Antijen-antikor kompleksinin ve istila edici materyalin döküntüsünün parçalanmasında rol alan hücreler dolaşım sisteminden ve duragan fagositlerden (büyük çoğunluğu makrofajlar), karaciğer sinüzoidlerinin Kupffer hücreleri ve böbrek hücreleri vardır (Anderson 1974). İnsanda kan hücrelerinin üretiminden internal vaskularize kemik iliği sorumludur. Halbuki, balıklar kemik iliğine ve lenf nodüllerine sahip değildirler. Teleost balıklarda başlıca lenfoid organlar; timus, böbrek ve dalaktır (Anderson 1974, Ellis 1978, Bly 1984, Ellis 1989, Ellis *et al.* 1989, Razquin *et al.* 1990, Waterstrat *et al.* 1991).

Böbrek başlıca antikor üreten organdır. Böbrekler lenfosit ve plazma hücrelerinden zengin hemapoyetik dokuya sahiptir (Anderson 1974, Razquin *et al.* 1990, Waterstrat *et al.* 1991). Böbrekler aynı zamanda antijenleri fagosit eden çok sayıda makrofaj içeren filtrasyon organı olarak görev yapar. Anterior böbrek gökkuşağı alabalıklarında en önemli hemapoyetik organdır. Bu bölgede çok sayıda blast ve undiferansiye hücreler bulunur. Böbrekte küçük lenfositler, nötrofiller, eosinofiller ve bazofiller de bulunur. Alabalık böbreğinde sirküler kandan veya diğer organlardan daha fazla sayıda fagositik makrofajlar bulunur (Anderson 1974).

Timus balıklarda solungaç çemberinde dorso-lateral olarak pharyngeal epitel altında çift ve bilateral olarak bulunan bir organdır (Anderson 1974, Hıbya 1982). Genellikle gelişen lenfositlerden oluşur. Diğer vertebralılarda olduğu gibi primer lenfoid organ olarak ve lenfositlerin üretildiği bir havuz olarak kabul edilir. Lenfositler buradan dolaşıma ve diğer lenfoid organlara göç eder. Timus'un antikor üretimi ve antijenlerin yakalanması gibi yürütücü fonksiyonu yoktur (Anderson 1974).

Dalak böbreğe göre daha az hemapoyetik ve lenfoid hücelere sahiptir. Genellikle sinüslerde tutulan kandan oluşur. Dalak bununla beraber, retiküler fibriller ve makrofajlardan oluşan elipsoid adı verilen özelleşmiş kapillar duvarları içerir. Retikula iplik ağı immun-kompleksler için özelleşmiş bir tuzak oluştururken elipsoidlerdeki makrofajlar yüksek fagositik aktivite yürütürler. Bunun fonksiyonu balıklarda açıklanamamıştır. Fakat

memelilerde benzer antijen yakalama prosesi immun belleğin gelişimi ile ilgilidir (Ellis 1988b).

2.4. İmmunoglobulinler (Antikorlar)

İmmunoglobulinler antijenik uyarımlar sonucu vücutta plazma hücreleri tarafından sentezlenen ve homolog antijenle birleşerek spesifik bir reaksiyon verebilen glikoprotein karakterindeki moleküllerdir (Gülmezoğlu 1975, İter 1975, Arda 1985b, Minbay 1988, Bilgehan 1993, Müftüoğlu vd 1993, Arda 1994d). Protein olmaları nedeniyle immunoglobulinler çok iyi antijenik özelliklere sahiptirler. Kendilerine karşı antikor sentezini uyarırlar ve bunlardaki reaksiyon verirler. Antikorlar çeşitli maddelerle (FITC, izotop,enzim) konjuge edilerek serolojik reaksiyonlarda (FAT,RIA,ELISA) başarı ile kullanılmaktadır (Austin 1988, Schill *et al.* 1989, Anderson 1993, İzgür 1994, Janeway and Travers 1996).

Balık ve diğer vertebraların parazit invazyonlarına karşı doğal antikor olarak lektin ürünlerine sahip olduğuna inanılmaktadır. Bugün memelilerde IgG, IgM, IgA, IgD, ve IgE olmak üzere 5 farklı sınıf olduğu bilinmektedir (Gülmezoğlu 1975, İter 1975, Arda 1985b, Pelczar *et al.* 1986, Bilgehan 1993, Müftüoğlu vd 1993, Arda 1994a,d,e, Janeway and Travers 1996). Teleost balıklarda ise bir sınıf immunoglobulin kesin olarak tanımlanmıştır. Bu immunoglobulin memelilerde makroglobulin veya IgM olarak isimlendirilen sınıfa bir çok hususta benzerlik gösterir(Avtalion 1981, Trust 1986, Fuda *et al.* 1991, Michel *et al.* 1991, Sanchez *et al.* 1991, Buchman *et al.* 1992, Fuda *et al.* 1992, Al-Harbi and Austin 1993, Estevez *et al.* 1993, Smith *et al.* 1993, Nagae *et al.* 1993-1994a,b, Williams and Hoole 1995). Memelilerde bu sınıf antikorlar genellikle plazma proteini olarak bulunur ve immun yanıt olarak teşekkül eden ilk immunoglobulinlerdir. Daha sonra daha küçük moleküllerin IgG nin oluşmasına müsade ederler (Ellis 1978, 1989).

Teleost balıklarda sadece bir sınıf IgM antikorların yanı sıra hiperimmunize edilen havuz japon balıklarında (*Carassius auratus*) IgG benzeri immunoglobulin moleküllerinin varlığı bildirilmiştir (Ellis 1978).

Antikorlar biyolojik aktivitelerine göre ; aglutinin, presipitin ve virüs nötralize eden antikorlar olarak sınıflandırılır. Balıklarda aglutininlerin; bakteri, virüs ve yabancı eritrosit gibi antijenlere karşı üretimi demonstre edilmiştir. Gökkuşuğu alabalığı ve yılan balığı dahil

bir kaç teleost balıkta, Freund's complete adjuvant içeren antijenin enjeksiyonu ile aglutininlerin üretimini arttırdığı bildirilmiştir (Ellis 1978). Presipitin antikorlar soluble antijenlerin presipitasyonuna neden olur ve bu nedenle testler agar jellerinde veya selüloz asetat şeritlerinde yapılır. Çoğu araştırmacı aşağı yapılı vertebralılarda presipitin tespitinde büyük zorluklarla karşılaşmış ve bu nedenle presipitin antikorlarının pek iyi gelişmediği düşüncesi ortaya atılmıştır (Bullock 1966, Ingram and Alexander 1977, Ellis 1978). Presipitin, lymphocystis virüsüne karşı doğal olarak enfekte olmuş dere pisilerinde (*Platichthys flesus*) tespit edilmiştir. Bununla birlikte benzer enfekte balıklarda presipitinlerin oluşumu büyük farklılık göstermiştir (Russel 1974).

Balık serumlarında virüs nötralizin antikorlar bildirilmiştir. Bu antikorlar virüs partiküllerinin yüzeyine yapışır ve hücreleri enfekte etme kabiliyetlerini kaybettirirler (Ellis 1978, 1989).

Memelilerde antikorlar yüksek konsantrasyonda serumda, doku sıvılarında, mukus sekresyonunda, göz yaşında ve sütte bulunur. IgM, IgG serumda ve doku aralıklarında bulunurken, IgA mukus ve süt sekresyonlarında bulunmuştur. Balıklarda antikor ise serumda, doku sıvılarında ve sindirim kanalında, deriden ve solungaçlardan salgılanan mukus içinde bulunmuştur (Ellis 1978).

Balıkların kanlarında çeşitli tipteki antikorların varlığı saptanmıştır. Bunlar arasında komplement, lizozim, properdin, hemolizin, presipitin nötralizan antikorları ve hemaglutininler sayılabilir (Arda 1974).

2.5. Antikor Üretimi ve Üretimi Etkileyen Faktörler

Antikor üretiminin kinetiği hayvanın antijenle ilk kez olarak veya müteakip karşılaşmasına bağlıdır. Antijenin başlangıç stimülasyonuna karşı oluşan reaksiyon genellikle primer immun yanıt, antijenin müteakip ikinci karşılaşmasının yanıtı ise sekonder yanıt olarak bilinir (Ellis 1978, 1988a, 1989, Arda 1994f). Sekonder yanıt üretim fazının daha kısa olması ve daha yüksek bir antikor titresinin oluşmasıyla primer yanıtta farklılık gösterir. Teleost balıklarda klasik primer ve sekonder yanıtlar demonstre edilmiş ve daha yüksek bir antikor titresinin oluşmasıyla sekonder yanıt primer yanıtta farklılık göstermiştir. Teleost balıklarda demonstre edilen klasik primer ve sekonder yanıtlarda antikor seviyesinin ulaştığı

en yüksek nokta memeliler ile mukayese edilebilecek özellikte olup genellikle uzun bir üretim fazına sahip oldukları ve antikor titresinin yükselmesinin memelilere ve kuşlara göre daha yavaş olduğu bulunmuştur. Genellikle ılık sulara yaşayan balıkların antikor üretimi için sıcak sulara yaşayan türlere göre daha uzun üretim fazına sahip oldukları kabul edilmektedir. Pisi balığı ve gökkuşacağı alabalığı gibi türler için üretim fazının 2 -3 haftalık bir süre olduğu deneysel çalışmalardan ortaya çıkarılmıştır (Ellis 1978).

Vücutlarının sıcaklığı çevre sıcaklığı olan ektotermik vertebralılarda çeşitli çevresel ve fizyolojik faktörler antikor üretimini etkiler. İmmun yanıt bütün ektotermik vertebralılarda sıcaklığa bağımlıdır ve düşük sıcaklık antikor üretimini geciktirir veya tamamen durdurur(Avtalion 1969). İmmun yanıtın oluşturulmadığı sıcaklık derecesi türlere ve onların yaşadıkları doğal çevre sıcaklığına göre değişiklik gösterir. Aynalı sazan gibi ılık su balıklarında 12°C' nin altında antikor üretilmezken, gökkuşacağı alabalıklarında 5°C gibi düşük sıcaklıklarda antikor üretilir (Avtalion 1969,1981, Ellis 1988c).

2.5.1. Suyun Sıcaklığı

Sığır serum albümini ile immunize edilen sazan balıkları 12°C de tutulduğunda hiç bir antikor titresini elde edilmemesine rağmen, 25°C de tutulanlarda artan bir antikor titresini tespit edilmiştir. Daha sonra sıcaklığın immün yanıtta etkisi üzerine yapılan çalışmalarda antikor üretiminin sıcaklığa bağlı olduğu yüksek sıcaklıkta antikor üretiminin arttığı ispatlanmıştır (Avtalion 1969, Anderson 1974, Arda 1974, Ellis 1978, Avtalion 1981, Mannig and Mughal 1985, Laudan 1987, Wishkousky and Avtalion 1987, Ellis 1989, Wichardt and Thuvander 1989). Bu durum düşük sıcaklıklarda T- supressor hücre proliferasyonunun artmasına bağlı olarak plazma hücreleri tarafından üretilen antikor miktarının azalmasıyla ilgili olabileceği bildirilmiştir (Mannig and Mughal 1985, Wishkousky and Avtalion 1987).

Gökkuşacağı alabalıklarında Hagerman kızıl ağız hastalığı (ERM) ile ilgili olarak yürütülen immunizasyon çalışmalarında, fenolle öldürülen bakterilerin tek bir enjeksiyon ile balıklara verilmesiyle immunizasyon yapılmıştır. 17°C de üç hafta tutulan alabalıkların serumlarında yüksek aglutinasyon titresini bulunduğu, 9°C de tutulan balıklarda ise spesifik serum aglutininlerine rastlanmadığı bildirilmiştir (Anderson 1974).

2.5.2. Balığın Vücut Ağırlığı

Genellikle salmonid balıklar 0,5 gram ağırlığının altında (10°C de) aşılandıklarında koruyucu immunité geliştirmezler. Bir çok salmonid türde 1 gram ağırlıkta daha yüksek seviyede koruma gelişirken, bu gelişme salmonidlerin bütün türlerinde 2,5 gram ağırlığa ulaşınca oluşur. Bu nedenle balığın büyüklüğü önemlidir. Balık farklı sıcaklıklarda yetiştirildiğinde büyüme oranı farklı olduğu için koruyucu immunité yař ile değil vücut ağırlığına bağlıdır (Johnson *et al.* 1982a,b, Ellis 1988c, Thorburn and Jansson 1988). ERM ve vibriosise karşı balıklarda aşılama ile oluşturulan koruyucu immunité balığın ağırlığına bağlı olarak artar. 1 gramlık balıklarda koruyucu immunitenin 120 gün, 2 gramlık balıklarda 180 gün, 4 gramlık balıklarda 1 yılı aştığı ve erginlik dönemine kadar devam ettiği bildirilmektedir (Johnson *et al.* 1982b, Ellis 1988c).

2.5.3. Antijenin Fiziksel Durumu

Memelilerde antijenin fiziksel yapısı onun immunojenik veya tolarejenik olma özelliği üzerinde etkilidir. Balıklarda da antijenin uygulanış formu çok önemli olabilir. Balıklarda antijen uygulama formu genellikle immersion (daldırma) metodu şeklinde uygulanmıştır. Antijenin fiziksel yapısı onun alınmasına ve sonra immun yanıtta etkili olmaktadır (Manning and Mughal 1985, Salati *et al.* 1989). Gökkuşağı alabalıklarında antijenin solungaçlardan girdiğini ve eriyik halindeki antijenin alınmasında partiküler taşıyıcıların (latex tanecikleri) bu işlemi çok kolaylaştırdığı gözlenmiştir. (Mannig and Mughal 1985).

Antikor üretimi için genellikle eriyik protein antijenlerinin adjuvant içinde verilmesi gerekir. Sazanlara serum albumini (BSA) Freund's incomplete adjuvant içinde enjekte edildiği zaman immunojenik etki ettiği halde, fizyolojik tuzlu su içinde verildiği zaman ise immunojenik olmadığı tespit edilmiştir. Antijenlerin immunitesi balık türlerine göre değişmektedir. Bovin serum albumin (BSA) tilapia için iyi bir antijen olduğu halde gökkuşağı alabalığı için adjuvant içinde enjekte edilse bile zayıf immunité vermektedir (Mannig and Mughal 1985, Avtalion 1981).

2.5.4. Antijenin Dozu

Primer immun yanıtta antikor üretiminin seviyesi genellikle uygulanan antijen dozu ile ilgilidir (Avtalion and Wishkousky 1987, Tatner *et al.* 1987, Ellis 1988c). Belli bazı çok yüksek dozlarda antijen enjeksiyonu yapıldığında balık tolerans oluşturmaktadır (Wishkousky and Avtalion 1987, Ellis 1988c, Aydın 1994a).

2.5.5. Antijenin Veriliş Yöntemleri

Balıklarda en iyi bağışıklık kazandıran metod, immunojenin enjeksiyon yöntemi ile verilmesidir. Bu yöntem sırasıyla banyo ve oral yöntem izlemektedir. *Yersinia ruckeri* antijeni kanal yayın balıklarına intraperitoneal (i.p.), intramuskular (i.m.), intraözefagal verildiğinde en düşük antikor titresi özefagustan antijen verilen balık grubunda rastlanmıştır. *Yersinia ruckeri* 'ye karşı aşılama enjeksiyon yönteminin banyoya karşı çok daha iyi bağışıklık sağladığı bildirilmiştir (Johnson and Amend 1983a). Antijenin intramuskular enjeksiyonunun intraperitoneal enjeksiyondan biraz daha yüksek antikor seviyesi sağladığı bildirilmiştir (Ellis 1988c).

Oral immunizasyon serumda genellikle antikor üretimi sağlamaz, fakat antikor sindirim kanalı mukusunda ortaya çıkabilir (Ellis 1988c). *Aeromonas salmonicida* ile oral immunizasyona tabi tutulan alabalıklara antijen enjeksiyonu yapıldığında serum antikor titresi oral immunizasyondan kaynaklanan baskılayıcı (suppressor) hücrelerin etkisiyle baskı altına alındığı tespit edilmiştir. Halbuki; yem ile birlikte verilen *Vibrio* aşısında sistemik supresyon görülmemiştir. Oral aşılama 4 hafta sonra kanda aglutinin antikorlar oluşmuştur (Ellis 1988c, Lillehaug 1989, Dec *et al.* 1990).

2.5.6. Antijenik Kompetisyon (Antijenik Rekabet)

Antijenik kompetisyon; bir antijene karşı oluşturulacak immun yanıtın diğer bir antijen uygulanması ile inhibe olması olayıdır. Balıklarda iki farklı gamma-globulin birlikte veya eritrositlerin viruslarla birlikte verilmesi ile bu kompetisyonun varlığı gösterilmiştir. Diğer taraftan salmonid balıklarda bakteriyel antijenlerin çeşitli kombinasyonları ile yapılan

uygulamalarda koruyucu immunitenin oluşmasında engellenme tespit edilmemiştir (Larsen 1988, Ellis 1989). Bu nedenle balıklarda antijenik kompetisyonun varlığı tespit edilmesine rağmen, polyvalant aşılar da yeterli koruyucu etkinin oluşmasında bir engelleme görülmemektedir (Larsen 1988, Ellis 1989).

2.5.7. Adjuvantlar ve İmmunostimulanlar

Adjuvantlar isimlerinden anlaşılacağı gibi antijen ile birlikte etki yaparak antijeni daha immunojenik hale getiren böylece immun yanıtı arttıran maddelerdir. Bunlar etki mekanizmaları farklı ve çoğu kere iyi anlaşılammış çeşitli maddeleri içerirler (Grayson *et al.* 1987, Ellis 1988c, Aydın 1994b,c, Janeway and Travers 1996).

Balıklarda immunizasyonda bir çok kimyasal ve biyolojik madde sonradan kazanılan bağışıklığı arttırmak için kullanılmaktadır (Mannig and Mughal 1985, Aakre *et al.* 1994). Freund's incomplete adjuvant antikor üretimini arttırması ve yüksek immunostimulant etkiye sahip olması nedeniyle balık immunolojisinde genişçe kullanılmaktadır. (Cossarini-Dunier 1986a, Kitao *et al.* 1987, Adams *et al.* 1988, Ellis 1989, Schill *et al.* 1989). Ancak bu adjuvantın kullanılması enjeksiyon yerinde nekrotik veya granulatöz lezyonlara neden olmaktadır (Anderson and Dixon 1984, Ellis 1989). Balıklarda etkili olarak kullanılan diğer adjuvantlar arasında banyo yolu ile uygulanan dimethylsulphoxide (DMSO) ve intravenöz enjeksiyonla verilen deniz tunicate (*Ecteinascidia turbinata*) ekstraktı (ETE) bulunmakta ve bu adjuvantlar ticari olarak kullanılmaktadır (Ellis 1989).

2.5.8. Mevsimsel Etkiler

Bazı bulgular balıkların immun sistemlerinde sadece düşük sıcaklıkla ilgili olmadan mevsimlere bağlı zayıf periyodlarının olduğunu göstermektedir (Wishkovsky and Avtalion 1987, Ellis 1988c).

2.5.9. İmmun Yanıtı Baskılayan Faktörler

Balık sağlığı üzerinde kirliliğin bir etkisi olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Ağır metaller, organik çözücüler ve pestisitler immun yanıtı etkilemektedirler. Balıklarda çeşitli

hastalıkların ortaya çıkması, balık yoğunluğu, dokunma gibi strese neden olan faktörlerle ilgilidir (Avtalion 1981, Möck and Peters 1989). Stresin kortikosteroidlerin salgılanmasının artmasına bağlı olarak immun baskı yaptığı bildirilmiştir (Anderson *et al.* 1982, Ellis 1988c, Arda 1994b). *Yersinia ruckeri*'ye karşı banyo ile aşılanan gökkuşağı alabalıklarına IP olarak kortikosteroid enjekte edildiğinde kan dolaşımında antikor üreten hücrelerin miktarının etkilenmesi ile antikor titresinin düştüğünü göstermiştir (Manning and Mughal 1985). Antibiyotiklerden oxytetracycline'nin *in vivo* olarak immun reaksiyonlar üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Oxytetracycline'nin bu etkisi fagositik makrofajlar ile B ve T lenfositleri arasındaki etkileşime bağlıdır (Ellis 1988c).

2.5.10. Beslenmenin Etkisi

Aşılama yeterli immun yanıt balığın sağlıklı ve iyi kondüsyonda olmasına bağlıdır. Bu nedenle balığa besin ihtiyacının karşılanması için dengeli bir rasyonun temin edilmesi gerekir (Blazer and Wolke 1984ab, Henken *et al.* 1987, Salomoni *et al.* 1987, Ellis 1988c, Landolt 1989, Navarre and Halver 1989, Hardie *et al.* 1990, Thomas and Woo 1990, Arda 1994b, Aydın 1994a). Temel olarak ticari yemler sazan, gökkuşağı alabalığı, Atlantik salmonu ve kanal yayın balıkları bu ihtiyacı genellikle yemlerle sağlamaktadır (Ellis 1988c).

Kanal yayın balıklarının yavrularında ; *Edwardsiella ictaluri* antijenlerine karşı farklı miktarda Vitamin C (askorbik asit) verilmesini içeren çalışmalarda Vitamin C nin verildiği mega dozda antikor yanıtında belirli bir artma bildirilmiştir (Ellis 1988c, Navarre and Halver 1989, Hardie *et al.* 1991, Thompson *et al.* 1993).

2.6. Antijen

Antijenler vücutta spesifik antikor sentezini uyaran ve meydana gelen antikorlarla özel reaksiyon verebilen moleküllerdir (Gülmezoğlu 1975, Ellis 1978, Arda 1985b, Minbay 1988, Ellis 1989, Akşit vd 1991, Bilgehan 1993, Müftüoğlu vd 1993, Arda 1994c). En son çalışmalar memelilerde antijenik moleküllerin B hücreleri, T yardımcı hücreleri (Th) ve T suppresor hücreleri (Ts)'ni taşıyıcı bölgeleri (epitoplari) içerdiğini göstermiştir. Bu özel

bölgeler tüm moleküle oranla çok küçüktür ve sayıları da molekülün büyüklüğü ile orantılıdır (Ellis 1988a, Timur 1992).

2.7. Enfeksiyöz Hastalıklarda Kullanılan Serolojik Yöntemler

Enfeksiyöz hastalıkların teşhisi antikorların aranması ve enfeksiyöz etkenlerin tespiti için serolojik yöntemler insan ve veteriner hekimliğinde bu yüzyılın başından beri çok yaygın olarak kullanılmaktadır. 1960' lı yıllardan itibaren balık patojenlerinin teşhisinde, balık serumlarında spesifik patojenlere karşı oluşan antikorların tayininde, aşılarda geliştirilmesinde, bakteri suşları ve tipleri arasındaki ve viral patojenler arasındaki serolojik ilişkiyi ortaya çıkarmak için çeşitli serolojik yöntemler giderek daha çok kullanılmaktadır. Klinik diagnoz ve başlıca bakteriyel balık patojenlerinin incelenmesi için serodiagnostik metodlar geliştirilmiştir. Bu metodlar doğal olarak non-lethal (öldürücü olmayan) örnekleme yöntemlerine dayanır. Hızlı olması, doğruluğundaki büyüklük payı ve klinik diagnoz ve inceleme için ekonomik uygulama özelliğine sahiptir (Voller *et al.* 1976, Busch 1981).

Serolojik çalışmalar temel enfeksiyonların çoğunun teşhisinde zaman ihtiyacını azaltır ve teşhisin doğruluğunu artırır. Seroloji aynı zamanda immün responsun anlaşılmasına da yararlıdır. (Anderson 1974, Voller *et al.* 1976, Dixon 1985, Schill *et al.* 1989). Serolojik prosedürler de gerçek test sonuçları ve değerlerinin alınabilmesi için antijen ve antiseranın standardize edilmesi kalitelerinin bilinmesi önemlidir. USA'daki Eastern Fish Disease laboratuvarında (şimdiki National Fish Health Research laboratuvarı) 1975 yılında balık sağlığı araştırmaları ve teşhisinde kullanılmak için ayıraçlar üretilmeye başlanmıştır (Anderson and Dixon 1984, Schill *et al.* 1989).

Eriyik antijenle uygulanan serolojik yöntemler balık patojenlerinin (viral, bakteriyel, parazitik) daha az diagnostik alet kullanılarak antijenik kompozisyon çalışmalarında kullanılır (Busch 1981).

Serolojik teknikler 1960' lı yıllarda özellikle salmonid balıkların *Aeromonas* patojenlerinin oluşturduğu çeşitli bakteriyel hastalıkların çeşitli konularını incelemek için kullanılmışlardır. Aglutinasyon testi frunkulosis hastalığının etkeni olan *Aeromonas salmonicida'* ya karşı teşekkül eden antikorları incelemek için kullanılmıştır (Bullock 1966, Anderson 1974).

Bugün balık hastalıklarında, aglutinasyon, hemaglutinasyon, komplement fiksasyon, immunofluoresans, ELISA, immunodiffüzyon, nötralizasyon gibi serolojik testler kullanılmaktadır. (Plumb and Bowser 1983, Chart *et al.* 1984, De Kinkelin *et al.* 1985, Austin *et al.* 1986, Dixon 1985,1987, Austin 1988, Schill *et al.* 1989, Austin and Austin 1993, Manonos *et al.* 1994).

2.7.1. Aglutinasyon ve Hemaglutinasyon

Süspansiyon halindeki bakterilerin eritrosit yada lökosit gibi hücrelerin yüzeyinde doğal olarak bulunan yada lateks, bentonit gibi sentetik parçacıkların yüzeylerine yapay olarak yapıştırılan antijenler elektrolitli ortamda kendi antikorları ile birleşecek olursa hücre veya parçacıklar birbirlerine yapışarak gözle görülebilecek kümeler halinde çökerler. Bu olaya aglutinasyon adı verilir (Çetin 1965, Anderson 1974, Plumb and Bowser 1983, Bilgehan 1993, Pelczar *et al.* 1986, Bullock 1989, İzgür 1994, Janeway and Travers 1996).

Çeşitli aglutinasyon yöntemleri balıklarda bakteriyel hastalıklar teşhisinde, patojen suşların serolojik karşılaştırılmasında patojenlere karşı balıkta antikor aranmasında kullanılmıştır (Toranzo *et al.* 1987, Schill *et al.* 1989). Balık hastalıklarının araştırılmasında serumda mevcut antikorların tayininde en çok uygulanan popüler testlerden birini oluşturur. Bu test serumda mevcut antikorların varlığını antijen veya antijen taşıyıcıları ile aglutinasyon veya kümeleşmesi ile ortaya çıkarır (Anderson 1974). Bununla birlikte aglutinasyon yöntemleri diğer serolojik metodlar kadar duyarlı olmadığı için bakteriyel hastalıkların teşhislerinin onaylarında kullanılır (Schill *et al.* 1989).

Aglutinasyon bakteriyel balık patojenlerine ait aynı türün cins ve suşları arasındaki serolojik ilişki hakkında da gerekli bilgilerin ortaya çıkarılmasını sağlar (Toranzo *et al.* 1987, Bernoth and Böhm 1988).

Aglutinasyon testi balık hastalıkları araştırılmasında yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Hızlı mikrobiyolojik lam aglutinasyon testinin frunkulosis hastalığının teşhisi için kullanıldığı bildirilmiştir (Rabb *et al.* 1964, Anderson 1974). Lateks aglutinasyon yöntemleri ve pasif hemaglutinasyon testlerinin kullanılması ile frunkulosis bakterisinin ve aglutinasyon yapan suşların identifikasyonunu sağlamıştır.

Staphylococcus protein A ile Co-aglutinasyon testleri *Aeromonas salmonicida* ve *Renibacterium salmoninarum* bakterilerinin identifikasyonu için kullanılmıştır (Schill *et al.* 1989). Sazan erythrodermatitis hastalığında tipik *Aeromonas salmonicida*'nın identifikasyonu için bu test immunofluoresans testine göre daha çok tercih edilerek kullanılmıştır. *Aeromonas* suşlarının ayrılmasında komplement fiksasyon ve aglutinasyon, ELISA yöntemleri kullanılmıştır (Bernoth and Böhm 1988). Salmonid balıklardan izole edilen *Mycobacterium chelonae*'nin izolatlarının klasifikasyonunda 6 alt türünü belirlemede ELISA ve mikroaglutinasyon kullanılmıştır (Arakawa *et al.* 1986). *Flexibacter columnaris*'in farklı suşları arasında antijenleri göstererek suşların dört antijenik gruba ayrılmasını sağlamıştır. *Cytophage psychrophila*'nın farklı suşlarının serolojik homojenitesi aglutinasyon ile gösterilmiştir. Merkezi Pensilvanya'daki alabalık kuluçkahanelerinde *Aeromonas salmonicida*'ya karşı doğal olarak kazanılmış aglutinin antikorlarının yayılımının incelenmesi ile ilgili çalışmalarda lam aglutinasyon testi kullanılmıştır (Krantz and Heist 1970).

Flexibacter columnaris'in 3 izolatının serolojik karşılaştırılmasında tavşan ve gökkuşağı alabalıklarının antiseralarını kullanarak bakteriyel aglutinasyon tekniği kullanılmıştır (Sanders *et al.* 1976).

Kanada'daki üç farklı nehirde bulunan salmon popülasyonlarında *Aeromonas hydrophila*, *Corynebacterium* ve *Aeromonas salmonicida* bakterilerine karşı spesifik aglutininler tespit edilerek serolojik testlerle tahmini hastalık olasılığı ile ilgili bulgular elde edilmiştir (Weber and Zwicker 1979).

Kortisol ve cyclophosphamide enjeksiyonları kısa süreli thymectomy uygulanarak immunosupresyon sağlanmış gökkuşağı alabalıklarında iki farklı antijene karşı antikor oluşmadığı microtitre plate aglutinasyon yöntemiyle tespit edilmiştir (Tatner 1990).

Mikroaglutinasyon yönteminde kullanılmak üzere *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, ERM bakterilerinin tetrazoliumla boyanmış antijenleri hazırlanarak kullanılmıştır (Eurell *et al.* 1979).

Kültürlerde izole edilmiş *Renibacterium salmoninarum*'un identifikasyonu için fluoresans antikor testi (FAT) ve ELISA testleri kullanılığında, ELISA testinin diğer testlere göre daha hassas olduğu onu takiben Co-aglutinasyon (CoA), FAT ve Lateks - aglutinasyon (LA) nun takip ettiği tespit edilmiştir. Bununla beraber dört testte diagnoz için

yeterli bulunmamıştır. Ancak CoA ve LA teknikleri gerek hızlı olmaları gerekse kullanımlarının kolay ve ucuz olması nedeniyle tercih edilmiştir (Dixon 1987).

Balıklarda, bakteriyel patojenlere karşı serumda antikor seviyelerinin belirlenmesinde aglutinasyon tekniklerinden ; Pasif hemaglutinasyon (Anderson *et al.* 1979, Secombes and Resink 1984, Cossarini-Dunier 1986b, Mughal and Mannig 1986, Laudan *et al.* 1987, Saeed and Plumb 1987, Tatner *et al.* 1987, Thomos and Woo 1990, Al-Harbi and Austin 1992), direkt hemaglutinasyon (Salomoni *et al.* 1987), tüp aglutinasyon (Krantz *et al.* 1963, Fujihara and Nakatani 1971, Ingram and Alexander 1977, Strand *et al.* 1977, Hardie *et al.* 1990), lam aglutinasyon, (Krantz *et al.* 1963, Rabb *et al.* 1964, Toranzo *et al.* 1987, Ellis *et al.* 1988, Davies 1991a) mikroaglutinasyon (Harrel *et al.* 1975, Antipa and Amend 1977, Weber and Zwicher 1979, Eurell *et al.* 1979, Sakai *et al.* 1993, Cossarini - Dunier 1986a,b, Pelczar *et al.* 1986, Cipriano and Ruppenthal 1987, Saeed and Plumb 1987, Tatner *et al.* 1987, Grayson *et al.* 1987, Bernoth and Böhm 1988, Hasting and Ellis 1988, Navarre and Halver 1989, Dec *et al.* 1990, Sakai *et al.* 1991,1993) kullanılmaktadır.

2.7.2. İmmunodiffüzyon ve İmmunoelektroforezis

İmmunodiffüzyon (Presipitasyon) soluble özellikteki antijenleri spesifik antikorları ile birleşerek çöküntü (presipitat) oluşturması temel ilkesine dayanır(Çetin 1965, İzgür 1994).

Agarda yapılan presipitasyon deneylerinde düşük voltajlı elektrik akımı uygulandığında antijen ve antikorun diffüzyonu daha fazla hızlanır. Bu olaya elektroimmunodiffüzyon adı verilir (Gülmezoğlu 1975, Minbay 1988, Bilgehan 1993, İzgür 1994).

İmmunoelektroforezis; immunodiffüzyon ile elektroforezisin birleştiği çok amaçlı kullanım özelliği olan bir teknik olup (İzgür 1994) presipitasyon antikor testinin bir modifikasyonudur (Anderson 1974).

Presipitasyon testler ana temel olarak Ouchterlony double agar jel -immudiffüzyon sistemi esasına dayanır. Bu testler basit fakat öncelikle kalitatif testlerdir ve tahmini antikor veya onaylanmış antijen determinasyonunda kullanılır. Bununla beraber bu testlerin geçerliliği (doğruluğu) özellikle kaba antijen preparat kullanıldığında zayıf olduğu ve bazı grup patojenlerle çapraz reaksiyon verdiği bildirilmiştir (Busch 1981).

Presipitin testi aeromonadları belirlemek için ve doku ekstraktlarında antijen aranmasında olduğu gibi antijen veya antikor aranmasındaki afiniteyi determine eder (Bullock 1989).

Jel içindeki presipitasyon testlerinde saf agar ile oluşturulmuş jel tabakalarının içinde yayılmaya bırakılan antijen ve antikorların birbirine uygun oldukları bölgelerde bulanık presipitasyon çizgileri halinde çökmektedir (Bullock 1966, Gülmezoğlu 1975, Timur M. 1975, Bullock 1989, Bilgehan 1993, Al-Harbi and Austin 1993, İzgür 1994).

Enfekte böbrek materyali kullanarak uygulanan Ouchterlony çift diffüzyon testi ile BKD'nin teşhisi başarı ile gerçekleştirilmiştir (Kimura *et al.* 1978).

İmmunodiffüzyon ve immunoelktroforezis temel bakteriyel patojenlerin ilişkilerinin anlaşılmasında faydalı olmaktadır (Khvoinev 1988, Ingram 1993). Geniş coğrafik alanlarda ki *Flexibacter columnaris*' in 22 suşunun karşılaştırılmasını çapraz immunoelktroforezis yöntemini kullanarak denemişlerdir (Schill *et al.* 1989). *Streptococcus spp.* 86 suşunun gruplandırılmasında, *Aeromonas salmonicida*'nın ekstra selüler protein sekresyonunun identifikasyonunda, *Pseudomonas anguillaseptica* suşlarının analizinde, *Renibacterium salmoninarum*'un ana yüzey antijenlerinin tanımlanmasında immunoelktroforezis ve immunodiffüzyon testlerini kullanmışlardır (Kimura *et al.* 1978, Schill *et al.* 1989). Counter-immunoelktroforezis ve iki boyutlu roket immunoelktroforezis VHS ve SVL viruslarının başlangıç tespitinde kullanılmıştır. Balık parazitlerinde immunodiffüzyon ve immunoelktroforezis ile çalışmalar, *Saprolegnia parasitica*, *S. ferax*, *S. delica* ve *S. diclina*'nın identifikasyonunda kullanılmıştır. Ayrıca bu metodlarla *Bothriocephalus gregarius* ve *Bothriocephalus barbatus* antijenlerinin karşılaştırılmasında da kullanılmıştır (Schill *et al.* 1989). Bulgaristan'ın çeşitli bölgelerinden gökkuşuğu alabalıklarından elde edilen 22 *Yersinia ruckeri* suşunun serolojik çalışmasında, tavşandan elde edilen *Yersinia ruckeri* suşuna ait hiperimmün antiserum kullanılarak immunodiffüzyon testi kullanılmıştır (Khvoinev 1988).

2.7.3. Floresans Antikor Testi (FAT)

Floresans antikor testi, birçok bakteriyel, viral, parazitik hastalıkların teşhisinde ve aranmasında çok kullanılmış bir yöntemdir. Belki de balıkların bakteriyel patojenden ileri

gelen hastalıklarında en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Direkt ve indirekt yöntemler kullanılarak *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum* gibi birçok hastalık etkeninin klinik bulgu ve izolasyon olmadan doğru teşhisler mümkün olmuştur (Busch 1981).

Fluoresans antikor tekniği balıklarda antijen ve antikorun aranması için kullanılmıştır. En fazla uygulaması salmonid balıklarda bakteriyel böbrek hastalığına neden olan *Renibacterium salmoninarum*' un aranmasında gerçekleştirilmiştir (Anderson 1993). Ezme preparatlar fluorescein isothiocyanate (FITC) ile işaretlenir ve *Renibacterium salmoninarum*' a karşı oluşturulan antiserum ile kaplanır. Bu serum genellikle keçi veya tavşandan hazırlanır. Fluoresans mikroskopta incelendiğinde parlak elma yeşili renk bakterinin varlığını ortaya çıkarır (Anderson 1993, Hetrick 1989).

Direkt FAT balıklarda enfekte dokudan lam üzerine hazırlanan ezme preparatlarda antijen aranmasında veya eğer patojen spesifik antikor fluoresans boya ile etiketlenmemiş ise indirekt FAT (IFAT) bu amaçla kullanılmaktadır. IFAT iki basamak içerir. Birinci basamak patojen-spesifik antikorun kaplanması kullanırken, ikincisi işaretlenmiş antikor içerir ki, bu da birincisine karşı oluşturulmuştur. Örneğin, *R. salmoninarum* için yapılan IFAT'da ilk olarak doku ezme preparatları tavşan veya başka hayvanlarda oluşturulan antisera ile kaplanması gerekir ki, bu sera patojene karşı hazırlanmıştır; ikinci kaplama üçüncü bir türde (keçi olabilir) oluşturulmuş FITC- işaretlenmiş antikordur. Bu antikor keçiye tavşan immunoglobulin (IgG) nin enjeksiyonu ile oluşturulur. Sonucusu anti-antikor seradır (Anderson 1993).

Aynı teknik balık popülasyonlarında spesifik antikorun varlığının araştırılmasında kullanılmaktadır. Bu durumda bilinen antijen cam lam üzerine yayılır, FAT veya IFAT teknikleri örnekteki serum antikorlarının araştırılmasında diagnostik amaçla kullanılabilir (Anderson 1993).

Direkt fluoresans antikor testi, *Aeromonas salmonicida* izolatlarının arasındaki antijenik farklılıkların aranmasında kullanılmıştır. Benzer teknik minow balıklarında *Aeromonas liquefaciens*' in varlığının aranmasında kullanılmıştır. Bu metodla gökkuşağı alabalıklarının dokularında ve doku kültürlerinde Egtved virusun varlığını göstermiştir (Schill *et al.* 1989).

Fluoresans tekniği 1950'den beri bakteriyel balık patojenlerinin identifikasyonu için geliştirilmiştir. Klontz and Anderson (1968)'un çalışmaları *Aeromonas salmonicida* izolatlarının arasındaki antijenik farklılıkların aranmasındaki çalışmaları FAT'in erken dönem uygulamalarını kapsar. ERM'nin diagnozunda FAT'in kullanılabileceği de gösterilmiştir (Johnson *et al.* 1974). *Renibacterium salmoninarum*'un sebep olduğu subklinik enfeksiyonlarda bakterilerin büyümeleri yavaştır ve Gram boyama ile teşhis zordur. Hem IFAT hem de DFAT bu patojenlerin aranması ve teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bullock *et al.* 1977, Austin *et al.* 1985, Lee and Gordon 1987, Manfredi 1986, Dixon 1987, Meyers *et al.* 1993a,b). *Streptococcus sp.*, *Pasteurella piscicida*, *Nocardia kampachi* ve *Vibrio anguillarum*'un sarıkuyruk balıklarından identifikasyonunda DFAT (Schill *et al.*, 1989), *Edwardsiella ictaluri* ve *Edwardsiella tarda*'nın identifikasyonunda IFAT'ın etkili olduğu saptanmıştır (Ainsworth *et al.* 1986, Saeed and Plumb 1987, Plumb and Klesius 1988, Schill *et al.* 1989).

Doku kültüründe ve hasta balıkların dokularında IPNV antijenlerinin rutin olarak aranmasında IFAT (Hetrick 1989, Hernandez *et al.* 1991), IHN (Danton *et al.* 1994) ve VHS virusuna karşı oluşan antikorların aranmasında FAT (Olesen *et al.* 1991) kullanılmıştır. Paraziter enfestasyonlardan intrahaemocitik parazit *Bonamia ostrea*'nın teşhisinde IFAT (Boula *et al.* 1989), *Myxosoma cerebralis*'in sporlarının identifikasyonunda FAT (Markiw and Wolf 1978, Hamilton and Canning 1988), *Ichthyophthirius multifiliis*'e karşı monoklonal antikorların karakterizasyonunda fluoresans mikroskopi kullanılmıştır (Schill *et al.* 1989). Gökkuşadı alabalıklarında *Diplostomum spathaceum* karşı sirkülasyon antikorlarının varlığının saptanmasında immunofluoresans metodu kullanılmıştır (Whyte *et al.* 1987).

2.7.4. Enzyme - linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Son yıllarda çok geniş kullanım alanı bulmuş çok hassas bir serolojik test yöntemidir. Antijen-antikor birleşmesini ortaya çıkarmak için deneye antikora bağlanabilen enzim (enzim konjugatı) ve enzim substratı konur (Voller *et al.* 1979, Austin *et al.* 1986, Pelczar *et al.* 1986, İzgür 1994, Bayraktar vd. 1995, Janeway and Travers 1996). Reaksiyonlar temelde bir spektrofotometre olan özel EIA okuyucularında değerlendirilir (Voller *et al.* 1976, Akşit vd 1991). Enzim işaretli immun deneylerde kullanılan başlıca enzimler;

peroksidaz, alkalın fosfataz, B-galaktosidaz enzimleri ve bunların substratlarıdır. Ucuz bir enzim olan peroksidaz, konjugasyonda uzun süre stabil kalabilmekte ve reaksiyon sonuçlarının gözle değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Ancak substratları kanserojen özelliktedir. Alkalın fosfataz ise konjugasyonda stabil değildir ve oldukça pahalıdır. Reaksiyon sonuçlarını gözle değerlendirilmesi mümkün değildir. Ancak substratların çalışanlar için herhangi bir toksik etkisi yoktur (İzgür 1994). ELISA testini yapabilmek için herşeyden önce kullanılan antijenle konjuge titresinin belirlenmesi ve ayrıca testte negatif ve pozitif kontrol serumlarının kullanılarak sonuçların karşılaştırılması ve daha sonra değerlendirilmesinin yapılması gerekmektedir. Değerlendirmede negatif kontrol serumlarından elde edilen optik yoğunluğun ortalama değeri pozitiflik eşik değeri olarak kabul edilir. Testte kullanılan antijen genellikle hücrelerin sonikasyon ile parçalanması suretiyle hazırlanır ve mikro-titre plate'lerine adsorbe ettirilir. Testte konjugat olarak peroksidazla veya alkalın fosfatazla işaretilenmiş keçi anti tavşan Ig G'leri ve substrat olarakta, peroksidaz enzimi için; 2-2 azinodi (3-etilbenziazolin sülfat) (ABTS) 5-aminosalisilik asit hidrojen peroksit ya da ortafenilendiamin, alkalın fosfataz enzimi için paranitrofenilen fosfat kullanılır (Engvall and Perlmann 1972, Voller *et al.*1976,1979, Nakamura *et al.* 1986, Austin 1988, İzgür 1994, Yardımcı vd. 1993).

Bu test antijen ve antikor konsantrasyonlarının tahmininde kullanılan immunopresipitasyon, aglutinasyon ve ışık veren metodlarla mukayese edildiğinde en hassas yöntemdir (Voller *et al.*1976, Dixon 1985, Manfredi 1986, Arkoosh and Kaattari 1993, Yardımcı vd. 1993). Bu test çok hızlı ve basit teknikleri içine aldığı gibi radioisotop gibi zararlı maddelerin kullanımını gerektirmediği için avantajlıdır (Voller *et al.*1976, Hetrick 1989, Arkoosh and Kaattari 1993).

Balık hastalıkları çalışmalarında patojenlerin çok hızlı teşhisi ve identifikasyonunda gereklidir. Enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) hızlı diagnostik metod olarak enfeksiyöz pankreatik nekrozis virusu (IPNV)'nun (Dominguez *et al.* 1991), hemapoiyetik nekrosis virusu (IHNV)'nun (Jorgensen *et al.* 1991, Hyatt *et al.* 1991), viral hemorajik septisemi virusu (VHSV)'nun (Jorgensen *et al.* 1991, Olesen *et al.* 1991), sazanların bahar viremi virusu (SVCV)(Rodak *et al.* 1993), yılan balığı rhabdovirusunun A ve X'nin (EVA, EYX)(Schiil *et al.* 1989) , *Aeromonas salmonicida*, (Smith 1981, Chart *et al.* 1984, Austin *et al.*1986, Hamilton *et al.* 1986, Bernoth and Böhm 1988,Rose *et al.* 1989, Bernoth 1990,

Frerichs and Holliman 1991, Lund *et al.* 1991, Arnesen *et al.* 1993, Aakre *et al.* 1994) *Renibacterium salmoninarum*, (Dixon 1987, Pascho and Mulcahy 1987, Hsu *et al.* 1991, Sakai *et al.* 1991, Gudmundsdottir *et al.* 1993, Meyers *et al.* 1993a,b, Olea *et al.*, 1993,) *Yersinia ruckeri*, (Austin *et al.* 1986, Barton *et al.* 1989, De Groot and Dixon 1989, Olesen 1991) *Vibrio anguillarum*, (Chart *et al.* 1984, Thuvander *et al.* 1987, Espelid *et al.* 1988) *Vibrio salmonicida* (Hawarstein *et al.* 1990, Bogwald *et al.* 1991, Hanna *et al.* 1991), *Vibrio parahaemolyticus* (Adams 1991), *Myxosoma cerebralis* (Schill *et al.* 1989), *Tetramicra brevifilum*, mikrosporia (Leiro *et al.* 1993), *Diphyllbothrium dentriticum* (Sharp *et al.* 1989), *Cryptobia salmositica* (Sitja-Bobadilla and Woo 1994) *Diphyllbothrium dentriticum*'un (Sharp *et al.* 1989) aranmasında, identifikasyonunda, hızlı serotiplendirilmesinde ve bu patojenlere karşı oluşan antikorların tespitinde kullanılmıştır. Gökkuşağı alabalıklarında *Diplostomun spathaceum* parazitlerine karşı sirkulasyon antikorlarının tespitinde ELISA testi kullanılmıştır (Whyte *et al.* 1987). Tilapia balıklarında immunize edilen anneden embryoya spesifik antikor geçişinin tespitinde ELISA testi kullanılmıştır (Mor and Avtalion 1990).

2.8. Enterik Kızıl Ağız Hastalığı

Bu hastalık, enterik bakterilerden *Yersinia ruckeri*'nin sebep olduğu Amerika ve Avrupa' da salmonid balıklarda ve özellikle gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olan septisemik kontagiyoz bakteriyel bir enfeksiyondur (Ross *et al.* 1966, Busch 1982, Bullock and Anderson 1984, Frerichs and Roberts 1989, Bullock and Cipriano 1990, Davies 1991a,b).

2.8.1. Hastalığın Tarihçesi

ERM hastalığı, Amerika Birleşik Devletleri'nin Idaho eyaletinin Hagerman Vadisi'nde, Gökkuşağı Alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde yüksek mortaliteye neden olan ve septisemi ile seyreden hastalık olarak bildirilmiştir (Ross *et al.* 1966, Busch 1982, Bullock 1989, Shotts and Teska 1989). Ross *et al.* (1966) hastalığı dünyada ilk defa tanımlamış ve etkene Red Mouth (RM) bakterisi ismini vermiştir. Daha sonra hastalığın ilk defa

görüldüğü vadinin adından dolayı Hagerman red mouth adı verilmiştir. Ancak, Amerikan Balıkçılık Birliğinin, Balık Sağlığı Bölümü, hastalığın sebep olduğu etkeni *Enterobacteriaceae* familyasından olduğunu hatırlatarak, hastalığın ismini enteric red mouth (ERM) olarak değiştirmiştir. ERM hastalığının ilk görülmesinden bu zamana kadar çeşitli literatürlerde kızıl ağız hastalığı, kızıl boğaz hastalığı, kızıl karın hastalığı, Hagerman kızıl ağız hastalığı, bakteriyel hemorajik septisemi isimleri şeklinde de belirtilmiştir (Busch 1982).

ERM hastalığı, ABD'de 1950 yılından sonra, bu ülkenin bir çok bölgesine yayılmış ve Kuzey Amerika bölgesindeki alabalık ve salmon yetiştiriciliği yapılan bölgelerde ERM hastalığı endemik enfeksiyon olarak belirtilmiştir (Busch 1982). ERM hastalığı, Avustralya (Bullock *et al.* 1977, Llewellyn 1980), Kanada (Stevenson and Daly 1982), İngiltere (Roberts 1983), Fransa (Lesel *et al.* 1983), Almanya (Fuhrman *et al.* 1983), Danimarka (Dalsgaard *et al.* 1984), İtalya (Giorgetti *et al.* 1985), Norveç (Sparboe *et al.* 1986), Güney Afrika (Bragg and Henton 1986), Finlandiya (Rintamaki *et al.* 1986), İspanya (De La Cruz *et al.* 1986, Romalde *et al.* 1994), İskoçya (Dear 1988), Macaristan (Szakolczai *et al.* 1989), Polonya (Grawinski 1990), Yunanistan (Savvidis 1990), Yugoslavya (Jencic *et al.* 1991), Venezuela (Alvarez *et al.* 1992), Kuzey İrlanda (McCormick and McLoughlin 1993) gibi değişik ülkelerden rapor edilmiştir.

Türkiye'de ise Timur ve Timur 1991 yılında Denizli'deki bir alabalık işletmesi gökkuşağı alabalıklarında çıkan bir epizootikte *Yersinia ruckeri*'yi izole ve identifiye ederek ERM hastalığının görüldüğünü bildirmişlerdir (Timur and Timur 1991).

2.8.2. Epizootiyoloji ve Patogenezis

2.8.2.1. Hastalığın Konakçıları

Hemorajik septisemi ile karakterize olan ERM hastalığı genel olarak alabalık ve salmon balıklarının hastalığı olarak dikkati çekmektedir. Ancak ERM hastalığı gökkuşağı alabalıklarında çok daha yaygın olarak görülmektedir. Bununla birlikte, çelikbaş alabalığı (*Salmo gairdneri*), kızılgerdanlı alabalık (*Salmo clarki*), kahverengi ala (*Salmo trutta*), dere alası (*Salvelinus fontinalis*), Coho salmonu (*Oncorhynchus kisutch*) ve Sockeye salmonu (*Oncorhynchus nerka*) (Busch 1982, De Kinkelin *et al.* 1985, Frerichs and Roberts

1989, Austin and Austin 1993) Atlantik ve Pasifik salmonu gibi diğer salmonidlerden izole edildiği bildirilmiştir (Bullock and Cipriano 1990, Austin and Austin 1993). *Yersinia ruckeri* patojeni salmonid olmayan diğer balıklardanda izole edilmiştir. *Yersinia ruckeri*; *Notropis atherinoides*, (De Kinkelin et al. 1985) havuz japon balığı (*Carassius auratus*) (Ellis 1988d), sazan (*Cyprinus carpio*) (Austin and Austin 1993) *Coregonus artedii*, *Piemephales promelas*, yılan balığı (*Anguilla anguilla*), *Psetta maxima* (De Kinkelin et al. 1985) mersin balığı, *Acipenser baeri* (Vuillaume et al. 1987) *Coregenus sp.*, *Rutilus rutilus*, tatlı su levreği, *Perca fulviatilis* (Valtonen and Jokinen 1989), *Coregenus peled*, *Coregenus muskun* (Rintamaki et al.1986) gibi balıklardanda izole edilmiştir. Ayrıca tatlı su invertebrallarından ve misk sıçanından izole edilmiştir. Kalkan (*Scophthalmus maximus*), deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*,) Çipura (*Sparus auratus*), gibi yetiştiriciliği yapılan deniz türlerinde de ERM hastalığının etkili olduğu bildirilmiştir (Vuillaume et al 1987).

2.8.2.2. Hastalığın Rezervuarları ve Taşınması

Enfeksiyonun rezervuarları taşıyıcı salmonid balıklardır. Bakteri portör gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarının son kısmından ve aynı zamanda dışkıdan izole edilebilir (Hunter 1980, Busch 1982). Gökkuşağı alabalıkları için patojenik *Yersinia ruckeri* suşları sağlıklı görünen coregonidler, *Lola lola* ve *Carassius auratus* 'tan izole edilmiştir. Ayrıca bu bakterilerin akuatik invertebrallardan ve misk sıçanında izole edilmesi bu canlıların bulaşmaya neden olabileceğini düşündürmektedir. *Yersinia ruckeri* ' nin neden olduğu epizootik bir enfeksiyon sonucunda canlı kalan alabalıklarda 45 gün sonra yapılan portörlük muayenesinde sağlıklı görünen gökkuşağı alabalıklarının % 25' nin bağırsaklarının son kısmında *Yersinia ruckeri* izole edildiği görülmüş ve bu nedenle enfeksiyonu atlatanların portör hale geldiği bildirilmiştir. Bağırsaklarda enfeksiyon etkenleri enfeksiyonun yeniden tekrarlanmasını, patojenin sürekli olarak suya bırakılmasından dolayı 14.5°C deki su sıcaklığında 30-40 günde bir enfeksiyonun yenilenecek mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir (Busch 1982, Busch and Lingg 1975). Portör balıkların strese bağlı olarak hastalığı yayabildiği, stres içinde olmayan portörlerin hastalığı yaymadığı da saptanmıştır. Aseptomatik taşıyıcı balıklarda portörlüğün 100 günden fazla devam ettiği bildirilmiştir (Busch and Lingg1975). Portör balıkların suya verdiği patojen bakteriler duyarlı balıklarda

horizontal bulaşmaya neden olmaktadır. Hastalık etkenin portör veya hasta balıklarla taşındığı ve hastalığın balıktan balığa direkt kontak ile yayıldığı ancak yumurta yolu ile vertikal bulaşmanın olmadığı bildirilmiştir (Busch 1982, Bullock 1989).

2.8.3.Hastalığın İnkübasyon Süresi

ERM hastalığının inkübasyon süresinin popülasyonun stres şartları ve genel sağlık durumları ile su sıcaklığı gibi faktörler etkilemektedir (Busch 1982, Frerichs *et al.* 1985, Rodgers 1991). Enfeksiyon popülasyonda ilk defa görülüyor ise, 15°C su sıcaklığındaki inkübasyon süresinin 5-7 gün olduğu bildirilmiştir. Eğer daha önceden popülasyonda *Yersinia ruckeri* görülmüş ve kronik enfeksiyon mevcutsa, stres şartları altında 3-5 gün içinde hastalık yüksek bir mortaliteyle sonuçlanabilir (Busch 1982, Bullock and Cipriano 1990).

2.8.4. Hastalığın Klinik ve Otopsi Bulguları

ERM hastalığı subakut ve akut bir sistemik enfeksiyondur. İsmi subcutaneous hemorajilerin sebep olduğu ağız ve operkulumun kırmızlaşmasından almaktadır (Ellis 1988d). Enfekte balıklarda damak ve çenede inflamasyon ve erozyon, yüzgeçlerin tabanında hemoraji ve bilateral exophthalmus, hiperpigmentasyon, gözlerin çevresinde hemorajiler, çıkıntılı anüs (prolapsus), anüste hemoraji ve kan toplanması (congestion), ve bağırsaklarda sarı renkli müköz bir sıvı mevcuttur (Ashburner 1989, Bullock 1989, Bullock and Cipriano 1990) Balıklar genellikle halsiz ve iştahsız olarak gözlenmiştir. Karaciğerin yüzeyi pankreas, pilorik seka ve yüzme kesesinde, adipoz dokuda, diğer viseral mesenteriumda ve lateral kaslarda peteşiyal hemorajiler görülür. Dalak büyümüş ve gevrekleşmiştir. Gonadlar genellikle kızarmış ve hemorajiktir. Bağırsağın son kısmı karakteristik olarak gevşek, hemorajik yangılı, yoğun opak purulent mukoid materyal ile doludur (Busch 1982, Bullock and Anderson 1984, Ellis 1988d, Ashburner 1989).

ERM hastalığında özellikle enfeksiyonun başlangıç durumunda balıklar diğer akut bakteriyemi yapan hastalıklardan aeromonad septisemi (*Aeromonas hydrophila*),

frunculosis (*Aeromonas salmonicida*) ve vibriosis (*Vibrio anguillarum*) gibi diğer hastalıklara benzer semptomlar gösterir (Busch 1982).

2.8.5. Histopatolojik Değişiklikler

Histopatolojik incelemelerde mide ve bağırsak mukozasında nekroz, sirküler ve longitudinal kas tabakalarında inflamatorik selüler infiltrasyon ve hemoraji gözlenir. Nekrotik mukoza lümen içine dökülmüştür. Pankreas ve vücut yağlarında nekroz vardır. Böbrek ve karaciğerde konjesyon ve peteşiyal hemorajiler görülür. Böbrek tübül hücrelerinin çoğu nekrotik ve internal hemapoietik dokuda azalma dalak ve solungaçlarda konjesyon ve dalağın lenfoid dokusunda azalma saptanmıştır (Timur and Timur 1991). Vaskularize dokuların kapillar damarlarında bakteri kolonizasyonlarını takiben böbrek, karaciğer, dalak, kalp, solungaçlar ve kaslar gibi yüksek vaskularize dokularda hemoraji görülmektedir. Tüm organlarda inflamatorik reaksiyon vardır. Böbrek ve dalaktaki hemapoietik elementlerin nekroze olması ve lenfoid foliküler yapıların total kaybı sonucu akut anemi görülür. Bakteri hematokrit değerlerin düşmesine, kanda retikulosit, eritroblast ve lenfoblastların sayısının artmasına neden olmaktadır (Busch 1982). Beyin ve göz damarlarında kapiller konjesyon görüldüğü belirtilmiştir (Frerichs and Roberts 1989).

2.8.6. Morbidite ve Mortalite

ERM hastalığı özellikle yetiştiricilik şartları altında balıklarda stresle ilişkili, kronik ve akut seyreden bir hastalıktır. Akut epizootik enfeksiyonlarında, populasyonun %30-70'nin kaybına neden olabilir. Ancak bu oran balığın boyu, su sıcaklığı, stres seviyesi gibi faktörlere bağlıdır. Kronik epizootik enfeksiyon sonrası populasyonunda canlı kalan semptomatik ve asemptomatik portör balıklarda hastalık yeniden nüks eder ve düşük mortalite ile seyreder. Aşırı stres durumu ek epizootik enfeksiyona ve önemli kayıplara neden olabilir (Busch 1982).

2.8.7. Doğal Kazanılan İmmunite ve Nükseden Enfeksiyonlar

ERM hastalığının doğal epizootik enfeksiyonlarını takiben doğal kazanılmış immunité serum antikor titreleri şeklinde ilk olarak Klontz tarafından gösterilmiştir. Gökkuşakđı alabalıklarının kültür popülasyonlarında *Yersinia ruckeri* doğal epizootiklerini takiben koruma immunitésinin gelişmesi esnasında serum makroglobulin ve antikor titrelerini tespit etmiştir. Bununla beraber, ERM hastalığında doğal epizootiklerin tam bir koruma vermediği ve hastalığın balıklara uygulanan seleksiyon, taşınma gibi işlemlerden ve fazla popülasyon yoğunluğunda tutulmasından kaynaklanan aşırı stres nedeniyle yeniden nüks edebileceği bildirilmektedir (Busch 1982).

2.8.8. Teşhis

ERM hastalığının diagnozu hasta balık popülasyonundan alınan tipik semptom gösteren balığın böbreğinden *Yersinia ruckeri*'nin izolasyonu ve identifikasyonuna dayanır. Primer izolasyon; hasta balıkların böbrek, karaciğer ve dalak gibi viseral organlarından trypticase soy agar (TSA) veya beyin kalp infuzyon agar (BHI) gibi bakteriyolojik vasatlara ekilerek yapılır. Tipik *Y.ruckeri* kolonileri 20-25 °C de 24-48 saat inkübasyonu takiben oluşmaktadır (Ross *et al.* 1966, Busch 1982, Shotts and Teska 1989, Grawinski 1990). ERM hastalığının tahmini teşhisinin temelinde primer izalasyondan sonra Gram negatif ve sitokrom oksidaz negatif basiller elde edilmesi yeterlidir. *Yersinia ruckeri*'nin kesin teşhisi ve identifikasyonu biyokimyasal ve serolojik metotlara dayandırılmalıdır (Busch 1982).

Yersinia ruckeri bakterisinin izolasyonu için iki farklı selektif ortam tanımlanmıştır (Austin and Austin 1993). Bu ortamlardan birisi tween 80, sukroz ve bromtimol mavisi indikatörü içeren Shotts-Waltman selektif ortamıdır (SWM) (Waltman and Shotts 1984). Bu ortamda *Yersinia ruckeri* kolonileri yeşil renkte ve etrafı hidroliz zonu ile çevrilidir (Waltman and Shotts 1984, Sanders and Fryer 1988). Ancak *Yersinia ruckeri* suşları arasında Tween 80 hidrolizasyonu ve sukroz kullanımında farklılıklar bildirilmiştir. *Yersinia ruckeri* 'nin U.K. izolatları Tween 80'ni nadiren hidrolize etmişlerdir (Austin and Austin 1993, Frerichs and Roberts 1989). *Yersinia ruckeri* 'nin izolasyonunda 2.selektif

differentiyel besiyeri, riboz ornitin deoksilat agar (ROD) vasatıdır. *Yersinia ruckeri* bağırsak ve dışkılarından izolasyonda ROD besiyerinin önem taşıdığı belirtilmiştir. ROD besiyerinde 26 °C de 72-96 saat inkübasyon sonrasında *Yersinia ruckeri* 01 ve 06 serotipleri kırmızı ortam üzerinde sarı koloniler oluşturur (Rodgers 1992).

Asemptomatik portör balıkların teşhisi bağırsağın arka bölgesinden yapılacak izolasyonlarla yapılır. Bununla beraber bağırsağın arka bölgesinden çok değişik mikroorganizmalar bulunduğu için *Yersinia ruckeri* diğer bakteriler ile karıştırılabilir veya bakteriler onu örtebilir (kamufle edebilir). Yalancı pozitif reaksiyonu önlemek için biyokimyasal ve serolojik testlerle identifikasyon yapılmaktadır (Busch 1982).

Bir balık populasyonunda daha önce *Yersinia ruckeri* patojeni ile karşılaşmış ve karşılaşmadığı bu balıkların kanında spesifik doğal antikorların varlığının tespit edilmesi ile anlaşılır. Bu tip serolojik hastalık inceleme yöntemi genellikle canlıya zarar vermeden büyük populasyonlardan küçük hacimli çok sayıda örnek alarak hızlı ve ucuz yöntemlerle incelenmesine olanak sağlar. Liyofilize edilmiş ve hassaslaştırılmış lateks partikülleri kullanılarak yürütülen plate aglutinasyon ve mikromodifiye tüp aglutinasyon titrasyon testleri gibi hassas ve kalıcı serolojik yöntemlerin sahada ve laboratuvarında etkili bir şekilde kullanılabileceği bildirilmektedir. Klinik *Yersinia ruckeri* izolatlarının identifikasyon konfirmasyonu (kesinleşmesi için) en hızlı ve en çok kullanılan yöntem spesifik diagnostik antisera kullanımınıdır. Primer izolattan alınan muhtemel bir kolonin *Yersinia ruckeri* olarak konfirmasyonu spesifik diagnostik antisera kullanılarak gerek plate aglutinasyon testi gerekse floresans antikor yöntemi ile sağlanır. Plate aglutinasyon testi çabuk ve kolay uygulanır ve ek özel alete ihtiyaç yoktur, antiseranın çapraz veya non-spesifik reaksiyonundan kaynaklanabilecek hatalara karşıda hassas değildir (Busch 1982).

Fluorescent antikor tekniği (FAT) gerek direkt gerekse indirekt olarak uygulanan bir yöntemdir. Klinik muayenede hasta dokulardan hazırlanan frotilerin direkt olarak kullanılmasını imkan sağladığı için *Yersinia ruckeri* için hızlı bir konfirmasyon avantajını sağlar (Johnson *et al.* 1974, Busch 1982).

Saf kültürler geleneksel diagnostik tablolar, seroloji ve API 20E sistemi gibi hızlı diagnostik metodlarla identifiye edilebilir (Stevenson and Daly 1982, Frerichs *et al.* 1985, Vuillaum *et al.* 1987, Dear 1988, Davies and Frerichs 1989, Romalde and Toranzo 1991). Ancak API 20E ile identifikasyonlarda *Yersinia ruckeri*, *Hafnia alvei* ile karışabilmektedir (

Santos *et al.* 1993). Serodiagnoz asemptomatik enfeksiyonların teşhisinde ve ortaya çıkarılmasında başarı ile kullanılmıştır. Özellikle indirekt fluoresans antikor tekniği (Johnson *et al.* 1974), indirekt enzyme-linked immunosorbent assay (Cossarini-Dunier 1985, Austin *et al.* 1986, Olesen 1991), lateks aglutinasyon testi , peroxidase-antiperoxidase immuno histokimyasal teknikler (Jansson *et al.* 1989,1991) kullanılmaktadır. Direkt ve indirekt FAT prosedürünün avantajı hasta dokuların ezme preparatlarından direkt olarak hızlı bir şekilde teşhis edilebilir olmasıdır. Bununla birlikte FAT tekniği fluoresans mikroskop gerektirmektedir ve çapraz reaksiyon ve non-spesifik problemlerden dolayı hatalı identifikasyona neden olabilir. ERM hastalığının hızlı teşhisi için direkt fluoresans antikor tekniği ile yapılan çalışmalarda *Serratia liquefaciens* ve *Hafnia alvei* ile çapraz reaksiyon verdiği bildirilmiştir (Shotts and Teska 1989). Serolojik identifikasyonda tip I ve tip II aglutinasyon ve fluoresans antikor tekniği ile serolojik olarak identifiye edilebilmektedir (Davies 1991a). Lateks partikül sistem, plate aglutinasyon, mikromodifiye tüp aglutinasyon titrasyon testleri hem sahada hem de laboratuvarlarda etkili olduğu bildirilmiştir (Busch 1982).

2.8.9. Enterik Kızıl Hastalığının Kontrolü

Salmonid işletmelerindeki ERM ' nin ticari önemi nedeniyle hastalığın kontrolü için aşuların ve antimikrobiyal ilaçların kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışmalar yapılmaktadır (Rodgers 1991, Austin and Austin 1993).

2.8.9.1. Tedavi

Klinik ERM vakalarının kontrolünde önceleri sülfamerazine ve oxytetracycline (Ross 1966), metilen mavisi ve oxytetracycline (Llewellyn 1980), sülfanamidler (Bullock *et al.* 1983), tiamulin (Bosse and Post 1983) ve oxolonic acid (Rodgers and Austin 1983, Rodgers 1991) gibi antimikrobiyal bileşikler tedavide kullanılmıştır. Tedavide ilk başarı sülfamerazine içeren ilaçlı yemler (200 mg/kg balık vücut ağırlığı) 3 gün süre ile uygulanması ile elde edilmiştir. Daha sonra oxytetracycline (50 mg/kg balık vücut ağırlığı) tedavi amacıyla uygulanmıştır (Bullock *et al.* 1971, Frerichs *et al.* 1985, Rodgers 1991).

Metilen mavisi yem içerisinde (1 gr/kg yem) 5 gün süre ile kullanımını takiben oxytetracycline (66 mg/kg balık vücut ağırlığı 10 gün süre ile) verilen balıklarda ve daha sonra 5 gün süre ile metilen mavisi uygulanarak işletmede 10-14 gün içinde hastalığın temizlendiği bildirilmektedir. Diğer bazı araştırmacılar sülfanamidlerin bu hastalığa karşı başarılı ile kullanıldığını bildirmişlerdir. Sulphadimethoxime ve ormetropim karışımının (50 mg/kg balık vücut ağırlığı 5 gün süreyle) etkili olduğu belirtilmiştir. Sülphadiazine ve trimethoprim kombinasyonlarının çok düşük dozlarının 1 mg/kg balık vücut ağırlığı/günlük 14 gün süre ile başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir. Tiamulinin (5 mg/kg balık vücut ağırlığı) dozda 14 gün süre ile kullanımında başarılı olmuştur. Oxolonin acid' in (10mg/kg balık vücut ağırlığı/günlük 10 gün süre ile) bu hastalığa karşı etkili olduğu bildirilmektedir (Austin and Austin 1993).

Çeşitli kemoterapotiklere karşı *Yersinia ruckeri*' nin hassasiyeti *Ceschia* ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmaya göre flumequine ve nalidixic acid' in (0.078 µg/ml) en aktif maddeler olduğu ve bunları sırası ile oxytetracycline (0.312 µg/ml) gentamicin ve nitrofurantion (0.625 µg/ml) tetracycline (1,25 µg/ml), neomiyicin, chloromphenicol ve chlortetracycline (2,5 µg/ml) erythromycin ve furazolidone (50 µg/ml) izlediği bildirilmiştir (Ceschia *et al.* 1987).

2.8.9.2. Aşılar

ERM hastalığına karşı ilk başarılı deneysel aşı çalışmaları Ross ve Klontz tarafından 1965 yılında rapor edilmiştir. Bu uygulamada fenolle inaktive edilen bakteriler gökkuşağı alabalıklarına haftada 5 kez yem ile 2 hafta süre ile oral olarak verilerek immunize edilmiştir. Bu immunize balıklara 70 gün sonra canlı patojen enjekte edildiğinde balıkların % 90' nında hastalığa karşı koruma görülmüş ve bu koruma testten 408 gün sonra da devam etmiştir (Ellis 1988d).

Oral immunizasyon için bakterin üretiminde çeşitli metodlar test edilmiştir. Bunların arasında % 0.5 - % 3 fenol ; % 3 kloroform, % 1 formalin ve tüm bakteriyel süspansiyonun sonikasyonu bulunur. Tüm inaktivasyon preparasyonlarında koruma oluşmuş fakat kloroformla inaktive edilen bakterinler çok daha etkili bulunmuştur. (Anderson and Ross 1972). *Yersinia ruckeri* aşısının gücünü etkileyen faktörler üzerinde çalışılmıştır. *Yersinia*

ruckeri' nin 6.5-7.7 pH aralığında 96 saat kültüre edilen triptic soya broth kültürlerinden hazırlanan bakterinlerin gücünü olumsuz etkilemediği görülmüştür. Fakat aşının güvenliği ve üretim kolaylığı açısından formalin en uygun olanıdır. En güçlü aşların elde edilmesi bakteri kültürlerinin pH 7.2' de 48 saat bakteri kültürleri pH 9.8' de 1-2 saat içinde eritilir ve % 0.3 formalin ile lysate inaktive edilir. Bu bakteriler 10 veya 20 defa sulandırılır ve balıklar en az 5 saat daldırılarak aşılanır (Ellis 1988d, Amend *et al.* 1983).

Yersinia ruckeri aşuları, yem içinde oral yolla (Anderson and Ross 1972, Anderson and Nelson 1974), enjeksiyonla (Anderson and Nelson 1974, Johnson and Amend 1983a, Cossarini-Dunier 1986a, Barton *et al.* 1989, Erdal 1989), immersiyon, banyo , sprey, (Anderson *et al.* 1979, Johnson *et al.* 1982a,b ,Johnson and Amend 1983a, Tatner and Horne 1985,Tanrikul 1994) ve anal intübasyonla (Johnson and Amend 1983b, Barton *et al.* 1989) uygulanmıştır. Oral metod korumanın kısa süreli olmasından dolayı kullanışlı olmamaktadır (Austin and Austin 1993). Kloroformla inaktive edilen *Yersinia ruckeri* aşuları oral ve enjeksiyon yolu uygulanarak karşılaştırılmıştır. Enjeksiyonla daha uzun süreli yüksek seviyede koruma olduğu saptanmıştır. Oral yolla 7 gün yem içerisinde aşının verilmesi ile immunize edilen alabalıklarda hiçbir antikor bulunamamış oysa enjeksiyon yapılan alabalıklarda 1/16-1/32 düşük titreli antikor ile sonuçlandığı saptanmıştır. Oral yolla aşılanan balıklarda 6 haftada koruma gücü kaybolurken, enjeksiyon yöntemi ile aşılanan balıklarda korumanın 12 haftada devam ettiği tespit edilmiştir (Anderson and Nelson 1974, Austin and Austin 1993). Benzer karşılaştırma enjeksiyon, immersiyon, banyo ve sprey metodları ile yapılmıştır. İntraperitoneal enjeksiyon yapay enfeksiyona karşı en iyi korumayı sağlamıştır. Enjeksiyon, oral yol ve anal intübasyon metodları karşılaştırıldığı bir çalışmada enjeksiyonla ve anal intübasyonla aşılanan gökkuşağı alabalıkları serumlarında antikor bulunurken oral yolla immunize edilen balıklarda antikor bulunamamıştır. Ancak enjeksiyon şeklinde aşılama sadece değerli ve büyük balıklar için uygun olup balık çiftliklerinde milyonlarca fingerling ve fry için uygun değildir (Austin and Austin 1993). Bununla beraber ERM aşuları balık çiftliklerinde banyo şeklinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Anal intübasyon yöntemi ile aşılanan balıklarda banyo ve oral yolla aşılananlardan daha iyi koruma sağlanmıştır (Johnson and Amend 1983b). Salmonid frylarının *Yersinia ruckeri* ve *Vibrio anguillarum* aşularıyla direkt immersiyon yöntemi ile aşılamada su sıcaklığının bağışıklığın başlangıç süresine etkisi çalışılmıştır. İmmersiyonla 5 sn' de aşılanan balıklarda

koruma immunitésinin 18 °C de 5 günde, 10 °C de 10 gün içinde geliştiği virulent organizmalarla mücadeleye tabi tutularak saptanmıştır (Johnson *et al.* 1982a). Balıkların boyu ile koruma arasında korelasyon mevcuttur. *Yersinia ruckeri* ile direkt immersiyon yöntemi ile aşılanan 1 gr'lık balıklarda yaklaşık 120 gün, 2 gr'lık balıklarda 180 gün ve 4 gr'lık balıklarda ise 1 yıl veya daha uzun süre immunitenin devam ettiği tespit edilmiştir (Johnson *et al.* 1982b). Beslenme seviyesinin antikor üretimini etkilediği saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada çok beslenen balıklarda haftalara göre log₂ HA titre değerleri; 1. haftada 0.11, 2 haftada 6.19, 3. haftada 4.51, 5. haftada 3.63, 6. haftada 3.45 olarak tespit edilmiştir (Henken *et al.* 1987).

Direkt immersiyon yöntemi ile aşılmaya tabi tutulan kahverengi alalara (*Salmo turotta*) farklı immersiyon zamanı ve aşı dilüsyonu kullanıldığında yüksek dilüsyonlu aşılamada uygulama süresinin artırılması gerektiği ortaya çıkmıştır. (Tatner and Horne 1985).

Gökkuşağı alabalıkları (ortalama 100 gr ağırlığında) tuzlu su veya yağlı adjuvant içinde *Yersinia ruckeri* bakterileri ile intraperitoneal olarak aşılandığında 444 gün boyunca aglutinasyon antikorlarının kinetiği takip edilerek 1.2×10^7 bakteri ile enfekte etmeden önce enfeksiyon etkenini önemsiz miktarda bulunan antikor titresine rağmen enjeksiyondan 14 gün sonra kontrol balıkların % 88 ölürken aşılanmış balıklarda birkaç balık öldüğü görülmüştür (Cossarini-Dunier 1986a). Bu nedenle *Yersinia ruckeri* 'ye karşı oluşan korumanın antikorlara bağlı olmadığı düşünölmektedir (Cossarini-Dunier 1986a, Barton *et al.* 1989). Bir yaşındaki Gökkuşağı alabalıklarına 1 mg dinitrofenol-limpet hemocyanin (DNP) ve 10⁹ formalinle inaktive edilmiş *Yersinia ruckeri* intraperitoneal olarak enjekte edilerek immunize edilmişlerdir. Balıkların düzenli olarak kanlarındaki antikor miktarı pasif hemaglutinasyon ve aglutinasyon testleri ile saptanmıştır. Deney ve kontrol gruplarına ikinci kuvvetlendirici (booster) enjeksiyon uygulandığında DNP-hemocyanin enjekte edilen balıklarda sekonder yanıt oluşmadığı görülürken bakteriyel antijen enjekte edilen balıklarda sekonder yanıtın oluştuğu ve primer yanıtı kuvvetlendirdiği görülmüştür (Cossarini-Dunier 1986b, Mughal and Mannig 1986).

Cipriano and Ruppenthal (1987) dere alası (*Salvelinus fontinalis*) balıkların *Yersinia ruckeri* patojenin serotip 1 ve serotip 2 bakterileri ile immunize ettiklerinde çapraz bir

koruma oluşturduklarını tespit etmişlerdir. *Yersinia ruckeri* ' nin farklı serotiplerinin oluşturduğu çapraz koruma reaksiyonu salmon balıklarında da tespit edilmiştir (Erdal 1989).

Gökkuşağı alabalıklarında *Yersinia ruckeri*'ye karşı oluşan antikorların tespitinde enzyme-linked immunosorbent assay testi geliştirilerek kullanıldığında bu testin aglutinasyon testinden daha hassas olduğu ve daldırma suretiyle aşılanan alabalıklarda oluşan dūřuk yüzdeli antikorlar bile tespit edilmiştir (Olesen 1991).

2.9. *Yersinia ruckeri*

Enterobakterilerin karakteristik özelliğini gösteren Gram negatif bakteriyel balık patojenidir. Bu patojen gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* ,Walbaum) akut bakteriyel bir enfeksiyon olan enterik kızıl ağız hastalığına (ERM) neden olmaktadır.

2.9.1. Etiyoloji

2.9.1.1. Klasifikasyon

ERM hastalığının etkeninin izolasyonu 1950 yılında Rucker tarafından yapılmış ve bu etken Ewing *et al.* tarafından identifiye edilerek *Yersinia ruckeri* olarak isimlendirilmiştir (Ross *et al.* 1966, Ewing *et al.* 1978, Busch 1982, Davies and Frerichs 1989 , Frerichs and Roberts 1989, Bullock and Cipriano 1990).

2.9.1.2. Morfolojik Özellikleri

Yersinia ruckeri kısa (1,5-2 μm x 0,5 μm), Gram negatif, peritrichious flagellaya sahip hareketli (motile), tek tek yada kısa zincirler oluşturan bir basildir. (Ross *et al.* 1966, Bullock *et al.* 1971, Anderson 1974, Busch 1982, Pyle *et al.* 1987, Frerichs and Roberts 1989). *Yersinia ruckeri* kùltürleri 18-27°C'de aktif hareket gösterirken, 9°C'deki inkübasyonda flagella mevcut olmasına rağmen hareketsizdirler. 35 °C deki inkübasyonda ise flagella olmadığından dolayı tamamen hareketlerini kaybederler (Busch1982).

2.9.1.3. Koloni Morfolojisi

Trypticase Soy Agar (TSA) ortamında *Yersinia ruckeri* kolonileri 1-2 mm çapında düz, hafif konveks, kabarık, yuvarlak, beyaz ile krem renginde yarı şeffaf koloniler vermektedir(Busch 1982, Austin and Austin 1993).

2.9.1.4. Üreme İhtiyaçları

Yersinia ruckeri TSA, brain heart infusion agar (BHIA) gibi rutin bakteriyolojik ortamlarda aerobik ve anaerobik gibi şartlarda kolayca izole edilebilir. 20-25°C'de 48 saat inkübasyonu takiben koloniler gelişir. *Yersinia ruckeri*, 9-37°C'ler gibi geniş sıcaklık aralığında üreyebilmektedir. En iyi üremenin olduğu optimum sıcaklık 20-25°C'lerdir (Busch1982, Stevenson and Daly 1982, Sanders and Freyer 1988).

Yersinia ruckeri'nin izolasyonu için iki selektif vasat geliştirilmiştir. Bunlardan ilki Tween 80, sukroz ve bromtimol mavisi indikatörünü içeren Shotts-Waltman vasatıdır, (SWM) (Waltman and Shotts 1984) ikincisi ise daha sonra Rodgers tarafından geliştirilen ribose ornithine desoxycholate agar (ROD) vasatıdır(Rodgers 1992).

2.9.1.5. Antijenite ve Serolojik Özellikleri

Yersinia ruckeri bakterisinin 6 farklı serotipi mevcuttur (Stevenson and Airdrie 1984, Romalde *et al.* 1989, Davies 1991a,b). Bunlardan tip1 (Hagerman Suşu) çok yaygın olarak görülen bir serotiptir. Virülensi yüksek olan bu organizma Kuzey Amerika'da endemik olarak yayıldığı için buradaki ERM hastalığının klinik vakalarında veya semptom göstermeyen subklinik taşıyıcı (portör) vakalarından izole edilmektedir. Tip2 (O'Leary Suşu veya Big Creek Suşu) tip1'den daha az virulent olup doğal olarak oluşan durumlarda çok sayıda ölümlere neden olmamaktadır. Tip 2 *Yersinia ruckeri* özellikle Kuzey Amerika' daki geriye dönen mature pasifik salmon balıklarında, USA' nın batısında ve Kanada' daki diğer salmonid balıklarda görülmektedir. Tip3 (Avustralya suşu) sadece Avustralya'daki gökkuşağı alabalıklarından izole edilen avirulent bir suştur. En son olarak serotip 4 ve 5 suşları ile ve serotip 6 suşunun bulunduğu bildirilmektedir. Serotip 4' ün virülensi

bilinmediği, serotip 5 ise virülensinin çok düşük olduğu bildirilmektedir (Ellis 1988). *Yersinia ruckeri*'nine ilk 3 serotipinde bir veya daha fazla spesifik somatik "O" lipopolisakkarit antijenlerine sahiptir (LPS)(Trust 1986). Bakterinin bu özelliği bu bakterinin diğer balık bakterileri ve *Yersinia ruckeri*'nin diğer serotipleri ile cross (çapraz) reaksiyonlara neden olabilmektedir. *Yersinia ruckeri* de flagellar "H" antijenlerinin varlığı ortaya konulmasına karşılık, serotipler arasında "H" antijenlerinin farklılıkları geniş çapta araştırılmamıştır (Busch 1982).

Ross et al (1966) ERM organizmalarının 14 kültüründen hazırladıkları O antijenlerini *Salmonella* (=Arizona) bakterinin oluşturduğu antisera ile yaptıkları aglutinasyon testinde çapraz reaksiyon verdiklerini tespit etmişlerdir.

Aglutinasyon ve FAT teknikleri ile yapılacak teşhislerde O antijenine karşı hazırlanmış antiseralar yerine tüm bakteriye karşı hazırlanan antisera kullanılmasını tavsiye edilmektedir. Balıklardan izole edilen *Salmonella* (Arizona), *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica* ve *Hafnia alvei* gibi enterik bakteri izolatlarıyla yapılan lam aglutinasyon testlerinde çapraz reaksiyonlar görüldüğü bildirilmiştir (Stevenson ve Daly 1982). Bu çapraz reaksiyonlara bütün enterobakteri hücrelerini saran bir glikofosfolipid katmanı (Enterobacterial Common Antigen, ECA) neden olmaktadır (Busch 1982).

Yersinia ruckeri'nin 3 serotipi arasında çapraz reaksiyonun bulunmadığı homolog ve heterolog antisera kullanılarak mikromodifiye tüp aglutinasyon ve IFAT testleri ile saptanmıştır (Bullock et al. 1978).

Yersinia ruckeri diagnostik antiserasının *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Renibacterium salmoninarum* gibi başlıca balık patojenleri ile önemli bir serolojik çapraz reaksiyon vermediği bildirilmiştir (Anderson and Dixon 1984, Busch 1981).

2.9.1.6. Biyokimyasal Karakterleri

Yersinia ruckeri'nin biyokimyasal karakterlerinde serotipler arasında önemli bir farklılığın olmadığı ve sadece tek bir biyotip gösterdiği bildirilmiştir (Busch 1982, Frerichs and Roberts 1989). Bununla birlikte, bir çok araştırmacı tarafından *Yersinia ruckeri*

serotiplerinin sorbitolü fermente etme kabiliyetinin değişebileceği bildirilmiş ve serotip2'nin sorbitolü fermente etmesinin pozitif olması ile diğer serotiplerden farklı olduğu belirtilmiştir(Schill et al 1984, Stevenson and Airdrie 1984, Cipriano and Pyle1985, Cipriano et al. 1986 ,1987, Pyle et al. 1987, Stave et al. 1987, Davies and Frerichs 1989 Bullock and Cipriano 1990, Davies 1991a) .

Yersinia ruckeri ile yapılan biyokimyasal çalışmalarda inkübasyon sıcaklığının 22-25°C'ler arasında olması gerektiği, optimum sıcaklıkların dışında yapılan testlerde hatalı pozitif ve negatif sonuçlar elde edilebileceği bildirilmiştir (Busch 1982).

Yersinia ruckeri izolatlarının Gram negatif, hareketli, oksidaz negatif, katalaz pozitif, O/F glikoz ortamında fermantatif ve nitritleri nitratlara indirgemesi özellikleri ile enterik bakterilerin karakteristik özelliğine sahiptir. *Yersinia ruckeri*, *Yersinia* cinsinin diğer türlerinden jelatin ve dekarboksilaz eritmesi ile farklılık göstermektedir. Tween80, sukroz ve bromtimol mavisi içeren selektif besiyerinde *Yersinia ruckeri* kolonileri yeşil renkli olup, bir hidroliz zonu ile çevrilmiş durumdadır. Enterik bakterilerden diğer balık patojeni *Edwardsiella*'nın iki türü de bu vasatta yeşil renkli koloniler oluşturur, fakat her iki türde de bir hidroliz zonu görülmez. Bu ortamda *Aeromonas hydrophila* ve *Enterobacter* sarı renkli koloniler oluşturur, bu kolonilerin etrafında hidroliz zonu bulunur veya bulunmayabilir (Sanders and Fryer 1988, Shotts and Teska 1989).

2.9.1.7. Patojenite ve Virülens

Yersinia ruckeri'nin suşları arasındaki serolojik varyasyonlarında patojenite farklılığı görülmemektedir (Cipriano et al. 1987, Frerichs and Roberts 1989). *Yersinia ruckeri*, sıcaklığın 10°C'nin üzerinde olması halinde hastalık oluşturmaktadır. Hastalığın en şiddetli noktası 15-18°C'dir. Hastalığın 10°C'nin altında mortalitesi oldukça düşüktür. Aynı zamanda aşırı beslenmiş ve stresli balıkların daha hassas olduğu görülmektedir (Austin and Austin 1993, Frerichs and Roberts 1989). Sublethal bakır konsantrasyonuna (7µg/l 96saat) maruz bırakılan balıklarda *Yersinia ruckeri*'nin çok çabuk hastalık oluşturduğu bildirilmiştir (Busch 1982).

Yersinia ruckeri'nin 24 saat broth'da üretilmiş kültürlerinin 640 nm'de spektrofotometre ile %0,50 geçirgenlik veren yoğunluktaki bakteri dilüsyonu hazırlanarak,

banyo yaptırılmasıyla, balıkların tamamında enfeksiyon meydana geldiğini, 15°C'de mortalitenin 28 gün içinde %30'dan %70'e kadar değiştiğini bildirmiştir (Busch 1982). *Yersinia ruckeri*'nin serotip 1 ve serotip 2 arasındaki virülens farklılıklarında 10g'lık gökkuşağı alabalıklarına 90 saniye serotip1 ve serotip 2 inokulasyonları ile banyo yaptırılması süratiyle enfekte edilen balıklarda 15 günde deneysel enfeksiyonlarla tespit edilmeye çalışılmıştır. Serotip 1 ile banyo etmek suretiyle enfekte edilen balıklarda 15 gün içinde % 65- % 90 mortalite görülürken serotip 2' de % 0 -20 mortalite tespit edilmiştir. Bu sonuçlar tip 2 *Yersinia ruckeri* suşunun tip 1 *Yersinia ruckeri* suşundan daha az virulent olduğunu göstermiştir. Bu çalışmayla *Yersinia ruckeri* LD 50 değerinin tip1 ile banyo edilen balıklarda 3×10^5 hücre/ml, tip 2' nin $1,0 \times 10^7$ olduğunu saptamıştır (Bullock *et al.* 1981, Bullock and Anderson 1984).

Virülens faktörlerinin ne olduğu kesin olarak bilinmemekle beraber virulenste plasmidlerin rolü olabileceği gösterilmiştir (Busch 1982, Austin and Austin 1993). Daha fazla virulense sahip tip 1 izolatlarının büyük 40-50 Mdal plasmidlere sahip olduğu ve bazı küçük 20-30 Mdal plasmidleri içerdiği gösterilmiştir (Bullock and Anderson 1984, Stave *et al.* 1987, Romalde *et al.* 1989, Austin and Austin 1993) . Tip 2'de ise büyük plasmidlerin olmadığı bildirilmiştir. Bununla beraber büyük plasmidlerin patojenitedeki rolünün açıklanması için daha çok araştırmanın yapılması gerekmektedir (Austin and Austin 1993).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Balık Materyali

Araştırmada kullanılan gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) Bağcı Su Ürünleri (Beyobası Köyü, Köyceğiz-MUĞLA) ve Pınargözü Alabalık İşletmesinden (Aksu-İSPARTA) temin edilmiştir. Denemede kullanılan bu balıkların daha önce geçmişte ERM hastalığını geçirmediği işletme sahiplerinden öğrenildiği gibi deneme öncesi 30 gün adaptasyona tabi tutulan bu balıkların herhangi bir hastalığa ait klinik semptom göstermedikleride tespit edilmiştir. Buna ek olarak balıkların adaptasyonu sırasında rastgele bir kaç balık örnek olarak alınmış otopsi yapılarak, bakteriyolojik vasatlara bazı viseral organlardan ekim yapılarak balıkların bakteriyolojik olarak patojen bir bakteri taşımadıkları tespit edilmiştir.

3.1.2. Deneysel Enfeksiyon ve İmmünizasyon Uygulama Yeri

Balıkların *Yersinia ruckeri* inokulatu ile enfekte edilmesi ve inaktive edilmiş *Yersinia ruckeri* bakterini ile immünizasyonu ile ilgili deneysel çalışmalar Üniversitemiz Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Ünitesinde yürütülmüştür.

3.1.3. Serolojik Testlerin Yapıldığı Kuruluşlar ve Laboratuvarlar

Yersinia ruckeri izolatından inokulum hazırlanması, lam aglutinasyon, microwell aglutinasyon ve immünodiffüzyon çalışmalarının bir kısmı, *Yersinia ruckeri* izolatının morfolojik ve biyokimyasal testleri fakültemiz mikrobiyoloji laboratuvarlarında ve histopatolojik çalışmalar fakültemiz histopatoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

ELİSA ve İmmünodiffüzyon testlerinde kullanılmak üzere *Yersinia ruckeri* bakterisinin eriyik antijeninin hazırlanması amacıyla bakterilerin sonikasyon işlemi Ankara Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilimdalı laboratuvarında yapılmıştır.

Eriyik antijenlerin biüret metodu ile protein miktarının tayini üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı laboratuvarında yapılmıştır.

İmmunofluoresans antikor testi (IFAT) ile ilgili işlemler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilimdalı laboratuvarında ; ELISA, pasif hemaglutinasyon, immünodiffüzyon, mikroaglutinasyon testleri ile ilgili işlemler ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilimdalı laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1.4. Uygulama Tankları ve Uygulamada Kullanılan Su

Denemede 1m çapında ve 70cm derinliğinde 5 adet sirküler tank kullanılmıştır (Resim 1). Denemede kullanılan tanklara su Eğirdir Gölü'ne 117m uzaklıkta açılan bir kuyudan 2 BG gücündeki elektrikli su pompası ile sağlanmıştır. Kuyudan dinlenme tankına aktarılan suyun buradan plastik borularla tanklara sürekli akışı sağlanmıştır. Suyun sıcaklığı deneme süresince yaklaşık 11-12°C, oksijen miktarı 6-7 ppm arasında değişmiştir. Tanklardaki suyun oksijeni devamlı olarak kompresör ile takviye edilmiştir.



Resim 1. Denemede kullanılan sirküler fiber tanklar.

3.1.5. Yem

Deneme balıkları adaptasyon ve deneme süresince ticari alabalık pelet yemi ile beslenmiştir.

3.1.6. Denemede Kullanılan *Yersinia ruckeri* Suşu

Deneysel enfeksiyon ve immunizasyon çalışmalarında Prof.Dr.Gülşen TİMUR'un Denizli Yavuzlar Alabalık işletmesindeki gökkuşuğu alabalıklarında ağır mortaliteye neden olan bir epizootikten izole ettiği R0018 protokol numaralı *Yersinia ruckeri* suşu kullanılmıştır.

3.1.7. İmmunizasyon Çalışmalarında Kullanılan Adjuvantlar

İmmunizasyon çalışmalarında, Freund's incomplete adjuvant (FIA) (Sigma F-5506, Difco-0639-60) kullanılmıştır.

3.1.8. ELİSA ve IFAT Serolojik Testlerinde Kullanılan Antiserum

İndirekt fluoresans antikor tekniği (IFAT) ve ELISA testlerinde kullanılmak üzere Soren Schierbeck & Co. firmasından ticari salmon immunoglobüline karşı oluşturulan polyclonal tavşan antiserumu satın alınmıştır.

3.1.9. Konjugatlar

ELISA serolojik testinde kullanılmak üzere ticari anti - tavşan Ig G peroksidaz konjugatı (Horseradish Peroxidase Conjugated Goat Anti- Rabbit IgG) Sigma' dan satın alınmıştır.

IFAT serolojik testinde kullanılmak üzere Anti-tavşan IgG FITC konjugatı (FITC Conjugated Goat anti-rabbit IgG) Sigma' dan satın alınmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Gökkuşığı Alabalıklarında *Yersinia ruckeri* İnokulatının Hazırlanması ve Deneysel Olarak Enfeksiyon Oluşturma

Buzdolabında +4°C de muhafaza edilen *Y. ruckeri* stok kültüründen alınan bakteri izolatları Tryptone Soya Agara (Oxoid CM 131) aseptik koşullarda ekilerek 21°C de 24 saat inkübasyonu ile gençleştirilmiştir. Gençleştirilmiş *Y. ruckeri* suşu 10ml lif nutrient broth içeren tübe (NB Merk, 5443) ekilerek 18 saat sonra üreyen bakteriler 5000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiş ve daha sonra koloni sayım metodu ile canlı bakteri sayımı yapılmıştır (Arda 1985a, Collins and Lyne 1976). Deneysel enfeksiyon için hazırlanan inokulumda 8×10^7 bakteri / ml bulunması sağlanmıştır.

Deneysel enfeksiyon için gençleştirilen kültürlerden 8×10^7 /ml bakteri içeren inokulat hazırlanarak 75gr ağırlığındaki 20 tane gökkuşığı alabalığına 0.1cc İntramuscular (i.m.) olarak otomatik enjektör ile verilmiştir. Enfeksiyondan önce balıklar 50-60 mg/lit MS 222 (methane tricainesulphonate) içeren suda bayıltılmışlardır.(Roberts and Shpeherd 1974)

Enfeksiyondan sonra 25 gün süreyle balıkların klinik durumları izlenmiş ve ölümler tespit edilmiştir. Bu süre sonunda hayatta kalan balıklardan her hafta bir tanesinden kuyruk kesme yöntemi ile kan alınarak serumlarında antikor varlığı saptanmıştır.

3.2.2. Enfekte Balıklardan Bakterilerin Re-izolasyonu Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Tespiti

Yeni ölmüş ve ölmek üzere olan balıkların otopsi yapılarak; karaciğer, böbrek ve dalaktan TSA' ya öze ile ekim yapılmıştır. 21°C de inkübe edilen vasatlarda 24 saatte koloniler oluşturan *Y. ruckeri* suşunun morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tespiti için kolonilerden hazırlanan frotiler Gram boyama yöntemiyle boyanmıştır. İzolata çukur lamda aslı damla yöntemiyle hareketlilik testi, sitokrom oksidaz, katalaz, karbonhidrat fermantasyonu, oksidasyon-fermantasyon (O/F), jelatin hidrolizasyonu, nitrat reduksiyonu, Voges-Proskauer (VP), metil red, Simon's sitrat, nişasta hidrolizasyonu, indol testleri gibi biyokimyasal testler uygulanmıştır (Shotts & Bullock *et al* 1975, Arda 1985,

Giorgiatti *et al* 1985, Austin 1988, Austin and Austin 1993, Plumb and Bowser 1983). Ayrıca *Yersinia ruckeri* için selektif bir besiyeri olan Shotts-Waltman vasatına ekim yapılarak koloni renklenmesi incelenmiş ve hidroliz zonunun varlığı aranmıştır.

Y. ruckeri'nin antibiyogram testi yapılarak duyarlı olduğu antibiyotikler tespit edilmiştir (Collins and Lyne 1976, Arda 1985a).

3.2.3. Enfekte Balıkların Klinik , Otopsi ve Histopatolojik Muayenesi

Enfekte edilen balıklardaki değişiklikler gözlenerek yeni ölen veya ölmekte olan balıkların otopsileri yapılmış, iç organları histopatolojik muayene için %10 luk nötral formaldehit içerisinde fikse edilmiştir. Alkol, kloroform, parafin serilerinden geçirilen organlar parafin bloklara döküm yapılarak 5µ inceliğinde kesitleri alınmıştır. Histopatolojik kesitler haematoxylin ve eosin (HE) ile rutin histolojik boyamaları yapılmış ve mikrofotografları çekilmiştir (Culling 1963).

3.2.4. Antikor Üretimi İçin Bakterin hazırlanması ve İmmunizasyon Uygulamaları

3.2.4.1. Bakterin Hazırlanması

Genç *Y. ruckeri* suşunun nutrient broth' a ekilip 21°C de 24 saat inkübasyondan sonra sıvı kültür steril santrifüj tüplerine alınarak 5000 devirde 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen bakteri çökeleği PBS ile (phosphate buffered saline) yıkanmıştır. Daha sonra %0.3 lük formaldehit içinde oda sıcaklığında 1 saat ve +4°C de 24 saat bekletilmiştir (Bernoth and Böhm 1988, Ellis 1988d). Formaldehit içinde 24 saat bekletildikten sonra 2 kez PBS ile yıkanan bakteri çökeleği daha sonra, PBS içinde süspansiyon edilmiştir. Elde edilen inaktif bakterinin sterilite kontrolü için TSA ve NB lara ekimler yapılmıştır. Hazırlanan *Yersinia ruckeri* bakterini kullanıncaya kadar +4°C de buzdolabında saklanmıştır. *Yersinia ruckeri* bakterin yoğunluğu spektrofotometre (Shimadzu Spectrophotometer) ile 600nm de 1'e ayarlanmıştır (Plumb and Bowser 1983). Hazırlanan bakterindeki inaktif bakteriler Thoma lamı ile sayıldığında yaklaşık 10^9

bakteri/ml olarak hesaplanmıştır. Elde edilen inokulum PBS ve adjuvantla yarıyarıya karıştırılarak balıklara intraperitoneal enjekte edilmiştir (Bernoth and Böhm 1988).

3.2.4.2. İmmünisasyon Uygulamaları

Bu amaçla 100 - 150gr'lık 20 adet gökkuşağı alabalığına MS 222 ile bayıldıktan sonra önceden hazırlanmış ve sterilite kontrolleri yapılmış 600nm de 1 okunan (yaklaşık 10^9 hücre/ml) PBS'li bakterin inokulatu Freund's incomplete adjuvant (FIA) ile eşit volümlerde (1:1) çok iyi karıştırılarak otomatik enjektörle 0,2 ml intraperitoneal olarak pelvik yüzgeçlerin anterioründe iki yüzgecin ortasından verilmiştir (Resim 2) (Chart *et al.* 1984, Cossarini-Dunier 1986a, Tatner 1990, Espelid *et al.* 1991, Akhlaghi *et al.* 1993). Aynı özellikteki ve sayıdaki ikinci grubu ise FIA içermeyen bakterin inokulatu intraperitoneal (i.p.) olarak verilmiştir. Bu gruptaki balıkara 2. kuvvetlendirici enjeksiyon 25 gün sonra yapılmıştır (Booster enjeksiyon). Kontrol grubu olarak 100 -150gr'lık 40 adet balık MS 222 ile bayıldıktan sonra 0,1ml PBS ile i.p. enjeksiyon yapılarak üçüncü bir grup oluşturulmuştur. Deneme süresince (20 hafta) her üç deneme grubundaki balıktan her hafta rastgele bir balık alınarak kuyruk kesme yöntemi ile kanları alınmış ve serumları elde edilmiştir.



Resim 2. İnteraperitoneal enjeksiyonunun yapıldığı bölge

Bu deneme çalışmamızdan önce, her grup için 40 balık kullanılarak deneme aynı yöntemle başlatılmıştır. Ancak, bakteri inokulasyonundan bir hafta sonra balık hastalıkları ünitesinde meydana gelen elektrik kesilmesi (gece) ve bu üç gruptaki balıkları içeren tanklara suyun akması nedeniyle deneme balıklarında oksijensizlik nedeniyle ölüm görülmüştür. Bu nedenle çalışmanın selameti açısından tanklara 40 yerine daha az balık (20 adet) konarak çalışmanın güvenli olarak yürütmesi düşünülmüştür. Hayatta kalan balıklarda denemeye devam edilmiş 9-10 hafta süreyle kuyruk kesme yöntemi ile kan alınarak serumları elde edilmiştir. Bu balıkların kan serumlarında laboratuvarında uygulanan serolojik testlerin pilot çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.5. Pozitif Kontrol Serumun Hazırlanması

Testlerde pozitif kontrol serumu olarak kullanılmak amacıyla 9 tane 400gr lık gökkuşuğu alabalığına 600nm de 1.0 değerindeki formaldehitte inaktif edilen ve PBS ile sulandırılmış bakteri inokulatından 0,3cc iki hafta ara ile iki kez i.p. yolla enjeksiyon yapılmıştır. Son enjeksiyondan 4 hafta sonra tüm balıklardan kan alınmış ve serum elde edilmiştir. Elde edilen serum serolojik testlerde pozitif serum olarak kullanılmıştır (Olesen 1991).

3.2.6. İmmun Balıklara Patojen Bakteri Uygulanması (Challenge).

Freund's incomplete adjuvanlı ve adjuvant içermeyen PBS'li bakterinler ile immunize deneme balıklarında yeterli immunitenin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla bakterin uygulanmasından 3 hafta sonra patojen bakteri verilerek balıklarda hayatta kalma yüzdesi ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla 25gr ağırlığındaki 20 balıktan oluşan 1. grup formaldehitte inaktive edilmiş ve 600nm de 0,8 dalga boyundaki (Thoma lamında yaklaşık 4×10^8) PBS'li bakteri 1:1 oranında FIA ile çok iyi bir şekilde karıştırılarak 25gr ağırlığındaki 20 balığa 0,1 cc i.p. enjeksiyon yapılmıştır (Cossarini-Dunier 1986a,b)Yine aynı sayı ve ağırlıktaki 2. grup balığa PBS'li bakterinden 0,1cc i.p. enjeksiyon yapılmıştır. Bu gruptaki balıklara 2. kuvvetlendirici enjeksiyon 3 hafta sonra ilk enjeksiyon gibi uygulanmıştır. Kontrol amacıyla 3. grup 20 balığa 0,1cc PBS enjekte edilmiştir. İlk

enjeksiyondan 5 hafta sonra yukarıda belirtilen üç gruptaki balığa yaklaşık 1×10^8 bakteri/ml canlı patojen i.p. olarak verilmiştir (Cossarini-Dunier 1986a). Bu uygulamadan sonra 3 hafta süreyle balıklar izlenmiş ve ölen balıklar kaydedilmiştir.

İmmunizasyonun oluşturduğu koruma, balıkların hayatta kalma yüzdesi (RPS=Relative Percent Survival) ne göre değerlendirilmiştir. (Ellis 1988a, Adams *et al.* 1988, Hjeltnes *et al.* 1989, Lillehaug 1989, 1991).

3.2.7. Serum Elde Edilmesi

Quinaldine (5-10 ppm) ile bayıltılan gökkuşağı alabalıklarının (Roberts and Shepherd 1974, Akyurt 1979) kuyrukları kesilerek, kaudal venadan kan steril veya kullanıldıktan sonra atılabilen (disposable) tüplere toplanmıştır (Anderson 1974, Arda 1974, Strand *et al.* 1977, Timur 1985, Buchman and Pedersen 1994). Alınan kan 1 saat oda sıcaklığında ve daha sonra gece boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ de tutulmuştur. Daha sonra 2000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvı serum kısmı pastör pipetiyle dikkatli bir şekilde alınmıştır. Elde edilen serumdan lam aglutinasyon testi yapıldıktan sonra diğer tüm serolojik testlerde kullanılmak üzere -20°C 'de derin dondurucuda saklanmıştır (Strand *et al.* 1977, Thuvander *et al.* 1987, Hardie *et al.* 1990, Aakre *et al.* 1994).

3.2.8. İmmun Alabalık Serumlarında Antikor Tespiti İçin Serolojik Testler

3.2.8.1. Aglutinasyon Testi

3.2.8.1.1. Aglutinasyon Testi İçin Antijen Hazırlanması.

Deneysel enfeksiyonla re-izolasyonu yapılan ve identifiye edilen *Y. ruckeri* suşu test antijenin hazırlanmasında kullanılmıştır. Bakteri TSA da 21°C de 24-48 saat geliştirildikten sonra NB ekilerek 21°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteri kültürü 5000 devirde 15dk santrifüj edilerek ve 1 kez PBS ile yıkanmıştır. %0,3 lük formaldehitte $+4^{\circ}\text{C}$ de 24 saat bekletilmiştir. PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra PBS ile sulandırılmıştır. Spektrofotometre ile 525nm de optik yoğunluk (OP) 0,65'e ayarlanmıştır (Cossarini-Dunier

1986a,b) (Thoma lamıyla sayımda yaklaşık 10^8 bakteri/ml) Hazırlanan antijen lam aglutinasyon ve mikroaglutinasyon testlerinde somatik O antijeni olarak kullanılmıştır (Cossarini- Dunier 1986ab).

3.2.8.1.2. Lam Aglutinasyon Testinin Uygulanması

Temiz bir lam üzerine bir damla test serumundan, bir damla da önceden hazırlanmış aglutinasyon antijeninden damlatılarak lamın sağa sola hareket ettirilmesiyle iyi bir şekilde karışmaları sağlanmıştır (Toranzo *et al.* 1987). Test sonuçları 2-3 dk içerisinde değerlendirilmiş ve 5 dk sonra oluşan zayıf aglutinasyon negatif olarak kabul edilmiştir. Antijen ve antikorun çökme şekli incelenerek sonuçlar aşağıda gösterildiği gibi değerlendirilmiştir. (Plumb and Bowser 1983, Toranzo *et al.* 1987, Austin 1988, Bullock 1989, Roberson 1993): Testin kontrolü, immunize edilmemiş balık serumları ile ve PBS ile yapılmıştır.

++++	Tam aglutinasyon
+++	Kuvvetli aglutinasyon
++	Orta dereceli aglutinasyon
+	Zayıf aglutinasyon
-	Aglutinasyon yok

3.2.8.1.3. Mikroaglutinasyon Testinin Uygulanması

Yuvarlak tabanlı polyester microwell plate aglutinasyon titrasyonunda kullanılmıştır. Önce test serumları soldan sağa doğru birinci sıradaki çukurlara konulmuştur. Sonra yukarıdan aşağıya doğru serumlar 1/4 dilüsyondan başlayarak otomatik sulandırıcı ile her seferinde 50 µlt bir aşağıdaki çukura aktarılacak suretiyle 2 katlı dilüsyonları yapılmıştır. Plate'in tüm çukurlarına çoklu pipetle önceden hazırlanmış aglutinasyon antijeninden 50 µlt ilave edilerek karıştırıcı (vorteks) ile iyice karıştırılmıştır. Plate'ler iki saat oda sıcaklığında ve tüm gece boyunca +4°C de inkübe edilmiştir (Cossarini - Dunier'in 1986ab, Grayson *et*

al.1987). Testin kontrolü için pozitif ve negatif serumlar çalışılan her plate'in sondan bir ve ikinci gözlerine konulmuştur.

Aglutinasyon titresi olarak en yüksek aglutinasyonu veren serum dilüsyonu kaydedilerek, bu değerler \log_2 tabanına göre değerlendirilmiştir (Cossarini-Dunier 1986a,b)

3.2.8.2. Pasif Hemaglutinasyon Testi

3.2.8.2.1. Pasif Hemaglutinasyon Testi İçin Antijen Hazırlama.

Aglutinasyon testinde olduğu gibi sıvı ortamda üretilen bakteri 10.000rpm de 30 -45 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen sediment PBS ile 2 kez yıkanmış ve sonrada PBS ile sulandırılmıştır (Esendal 1994). Elde edilen antijenin biüret yöntemi ile protein miktarı $1\text{mg}/\text{cm}^3$ e ayarlanmıştır (Mughal and Manning 1986).

3.2.8.2.2. Pasif Hemaglutinasyon Testinin Uygulanması

Serumda antikor seviyelerini tanımlamada Mughal ve Manning'in bildirdiği pasif hemaglutinasyon yöntemi uygulanmıştır. Test serumları çalışmaya başlamadan önce 45°C de 20dk Benmari'de inaktive edilmiştir. Serum %2 lik PBS ile sulandırılmış tavşan serumuyla 1/4 dilüsyondan başlayarak iki kat dilüsyonları yapılmıştır. Bu çalışmada yuvarlak tabanlı microwell plate kullanılmıştır. Serumlar her çukura 50 μl t olacak şekilde konulmuştur (Mughal and Manning 1986).

Antijenli ve antijensiz koyun eritrositi süspansiyonunun hazırlanması için koyun kanı eşit hacimdeki Alsever solüsyonu ile steril bir cam balona konulmuş ve iyice karıştırılmıştır. Kullanılacağı zaman 2000-2500 devirde 5dk santrifüj edilerek eritrositlerin Alsever solüsyonundan ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra PBS ile 3 kez santrifüj edilerek yıkanmıştır. Yıkanan paketlenmiş eritrositlere 20ml PBS ilave edilmiştir (Altıntaş 1985). Hazırlanan 20ml %2,5 luk eritrosit süspansiyonuna 20ml 1/10.000 lik tannik asit ilave edilerek iyice karışmaları sağlandıktan sonra 37°C de Benmari'de 5 er dakika ara ile hafifçe karıştırılarak 15dk eritrositlerin duyarlı hale gelmeleri sağlanmıştır. Benmari'den çıkarılan

karışımdan tannik asitin fazlasını gidermek için 2000 devirde 5dk santrifüj edilmiş ve dipte kalan çökelti 3 kez PBS ile aynı şekilde yıkanmıştır.

Antijenle kaplanmış koyun eritrositi hazırlamak için pasif hemaglutinasyon antijeninden 1ml, duyarlı hale getirilmiş paketlenmiş eritrositten 0,2 ml karıştırılarak 15dk oda ısısında bekletilmiş ve antijenlerin eritrositleri tutulması sağlanmıştır

Antijensiz koyun eritrositi için 1ml PBS 0,2ml tannik asitli eritrosite eklenmiş ve arasra karıştırılarak 15dk beklenmiştir.

Antijenle kaplanmış veya kaplanmamış koyun eritrositleri 2500 devirde 5dk santrifüj edilerek üstte kalan sıvı atılarak, aynı işlem iki kez PBS ile tekrarlanarak tutunmayan antijenin fazlası giderilmiştir.

Antijenli ya da antijensiz koyun eritrositi PBS ile 2500 devirde 5dk santrifüj edilerek iki defa yıkanmış ve 15 ml PBS ilave edilmiştir.

Bu testte yuvarlak tabanlı microwell plate kullanılmıştır. Plate yan olarak çalışılmıştır. Serum dilüsyonları 1/4 den başlayarak iki kat sulandırılmıştır. 50µlt dilüsyonlu test serumları üzerine 50µlt hazırlanan antijenle kaplanmış eritrosit ilave edilmiştir. Aynı işlem tüm serumlarda antijensiz eritrositle başka bir plate kontrol plate olarak çalışılmıştır. Ayrıca her plate'de pozitif ve negatif serumlar kullanılmıştır. Plate'lere test serumu, antijenli ve antijensiz eritrositlerin ilavesinden sonra karıştırıcı (vortex) aletinde dikkatlice karıştırıldıktan sonra oda ısısında 3 saat bekletilmiştir.

Dantela tarzında çöküntünün olduğu gözlerde reaksiyon pozitif olarak değerlendirilmiş eritrositlerin düğme tarzında kümeleştirilmeleri ise negatif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Pozitif reaksiyon görülen en son sulandırma serumun pasif hemaglutinasyon titrerleri olarak alınmıştır. Eritrositlerin düğme (nokta) tarzında kümeleşmeleri negatif olarak kabul edilmiştir.

Antijenle kaplanmamış eritrositler plate çukurlarında tamamen düğme şeklinde çökmesi testin doğruluğunu göstermektedir.

3.2.8.3. İmmunodiffüzyon Testi

3.2.8.3.1. İmmunodiffüzyon Testi İçin Antijen Hazırlama.

NB ta üretilen ve 5000 devirde santrifüj edilmiş, 1 kez PBS ile yıkanmış ve PBS ile sulandırılmıştır. Hazırlanan antijen -20°C de 10 defa dondurulup çözündürülmüştür. Süspansiyon sonikatörde (Sonik 300 Dismembratör) 5 er dakika iki kez sonikasyon yapılmıştır. Süspansiyon 10.000 rpm de 15dk santrifüj edilerek dikkatli bir şekilde üst sıvı (süpernatant) alınmış ve kullanılıncaya kadar -20°C de dipfirizde saklanmıştır. Kullanılmadan önce biüret yöntemi ile protein miktarı $1480\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur (Bly 1984, Schill *et al.* 1989, Yardımcı 1989, Esendal 1994).

3.2.8.3.2. İmmunodiffüzyon Testinin Uygulanması

Ouchterlony jel diffüzyon testi bu çalışmada uygulanmıştır. %1 lik saf agar (noble agar) ısıtılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan sıcak agar 10ml lik pipetlerle 5cm çapındaki petri kutularına 10ml dökülerek düzgün bir şekilde dağılımı sağlanmış ve agar katılaştıktan sonra 5mm çapında birisi merkezde 6 sı periferde olmak üzere 7 çukur açılmıştır. Çukurların dipleri pastör pipeti kullanılarak birer damla agar ile kapatılmıştır. (Bullock 1966, Altıntaş 1985, Esendal 1994) 3ml sıcak agar aynı şekilde lam üzerine dökülerek katılaşması sağlanmıştır.

Lamlarda katılaştıran agar immünodiffüzyonda kullanılan özel kesici ve delici aletlerle (Gel İmmünodiffüzyon Punch Set No 51450, Gelmon Ins. Co. Ann. Arbor, Mich. USA) kesilmiş ve kesilen agar parçaları vakumlu pipet ile emilerek çıkartılmıştır. Presipitasyon testi için hazırlanan eriyik antijen pozitif ve negatif serumlarla 1/5, 1/10, 1/20, 1/25, 1/50, gibi farklı dilüsyonlarda antijenlerin optimum konsantrasyonu bulunmaya çalışılmıştır.

Test serumları ile çalışmada lamda ortadaki çukurlara presipitasyon antijeni $20\mu\text{lt}$, etraftaki çukurlara $20\mu\text{lt}$ test serumlarından konulmuştur.

Petri kutularında açılan çukurlardan ortadakine antijen, diğer çevredeki çukurlara ise test serumları ilave edilmiştir. Daha sonra nemli ortamda kapaklı küvetlere konan lamlar ve

petri kutuları 48 -72 saat buzdolabında bırakılmıştır (Bullock 1966, Ouchterlony and Nilsson 1986).

Sonuçlar, antijenle serum arasında oluşan presipitasyon çizgisinin varlığı ve yokluğuna bakılarak değerlendirilmiştir (Bullock 1966, Altıntaş 1985).

3.2.8.4 İndirekt Floresans Antikor Tekniği (IFAT)

3.2.8.4.1. İndirekt Floresans Antikor Tekniği İçin Antijen Hazırlama.

NB ta ekim yapılan *Yersinia ruckeri* bakterisi 21°C de 24 saat inkübe edildikten sonra 15dk 5000 devirde santrifüj edilmiştir. PBS ile 2 kez yıkanmış ve tekrar PBS ile sulandırılarak test antijeni hazırlanmıştır (Yoğunluğu yaklaşık 9×10^{10} /ml).

IFAT testi için kullanılacak olan lamalar eter alkol karışımında 1saat bekletilmiş ve silindikten sonra elmas uçlu bir kalemle bir lamda 12 veya 6 halka olacak şekilde yuvarlak muntazam halkalar çizilmiştir. Bu lamalar tekrar eter alkol karışımından geçirilerek silinmiştir (Altıntaş 1985).

Hazırlanan antijen temizlenen lamalar üzerindeki halkalar içine 20µlt damlatılmış ve havada kurutulmuştur.

Birinci yöntemde antijenler asetonda 10 dk süreyle fikse edilmiştir. İkinci yöntemde ise antijenler 60°C ye ayarlı etüvde sıcaklığa 5dk tutmak sureti ile fiksasyona tabi tutulmuştur (Ainsworth *et al.* 1986, Austin and Austin 1993).

3.2.8.4.2. İndirekt Floresans Antikor Tekniğinin Uygulanması

Bu testin yürütülebilmesi için önce salmon immunoglobuline karşı oluşturulan ticari polyclonal tavşan antiserum ve bununla reaksiyona girecek olan anti-tavşan IgG FITC konjugatının uygun titrasyonları tespit edilmiştir. Bu testte optimal antiserum ve konjugat dilüsyonunu saptamak için antiserumun; 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 dilüsyonları, konjugatın; 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 dilüsyonları denenmiştir.

Antijen kaplı lamaların 60 °C sıcaklıktaki etüvde fikzasyonundan sonra lam üzerindeki ilk antijen halkalara pozitif ve negatif kontrol serumları ve diğer antijen halkalarına ise test

serumları dilüe edilmeden 20µlt olarak damlatılmıştır. Preparatlar nemlendirilmiş küvetler içinde 24°C de 30dk bekletildikten sonra peraparatlar şale kabında iki kez 5dk PBS ile yıkanmıştır. Lamlar kağıt havlu üzerinde dik olarak kurutulmuştur. Daha sonra salmon antikoruna karşı oluşturulmuş polyclonal tavşan anti serumundan (Buchmann and Pedersen 1994) 1/10 dilüsyonunda her halkaya 20µlt ilave edilerek 24°C de nemli ortamda 30 dk bekletilmiştir. PBS ile iki kez 5 er dakika yıkanmış ve kurutulmuştur. Preparatların üzerine önceden dilüsyonu yapılmış ve en iyi titrasyon sonucu veren 1/80 dilüsyonundaki FITC ile işaretli anti tavşan immünoglobulinine karşı boyama amacıyla %0,1 lik Evans blue ilave edilerek halkaya 20 µml damlatılmıştır ve 24°C de 30 dk nemli ortamda bekletilmiştir. PBS ile 3 kez 5 dk yıkanmış ve yıkandıktan sonra kurutulmuştur. Kaplama solüsyonu olarak FITC mounting medium (pH:7,5 Marox carlsbad, CA) kullanılmıştır. Kurutulan preparatlara bu solüsyon damlatılmış ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek lamelle kapatılarak ve hemen fluoresans mikroskobu ile incelenmeye alınarak değerlendirilmeye geçilmiştir (Özcel 1978, Ainsworth *et al.* 1986, Austin 1988, Anderson 1993).

Sonuçların değerlendirilmesi, preparatlarda fluoresans yada elma yeşili renginin görülme yoğunluğuna göre yapılmıştır. Parlak sarı - yeşil fluoresans pozitif, soluk sarı - yeşil fluoresans görülmemesi negatif olarak değerlendirilmiştir (Özcel 1978, Anderson 1993). Test serumlarına ait sonuçlar aşağıdaki işaretlerle değerlendirilmiştir.

Fluoresans yok	-
Var fakat zayıf fluoresans	+
Fluoresans var	++
Orta dereceli fluoresans	+++
Kuvvetli fluoresans	++++

3.2.8.5. Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.2.8.5.1. ELISA Tekniği İçin Antijen Hazırlama.

Bakteri 21°C 24 saat NB ekilerek inkübe edilmiştir. Inkübasyondan sonra kültür 5000 devirde 15dk santrifüj edilerek 2 kez PBS ile yıkanmıştır. PBS ile sulandırılarak -20°C'de derin dondurucuda dondurulmuştur ve termosla Ankara Üniversitesi Veteriner

Fakültesi Mikrobiyoloji bölümünde sonic 300 dismembranatör (Fisheries scientific) ile 5dk sonike edilmiştir. Süspansiyon 10.000 devirde 30dk santrifüj edilmiştir ve üst sıvı kısım (süpernatant) dikkatlice alınmıştır. Alınan bu kısım ELISA da eriyik (soluble) antijen olarak kullanılmıştır (Schill *et al.* 1989).

Bu antijen kullanılmadan önce protein miktarı biüret yöntemi ile tespit edilmiştir. (Stanbio Primer plus marka fotometre cihazında değerler okunmuş ve Biocon firmasının test reaktifi kullanılmıştır) Protein miktarı 1570 μ g/ml olarak hesaplanmıştır. (Bly 1984, Yardımcı 1989, Esendal 1994).

3.2.8.5.2. Antijen, Antiserum Konjugat Titrasyonu

ELISA için hazırlanmış olan eriyik antijenden 2,5 μ g/ml, konsantrasyonlarındaki antijen U tabanlı polyester microwell plate'in soldan sağa doğru ilk 4 sırasındaki çukurlara 5 μ gr/ml, 4 -8 arasındaki çukurlara 10 μ gr/ml, 8 -12 arasındaki çukurları gelecek şekilde aşağı kadar tüm çukurlara konulmuş ve böylece antijen titrasyonu için antijenin plaklara kaplanması sağlanmıştır. Daha sonra plate çukurlarına yukarıdan aşağıya doğru bir sıra pozitif, bir sıra negatif olduğu bilinen serumları soldan sağa doğru sırayla konulmuştur.

Plate inkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra salmon immunoglobulinine karşı oluşturulan ticari polyclonal anti tavşan serumundan soldan ilk dört çukura 1/200, 4 - 8 arasındaki çukurlara 1/400, 8 - 12 arasındaki çukurlara 1/500 olacak şekilde farklı titrasyonlarda konulmuştur. İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra aşağıdan yukarıya doğru ilk iki göze 1/1000, 3 -4. gözlere 1/10.000, 5 -6. gözlere 1/20.000, 7 - 8. gözlere 1/25.000 lik peroxidase konjugatı (horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG) dilüsyonları soldan sağa doğru konmuştur. Tekrar inkübasyon ve yıkama işleminden sonra tüm çukurlara renk reaksiyonu oluşturmak üzere substrat ilave edilmiştir. Pozitif serumla en iyi renk reaksiyonunu veren antijen, antiserum ve konjugat titreleri testlerde kullanılmıştır.

3.2.8.5.3. ELISA Testi İçin Antijen Kaplı Plakların Hazırlanması

Antijen titrasyon çalışmasında en iyi reaksiyonu veren 5 μ g/ml konsantrasyondaki eriyik antijenden U tabanlı microtiter plate (Sigma M0156)'in her çukuruna 100 μ lt

konulmuştur. Antijen kaplanmış plate'ler parafilm ile iyice kapatılarak gece boyunca buzdolabında +4°C de tutulmuştur. Plate'ler silkelenerek boşaltılmış ve yeniden kullanılincaya kadar +4°C de saklanmıştır (Voller *et al.* 1979, Nakamura *et al.* 1986).

3.2.8.5.4. ELISA Testinin Uygulanması

ELİSA Testinde aşağıda bildirilen tampon, substrat ve solüsyonlar kullanılmıştır.

Sodyum Azidli Tampon Solüsyonu (Saline Azide(%1))

NaN₃ : 0,20gr
 NaCl : 20gr
 Distile Su : 2.000ml karıştırılmıştır

Borik Asit Tampon Solüsyonu (Stok BBS)

Borik asit : 11gr
 NaOH : 1gr
 NaCl : 1,45gr
 Distile su : 500ml karıştırılmıştır.

Çalışma Tampon Solüsyonu(Working Buffer)

Saline aside(%1) : 1800ml
 Stok BBS : 200ml
 Tween 20 : 1ml

Bovine Serum Albumin (BSA) 10ml. Karıştırılıp, pH 7,4'e ayarlanmıştır.

ELİSA Tampon Solüsyonu (ELİSA PBS)

K₂HPO₄ : 2,40g
 NaH₂PO₄ : 0,44g
 NaCl : 17g
 Distile Su : 2.000 ml karıştırılıp pH 7,4'e ayarlanmıştır.

Yıkama Tampon solüsyonu (Washing Buffer (PBS+Tween20))

Tween 20 : 1ml
 PBS : 2.000 ml

Sitratlı Tampon Solüsyonu (Citrate Phosphate Buffer)

Citric Asit : 1,92 g

$\text{Na}_2\text{NHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 6,45 g

Distile Su : 200 ml pH 5'e ayarlanmıştır.

Peroksidaz Konjugatı İçin Substrat Hazırlanması

Solüsyon A: 100ml sitrat fosfat tamponu içine 2 adet 2,2-azino-bis (3-ethylbenthioazoline-6-sulfonic acid) diamonyum (ABTS) tableti (Sigma A 4798) konularak eritilmiştir. Solüsyon B : 100ml sitrat fosfat tamponu içine 40µl saf H_2O_2 eklenmiştir.

3.2.8.5.4.1. Testin Uygulanması

Yersinia ruckeri eriyik antijeni ile önceden kaplanmış plate'in her çukuruna 150µl çalışma tampon solüsyonu (WB) konarak bir saat oda sıcaklığında tutulmak suretiyle bloklama işlemi plate çukurlarında antijen ile kaplanmamış boş porların doldurulmasını sağlamak amacıyla yapılmıştır. Bu süre sonunda plate'ler silkelenerek (Voller *et al.* 1979) boşaltılmıştır.

Bloklama işlemi sonrasında soldan sağa ilk sıraya 90µl WB ilave edilir ve yukarıdan aşağıya birinci sıradaki çukurlara pozitif serum, ikinci sıradaki çukurlara negatif serum ve diğer on sıra çukura test serumlarından 10µl ilave edilir ve serumların 1/10 kat dilüsyonları elde edilmiş olur. Daha sonra aşağı doğru her sıradaki farklı test serumları iki katlı sulandırılarak 1/10'dan başlayarak 1/1280 oranında dilüsyonları yapılmıştır. Plate'lerin ilk sıralarının son iki çukuru 0 (blank) değerinin saptanması için boş bırakılmıştır. Plate'ler bir saat oda sıcaklığında bekletilmiş, süre bitince silkelenerek boşaltılmıştır. Tüm çukurlar 150 µl WB ile 3 kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır.

Salmon immunoglobulinine karşı oluşturulmuş polyclonal tavşan antiserumu 1/400 oranında sulandırılarak her çukura 100µl konulmuştur. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra plate'ler silkelenerek boşaltılmış ve iki kez WB ile iki kez PBS ile 5'er dakika yıkanmıştır. Her yıkama sonunda ve özellikle son yıkamada plakların iyice temizlenmesi için havluya birkaç kez vurulmuştur.

Peroksidaz işaretli anti-tavşan Ig konjugatı (Hawarstein *et al.* 1990, Aakre *et al.* 1994) 1/1000 oranında WB ile sulandırılarak her çukura 100µl konulmuştur. Oda sıcaklığında 1 saat tutulmuştur. Süre tamamlanınca konjugatlı plate'ler silkelenerek içerikleri dökülmüş çukurlar iki kez 150µl WB ile 2 kez PBS ile 5'er dakika yıkanmıştır.

Substrat hazırlamak için 5ml solüsyon A + 5 ml solüsyon B karıştırılmıştır. Hazırlanan substrattan başka bir tüpe 1 damla konarak üzerine 1 damla konjugat ilavesi ile substratın ve konjugatın çalışması kontrol edilmiştir. Daha sonra substrattan bütün çukurlara 100µl konulup oda ısısında 30-60 dakika arasında tutularak test plate çukurlarına durdurma işlemi yapılmadan optik yoğunluk (densite) spektrofotometrik olarak 405nm'de okunmuştur (Voller *et al.* 1979, Nakamura *et al.* 1986).

3.2.8.5.4.2. Sonuçların Okunması ve Değerlendirilmesi

ELİSA sonuçları spektrofotometrede (Titertek Multiscan Plus MKII) değerlendirilmiştir. Sonuçlar absorbans değeri olarak alınmış ve dilüsyonlardaki pozitiflik eşik değerleri (cutt off değeri) plate'lerde aynı test içinde bulunan 8 negatif serumun absorbans değerinin aritmetik ortalamasının +3 standart sapma ($n+3$ SD) değeri olarak alınmış, bu değerlerin üstündeki dilüsyonlar pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitifliğin şiddeti standart sapmanın katları olarak hesaplanmıştır. Dilüsyonlardaki en son pozitiflik ELİSA değeri olarak alınmış ve Log_{10} tabanına göre değerlendirilmiştir (Özensoy 1996).

4- BULGULAR

4.1. *Yersinia ruckeri* Suşu Re-izolatının Morfolojik Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

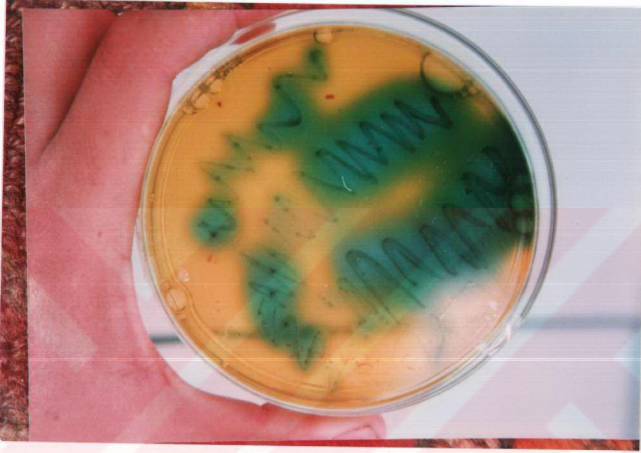
Denizli'deki bir alabalık işletmesinde balıklarda yüksek mortaliteye neden olan epidemik ERM vakasından izole ve identifiye edilen ve daha sonra subkültürleri yapılarak fakultemiz mikrobiyoloji laboratuvarı buzdolabında saklanan *Yersinia ruckeri* suşundan hazırlanmış patojen inokulatın balıklara enjeksiyonu sonucunda balıkların enfekte olduğu ve bazılarında öldüğü görülmüştür. Yeni ölmüş veya ölmek üzere olan bu balıkların karaciğer, böbrek gibi iç organlarından TSA'ya yapılan mikrobiyolojik ekimlerle *Yersinia ruckeri*'nin yeniden re-izolasyonu yapılarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri yeniden incelenmiştir.

Yersinia ruckeri suşu re-izolatının TSA üzerinde 21°C de 24-48 saat inkübasyon sonunda düz, hafif, kabark, beyaz ile krem renginde yuvarlak 1-2 mm çapında küçük koloniler oluşturduğu gözlenmiştir (Resim 3).



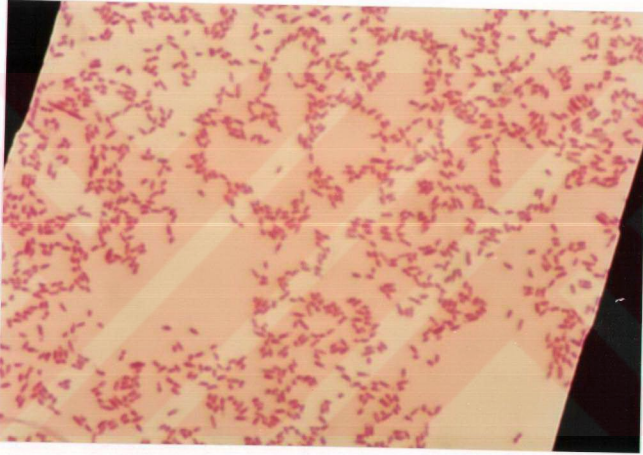
Resim 3. *Yersinia ruckeri* re-izolatının TSA vasatındaki koloni yapısı

Yersinia ruckeri suşunun idenfikasyonunda kullanılan tween 80 içeren SWM selektif ortamında *Yersinia ruckeri* re-izolatının yeşil renkli koloniler oluşturduğu ve kolonilerin hidroliz zonu ile çevrili olduğu gözlenmiştir (Resim 4).



Resim 4. *Yersinia ruckeri* suşunun SWM ortamındaki yeşil renkli kolonileri ve koloniler etrafındaki hidroliz zonu.

Yersinia ruckeri re-izolatından hazırlanan preparatlar Gram boyama yöntemi ile boyandığında Gram negatif kısa çubuklar şeklinde gözlenmiştir (Resim 5).Çukur lamda asılı damla yöntemiyle yapılan hareket muayenesinde bakterilerin aktif flagella hareketi gösterdikleri gözlenmiştir. Sitokrom oksidaz testinde negatif (-) reaksiyon verdiği 0/F testinde fermentatif olduğu tespit edilmiştir. *Yersinia ruckeri* re-izolatu ile ilgili morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile ilgili bulgular Çizelge (4.1a)'da verilmiştir.



Resim 5.Gram negatif *Yersinia ruckeri* bakterisi

Gram X1000

Çizelge 4.1a. *Yersinia ruckeri* bakterisinin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile ilgili bulgular (21°C' de 48 saat inkübasyon)

Test	Reaksiyon
Gram boyama	-
Morfoloji	Basil (çubuk)
Hareketlilik	+
Oksidaz	-
O/F testi	O/F
Sitrat kullanımı (Simons)	+
H ₂ S Üretimi	-
İndol Üretimi	-
Voges - Proskauer (VP)	-
Hemoliz	-
Metyhl Red (MR)	+
Jelatin hidrolizasyonu	+
Nişasta hidrolizasyonu	-
MacConkey'de büyüme	+
Nitrat indirgenmesi	+
Nitrit İndirgenmesi	-
Katalaz	+
Tween 80 kullanımı	+
H ₂ S	-
% 0,5 NaCl TSA	+
% 3 NaCl TSA	+
pH 5	+
pH 6	+
pH 7	+
pH 8	+
pH 9	+
Karbonhidrat fermantasyonu : (Şekerden asit üretimi)	
Glukoz	+
Sakkaroz	-
Laktoz	-
Maltoz	-
Arabinoz	-
Mannoz	-
Sorbitol	-
Rhamnoz	-
Melebioz	-
Mannitol	+
İnositol	-

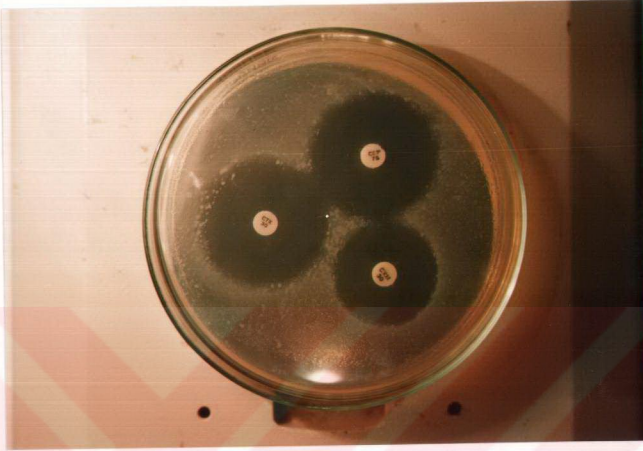
+ : Pozitif - : Negatif O/F : Oksidatif ve Fermantatif

Yersinia ruckeri'nin antibiyotiklere karşı yapılan duyarlılık testinin sonuçları Çizelge (4.1b) ve Resim (6) da verilmiştir. Antibiyogram testinde 19 farklı antibiyotikten sadece 3 tanesine dirençli olduğu 17 tanesine ise duyarlı olduğu saptanmıştır .

Çizelge 4.1b. *Yersinia ruckeri*'nin antibiyotiklere duyarlılığı

Antibiyotik Çapı	Duyarlılığı (Sensitivity)	
Streptomycine (S-10 mcg)	Duyarlı (+++ S)	19 mm
Chloromphenicol (C-30 mcg)	Duyarlı (+++ S)	32 mm
Ofloxacin (OFX-5 mcg)	Duyarlı (+++ S)	30 mm
Trimethoprim -Sulphamethoxazole (SXT -1,25 + 23,75 mcg)	Duyarlı (+++ S)	26 mm
Cefotaxim (CTX-30 mcg)	Duyarlı (+++ S)	32 mm
Rifamycin (RF-30 mcg)	Dirençli (R)	14 mm
Cetriaxone (CRO-30 mcg)	Duyarlı (+++ S)	29 mm
Ampicilin (AM-10 mcg)	Duyarlı (+++ S)	20 mm
Kanamycin (K_30 mcg)	Duyarlı (+++ S)	19 mm
Meziocillin (MEZ-75 mcg)	Duyarlı (+++ S)	20 mm
Ceftozidime (CAZ-30 mcg)	Duyarlı (+++ S)	24 mm
Amikacin (AK-30 mcg)	Duyarlı (+++ S)	22 mm
Penicilin (P-10 units)	Dirençli (R)	0
Lincomycin (My- 2 µg)	Dirençli (R)	0
Erythromycine (E-15 mcg)	Duyarlı (++ S)	17 mm
Cefuroxime (CXM-30 mcg)	Duyarlı (+++ S)	26 mm
Cefoperazone (CFP-75 µg)	Duyarlı (+++ S)	22 mm
Gentamycine (CN-10 mcg)	Duyarlı (+++ S)	16 mm
Sulbactam (SAM-20 µg)	Duyarlı (+++ S)	22 mm

S = sensitive (Duyarlı) R= Resistance (Dirençli)



Resim 6. *Yersinia ruckeri* 'nin duyarlı olduğu antibiyotiklerden üçüne (CTX, CEP, CXM) karşı antibiyogram test sonucu
CTX:Cefotaxim, CEP:Cefoperozone, CXM;Cefuroxime

4.2. Deneysel Enfeksiyon Oluşturan Balıklarda Otopsi ve Histopatoloji Bulguları

Gökkuşluğu alabalıklarına patojen *Yersinia ruckeri* suşundan hazırlanan inokulatin i.p. olarak enjeksiyonundan birkaç saat sonra bazılarının renklerinde koyulaşma, daha sonra iştahsızlık ve durgunluk dikkati çekmiştir (Resim 7).

Enjeksiyondan 5 gün sonra balıklarda ölümler başlamıştır. Ölmek üzere olan balıklarda pektoral, pelvik, anal, kaudal yüzgeçlerin tabanında hemoraji ve enfeksiyon bölgesinde, gözlerde, anüs bölgesinde hemorajiler gözlenmiştir (Resim 8, 9). Enfekte balıkların ağız bölgesinde alt çene, üst çene ve dil üzerinde ERM hastalığının ismine yakıştır şekilde yaygın hemorajiler gözlenmiştir (Resim 10).



Resim 7. Patojen bakteri enjeksiyonundan bir kaç saat sonra renkleri koyulaşmış alabalıklar



Resim 8. Deneysel olarak enfekte edilen alabalığın yüzgeçlerinde, gözlerinde ve enjeksiyon bölgesinde (dorsal yüzgecin hemen altında) hemorajiler

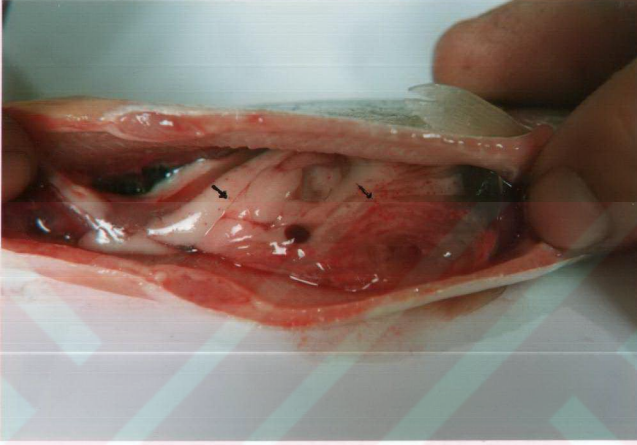


Resim 9. Deneysel olarak enfekte edilen alabalığın yüzgeçlerinde ve anüs bölgesinde hemorajiler



Resim 10. Deneysel olarak enfekte edilen alabalığın ağız bölgesinde alt ve üst çenede, dil üzerinde hemorajik bölgeler

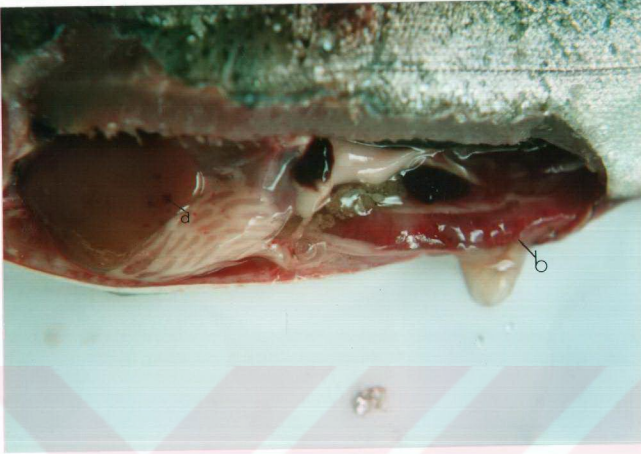
Deneysel olarak enfekte edilen alabalıkların otopsisinde karaciğerde nokta şeklinde peteşiyal ve iri ekimoze şeklinde hemorajiler, yanısıra hava kesesi, gonadlar, bağırsak, yağ dokusu, lateral vücut kaslarında , pilorik sekalarda yaygın peteşiyal hemorajiler, dalakta büyüme, bağırsakta koyu kıvamlı eksudat gözlenmiştir (Resim 11,12,13,14).



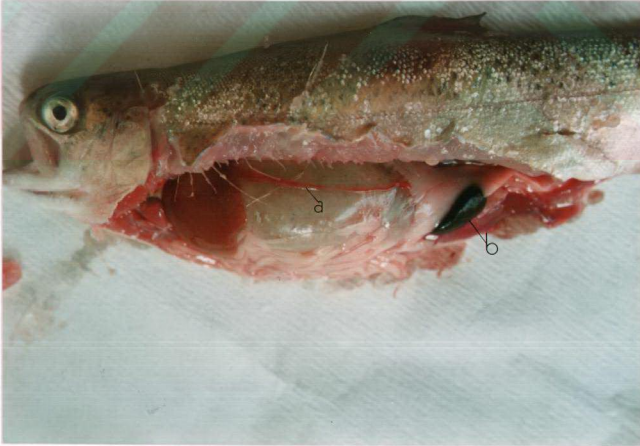
Resim 11. Pilorik sekalarda ve yağ dokusunda peteşiyal hemoraji (okla gösterilmiştir)



Resim 12. Karaciğer ve sindirim kanalında hiperemi ve hemoraji

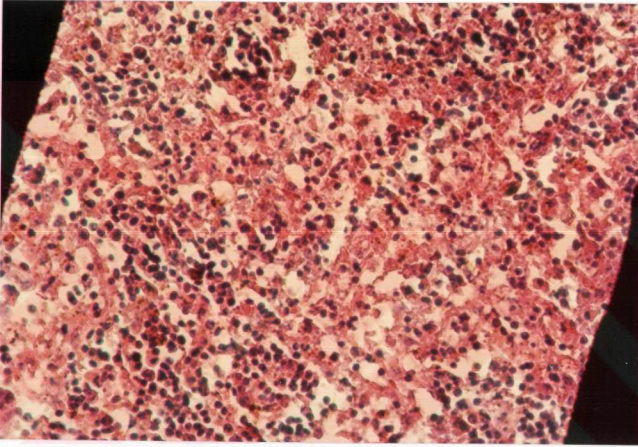


Resim 13. Karaciğerde ekimoze şekilde hemorajji(a), muköz bir sıvı ile dolu yangılı hemorajik bağırsak(b)



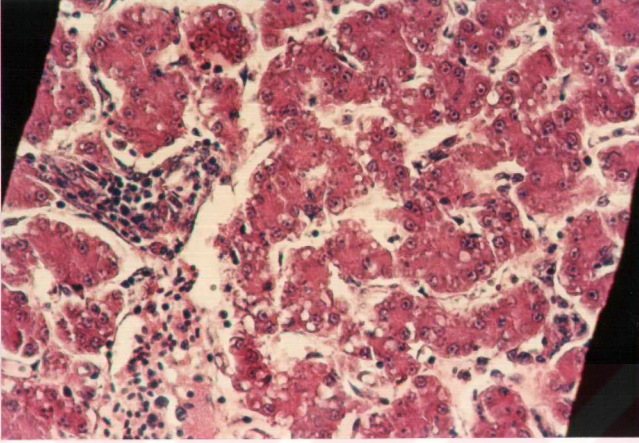
Resim 14. İmmature gonadlarda hemorajji ve dalakta büyüme
a. immature gonadlarda hemorajji
b. dalakta büyüme

Histopatolojik olarak karaciğer, böbrek dalak gibi viseral organlarda nekrotik odaklar yanısıra lökosit infiltrasyonu ve bu organların dokularında hemorajiler, (Resim 15, 16, 17, 18) mide bağırsak ve pilorik seka mukoza epitel hücrelerinde dökülmeler (Resim 19) yanısıra sindirim kanalı duvarında inflamatorik selüler reaksiyon ve peteşiyal hemorajiler gözlenmiştir. Solungaç epitel hücrelerinde dökülmeler saptanmıştır. Böbrek ve dalağın hemapoietik doku hücrelerinde azalma ve nekroz gözlenmiştir (Resim 18,20).



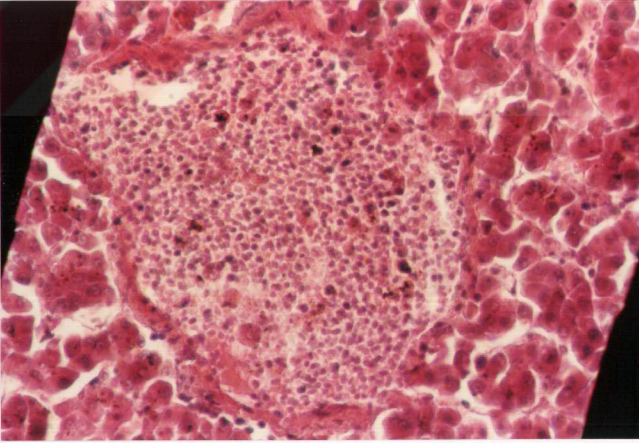
Resim 15.Nekrotik karaciğer hücreleri ve selüler infiltrasyon (lökosit ve eritrosit)

H+E x200



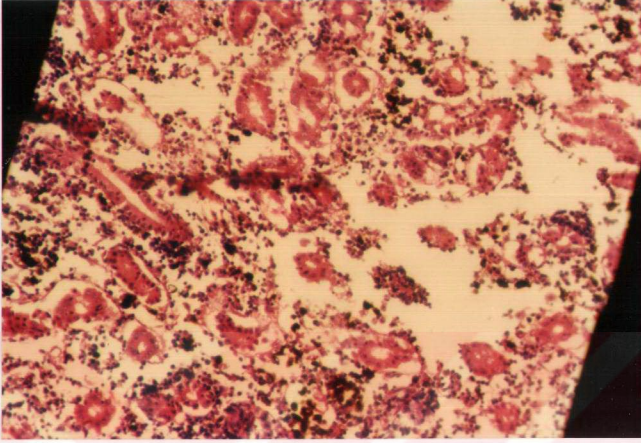
Resim 16. Karaciğer hücrelerinde dejenerasyon, nekroz ve kapillar hiperemi

H+E X200



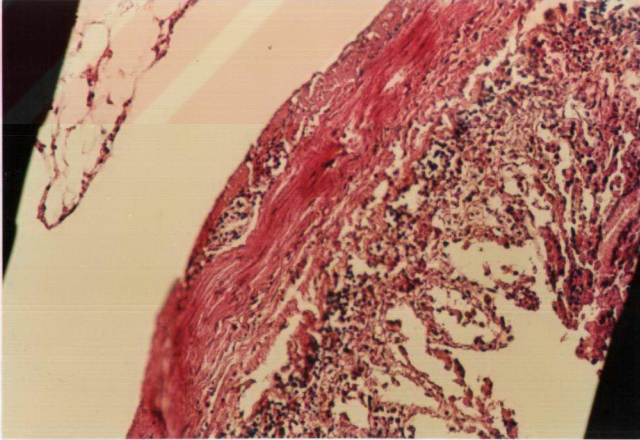
Resim 17. Karaciğer parankim dokusunda hemoraji

H+E X100



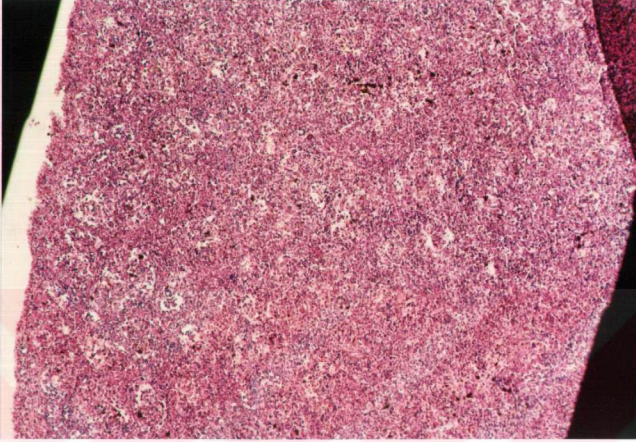
Resim 18. Renal doku ve interrenal lenfoid dokuda nekroz

H+E X100



Resim 19. Bağırsak mukoza epitelyumunda dökülme ve bağırsak duvarında selüler infiltrasyon

H+E X100



Resim 20. Dalakta hemapoietik hücrelerde boşalma.

H+E X40

4.3. Enfekte Edilen Balıklarda ERM' nin İnkübasyon Süresi ve Mortalitesi İle İlgili Bulgular

Deneme balıklarına *Yersinia ruckeri* patojeninin dorsal yüzgecin altından intramuskular olarak verilmesinden 5 gün sonra 12°C su sıcaklığında spesifik ölümler başladığı için ERM'nin inkübasyon süresi bu çalışmada 5 gün olarak tespit edilmiştir. Ölümler deneme balıklarına patojen enjeksiyonun yapıldığı günden 10. güne kadar devam etmiş sonra da durmuştur. Ölen balıkların günlere göre dağılımı Çizelge (4.3.) de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Enfeksiyondan ölen gökkuşuğu alabalıklarının günlere göre dağılımı

Günler	Ölen balık sayısı
5. Gün	1
6. Gün	1
7. Gün	1
8. Gün	5
9. Gün	1
10. Gün	1

Patojen bakteri enjeksiyonu yapılan 20 adet gökkuşuğu alabalığından 5 gün içinde 10 tanesi ölmüştür. Bu nedenle balıklarda mortalite oranı % 50 olarak değerlendirilmiştir.

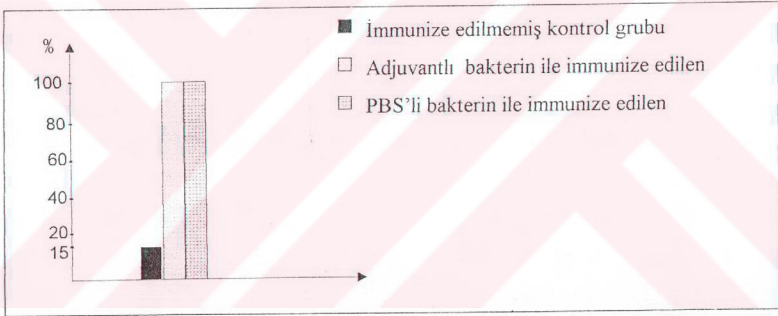
4.4. İmmun Balıklara Patojen Bakteri Verilerek (Challenge) Koruyucu İmmunitenin Kontrolü

Yersinia ruckeri bakterinin Freund's incomplete adjuvant veya sadece PBS içinde i.p. olarak verilmesiyle immunize edilen gökkuşuğu alabalıklarında yüksek bir koruyucu immunitenin oluştuğu bu balıklara kontrol amacıyla yapılan patojen bakteri enjeksiyonundan 3 gün sonra sadece kontrol balıklarında ölümlerin görülmesiyle anlaşılmıştır. Kontrol balıklarında ölümler 3 gün sonra başlamış 9 gün sonra sona ermiştir.

Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren bakterin ile immunize edilen balıklarda üç hafta sonra RPS formülüne göre hayatta kalma oranı % 100 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4, Şekil 4.4.). Kontrol grubundaki balıkların 9 gün sonunda 17 tanesi öldüğü için bu balıklarda mortalite oranı % 85 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Patogen bakteri verilen (challenge) immün gökkuşağı alabalıklarında hayatta kalma yüzdeleri

Test Grupları	Toplam Balık Sayısı	Spesifik Ölen Balık Sayısı	Hayatta Kalma Yüzdesi (RPS)
Adjuvanlı bakterin ile immunize edilen	20	-	100
PBS'li bakterin ile immunize edilen	20	-	100
Kontrol grubu	20	17	-

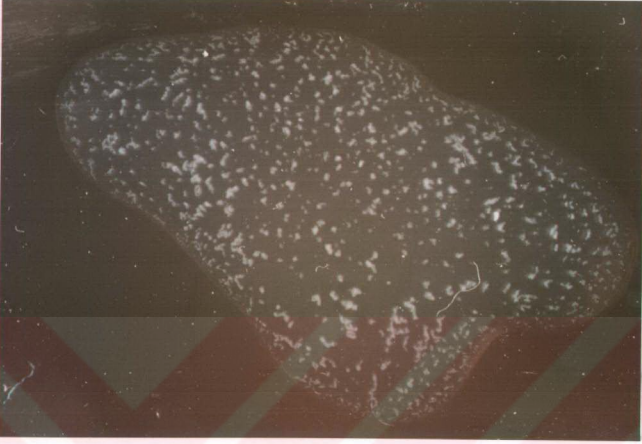


Şekil 4.4. Patogen bakteri verilen (challenge) immün ve kontrol grubu balıklarda hayatta kalma yüzdesi.

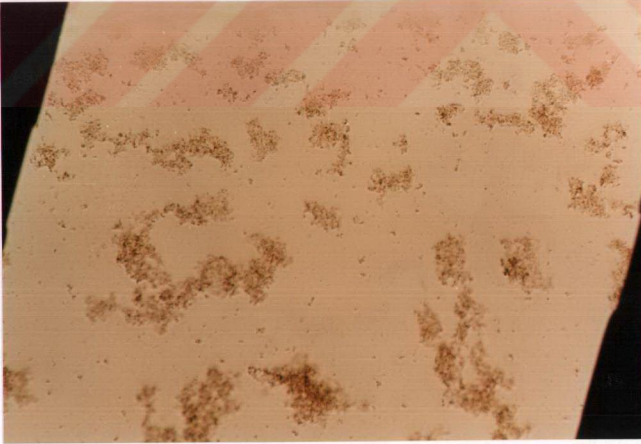
4.5. Antikor Tespitinde Kullanılan Serolojik Yöntemlerle İlgili Bulgular

4.5.1. Lam Aglutinasyon Testi İle İlgili Bulgular

Aglutinasyon antijeni ile test serumlarının lam üzerinde karıştırılması halinde makroskopik olarak gözle görülebilen beyaz çökelekler gözlenmiştir (Resim 21). Aglutinasyonun olduğu lamların ışık mikroskobu altında incelenmesi halinde bakterilerle antikorun oluşturduğu kümeleşmeler belirgin şekilde gözlenmiştir (Resim 22).



Resim 21. *Yersinia ruckeri* suşu ile hazırlanan aglutinasyon antijeni ile immün test serumlarının oluşturduğu lam aglutinasyon testinde oluşan beyaz çökelekler (çıplak gözle)



Resim 22. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antijenin oluşturduğu kümelerin ışık mikroskobunda görünümü

X40

4.5.1.1. *Yersinia ruckeri* Bakterini İle İmmunize Edilen Alabalık Serumları İle İlgili Lam Aglutinasyon Bulguları

Freund's incomplete adjuvantlı ve PBS'li bakterin ile immunize edilen deneme balıklarından 20 hafta süresince her hafta deneme gruplarından birer balık tesadüfî olarak seçilmek suretiyle yakalanarak kuyruk kesme yöntemi ile kanları alınıp serumları elde edilmiştir. Deneme gruplarına ait balıkların serumlarındaki antikorların aglutinasyon sonuçları Çizelge (4.5.1.1.)'de gösterilmiştir. Çizelge (4.5.1.1.)'nin incelenmesinden anlaşılacağı üzere immunizasyondan sonraki 1. hafta sonunda balıkların kan serumunda antikor oluşmadığı 2. haftada PBS'li bakterin ile immunize edilen gruptaki balıklarda zayıf bir antikor teşekkülünün başladığı 3. haftada her iki grupta ki balıkların kanında aglutinin antikorunun oluştuğu görülmüştür. Beşinci haftadan itibaren her iki gruba ait örneklerde aglutinin antikorunun kuvvetli oluştuğu ve deneme süresi olan 5 ay boyunca tam kuvvetli aglutinasyon verdiği görülmektedir.

Çizelge 4.5.1.1. Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* antijeni ile immunize edilen alabalık gruplarının serumlarıyla yapılan lam aglutinasyon test sonuçları

İmmunizasyon sonrası haftalar	Deneme Grupları	
	I.	II.
1	-	-
2	+	-
3	+++	++
4	++++	++
5	++++	++++
6	++++	++++
7	++++	+++
8	++++	++++
9	++++	++++
10	++++	+++
11	++++	++++
12	+++	++++
13	++++	++++
14	++++	++++
15	++++	++++
16	++++	++++
17	++++	++++
18	+++	++++
19	++++	+++
20	+++	+++

I. PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu

II. Freund's incomplete adjuvant içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu

- : Aglutinasyon yok + : Zayıf Aglutinasyon ++ : Orta Dereceli Aglutinasyon

+++ : Kuvvetli Aglutinasyon +++++ : Tam Aglutinasyon

4.5.1.2. Deneysel Olarak Patojen Bakteri İle Enfekte edilen Alabalıkların Serumlarıyla İlgili Lam Aglutinasyon Bulguları.

Deneysel olarak enfekte edilen alabalıkların hayatta kalan bireylerin serumlarında aglutinin antikorlarının oluştuğu lam aglutinasyon testi ile tespit edilmiştir. Deneysel olarak patojen bakteri enjeksiyonundan sonra denemenin bittiği 13. haftaya kadar hayatta kalan balıklarda kuvvetli aglutinin antikoru oluşmuştur. Hayatta kalan balıklardan alınan serumlarla ilgili lam aglutinasyon test sonuçları Çizelge (4.5.1.2.)' de verilmiştir.

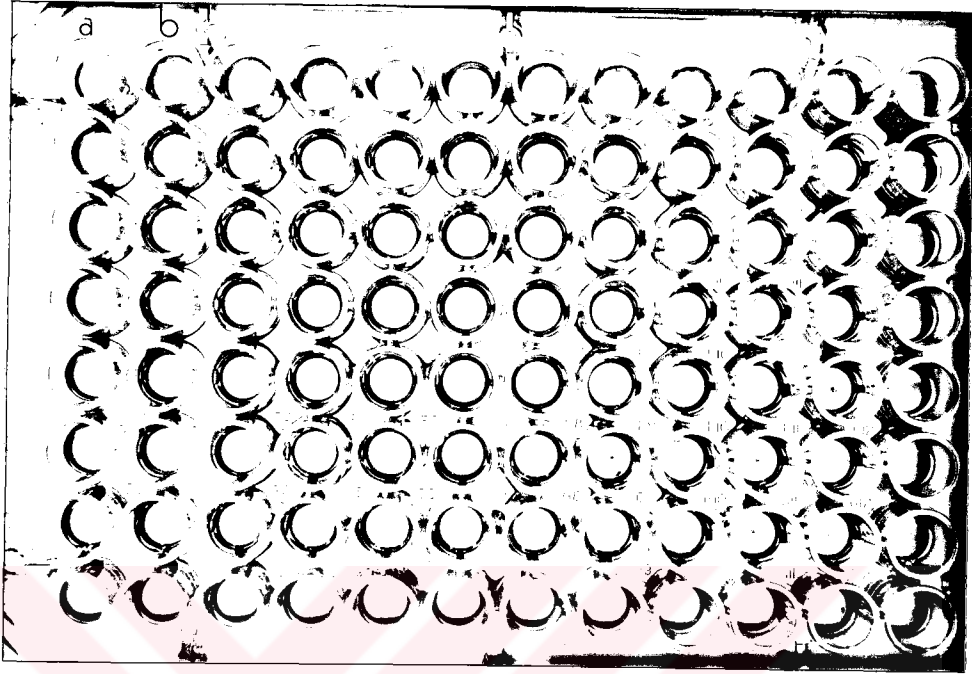
Çizelge 4.5.1.2. Deneysel olarak oluşturulan enfeksiyondan hayatta kalan alabalıkların serumlarına ait deneme süresince haftalık lam aglutinasyon sonuçları.

Enjeksiyon sonrası haftalar	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Lam Aglutinasyon Sonuçları	++++	++++	+++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++

- : Aglutinasyon yok, + : zayıf aglutinasyon, ++: orta dereceli aglutinasyon,
+++ : kuvvetli aglutinasyon, ++++ : tam aglutinasyon

4.5.2. Mikroaglutinasyon Testi İle İlgili Bulgular

Aglutinasyon antikoru içeren test serumlarının polyester yuvarlak tabanlı microwell plate çukurlarında antijen ile karıştırılması sonucunda gözle görülebilen aglutinasyon çökelekleri oluşmuştur (Resim 23).



Resim 23. Pozitif ve negatif test serumlarını içeren microwell aglutinasyon plate çukurları

a. negatif serum içeren çukur sırası

b. pozitif serum içeren çukur sırası

4.5.2.1. *Yersinia ruckeri* Bakterini İle İmmunize Edilen Alabalık Serumlarıyla İlgili Mikroaglutinasyon Bulguları.

Freund's incomplete adjuvanlı (I.deneme grubu) ve PBS'li bakterin (II. deneme grubu) ile immunize edilen balıklardan 20 hafta süre içinde elde edilen serumlardan hazırlanan mikroaglutinasyon testine ait antikor titre sonuçları Çizelge (4.5.2.1.) ve Şekil (4.5.2.1.) de verilmiştir. Çizelge (4.5.2.1.)'nin incelenmesinden anlaşılacağı üzere Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren bakterin ile immunize edilen deneme gruplarında 1. hafta hiç bir dilüsyonda aglutinasyon görülmezken 2. haftada I. grupta 1/64 dilüsyonda aglutinasyon gözlenmeye başlandığı II. grupta aglutinasyonun 1/8 dilüsyonunda 3. haftada gözlemlendiği anlaşılmaktadır. 5-7. haftalardan itibaren 1/512 - 1/1024 dilüsyonlarında aglutinasyon gözlemlendiği ve Freund's incomplete adjuvant ile verilen bakterinin oluşturduğu

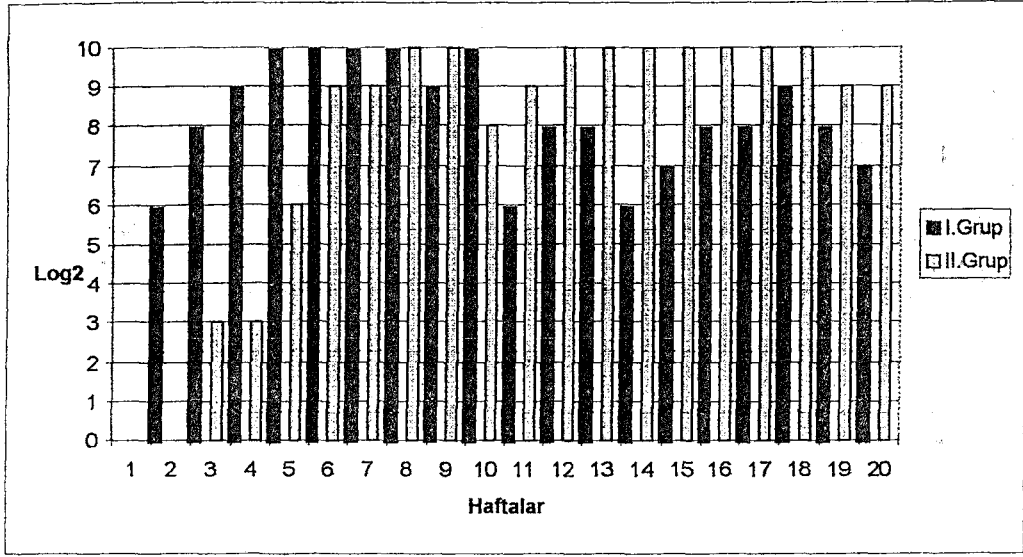
aglutininlerin kuvvetlendirici (booster) ikinci enjeksiyonuna rağmen 12. haftadan sonra PBS'li bakterin enjeksiyonundan daha yüksek titreli aglutinin antikorları oluşturduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.5.2.1. Adjuvanlı ve PBS'li bakterin ile immunize edilen balıkların immunizasyondan sonraki haftalarda mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri

İmmunizasyon sonrası haftalar	Deneme Grupları			
	I.		II.	
		Log ₂		Log ₂
1	-	-	-	-
2	64	6	-	-
3	256	8	8	3
4	512	9	8	3
5	1024	10	64	6
6	1024	10	512	9
7	1024	10	512	9
8	1024	10	1024	10
9	512	9	1024	10
10	1024	10	256	8
11	64	6	512	9
12	256	8	1024	10
13	256	8	1024	10
14	64	6	1024	10
15	128	7	1024	10
16	256	8	1024	10
17	256	8	1024	10
18	512	9	1024	10
19	256	8	512	9
20	128	7	512	9

I.PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu

II.Freund's incomplete adjuvant içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu



Şekil 4.5.2.1. Freund's incomplete adjuvantlı ve PBS'li bakterinin i.p. enjeksiyonundan sonra alabalıkların kan serumunda oluşan aglutinin titrelerinin (Log₂) haftalık dağılımı

I.PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu

II.Freund's incomplete adjuvant içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu

4.5.2.2. Deneysel Olarak Patojen Bakteri İle Enfekte Edilen Alabalık serumları İle İlgili Mikroaglutinasyon Bulguları

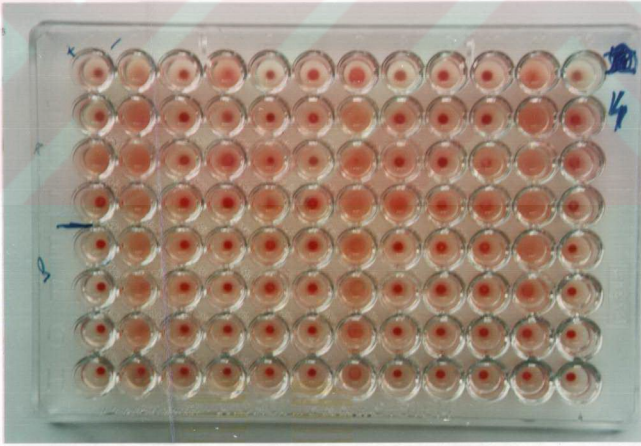
Deneysel olarak enfekte edilen balıklarının hayatta kalanlarının mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri Çizelge (4.5.2.2.)'de verilmiştir. Çizelge (4.5.2.2.)'de görüldüğü gibi mikroaglutinasyon testine göre deneysel enfeksiyondan sonra 13 haftaya kadar serumda aglutinasyon antikorları tespit edilmiş ve titrelerinin 1/128-1/512 arasında olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.5.2.2. Deneysel olarak enfekte edilen balıklardan hayatta kalanlarının serumlarındaki mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri

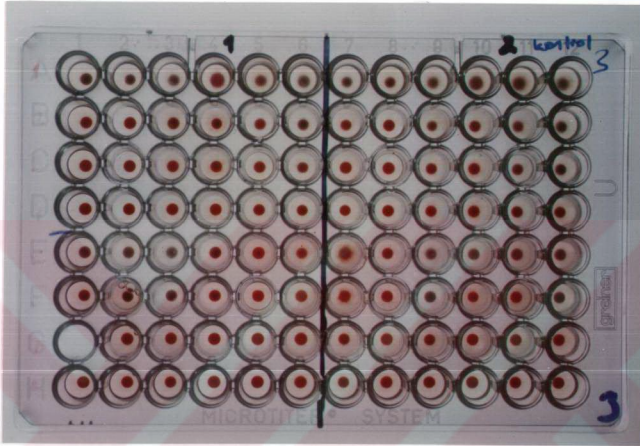
Enjeksiyondan Sonraki Haftalar	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Antikor titresi	256	256	128	512	512	512	128	128	128	128
Log ₂ ' ye göre	8	8	7	9	9	9	7	7	7	7

4.5.3. Pasif Hemaglutinasyon Testi İle İlgili Bulgular

Yuvarlak tabanlı microwell plate çukurlarına konan farklı test serumlarına antijenle kaplanmış koyun eritrositleri ilave edilip dikkatlice karışmaları sağlandığında dantel tarzında çöküntünün oluştuğu çukurlarda reaksiyon pozitif olarak değerlendirilirken koyun eritrositlerinin düğme şeklinde kümeleştiği çukurlardaki reaksiyonlarda negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Resim 24). Antijen kaplanmamış koyun eritrosit konan kontrol microwell plate çukurlarında eritrositlerin düğme şeklinde çöktüğü gözlenmiştir (Resim 25).



Resim 24. Microwell aglutinasyon plate çukurlarında pozitif ve negatif pasif hemaglutinasyon reaksiyonu



Resim 25. Kontrol plate'nin tüm çukurlarında oluşan negatif pasif hemaglutinasyon reaksiyonu

4.5.3.1. *Yersinia ruckeri* Bakterini İle İmmunize Edilen Alabalık Serumlarıyla İlgili Pasif Hemaglutinasyon Testi Bulguları

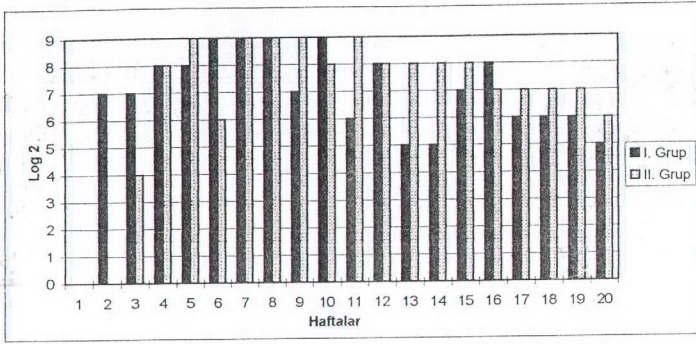
Freund's incomplete adjuvantlı (I.deneme grubu) ve PBS'li (II.deneme grubu) içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların pasif hemaglutinasyon testine göre serum antikor titreleri Çizelge (4.5.3.1.) de ve Şekil (4.5.3.1.) de verilmiştir. Çizelge (4.5.3.1.) ve Şekil (4.5.3.1.) incelendiğinde yine immunize edilen balıkların kan serumunda 1. haftada aglutinin antikorlarının oluşmadığı ; 2. haftada I. deneme grubunda, 3. haftada II. deneme grubunda zayıf olarak başlayan aglutinin antikorlarının 6. ve 7. haftalarda kuvvetli teşekkül ettiği görülmektedir. Denemenin devam ettiği 18. haftaya doğru antikor seviyesinin yine kuvvetli olduğu ancak biraz azaldığı anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.5.3.1. Freund's incomplete adjuvant ve PBS içiren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların pasif hemaglutinasyon testi ile belirlenen haftalık antikor titreleri.

İmmünizasyon sonrası haftalar	Deneme Grupları			
	I.		II.	
		Log ₂		Log ₂
1	-	-	-	-
2	128	7	-	-
3	128	7	16	4
4	256	8	256	8
5	256	8	512	9
6	512	9	64	6
7	512	9	512	9
8	512	9	512	9
9	128	7	512	9
10	512	9	256	8
11	64	6	512	9
12	256	8	256	8
13	32	5	256	8
14	32	5	256	8
15	128	7	256	8
16	256	8	128	7
17	64	6	128	7
18	64	6	128	7
19	64	6	128	7
20	32	5	64	6

I.PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu

II.Freund's incomplete adjuvant içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu



Şekil 4.5.3.1. Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların pasif hemaglutinasyon testi ile belirlenen antikorlar titrelerinin haftalık dağılımı

I.PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu

II.Freund's incomplete adjuvant içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu

4.5.3.2. Deneysel Olarak Patojen Bakteri İle Enfekte Edilen Alabalık serumlarıyla İlgili Pasif Hemaglutinasyon Test Bulguları

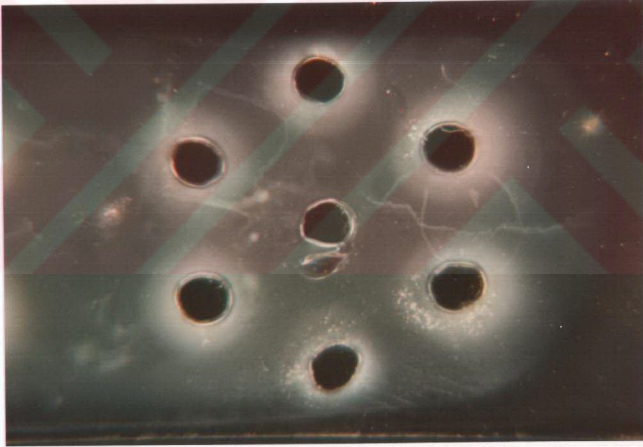
Deneysel olarak *Yersinia ruckeri* ile enfekte edilen balıkların hayatta kalan fertlerine ait pasif hemaglutinasyon testi ile ortaya çıkarılan aglutinasyon titreleri Çizelge (4.5.3.2.) de verilmiştir. Balıklara deneysel olarak patojen enjeksiyonu takiben 13 haftalık deneme süresince hayatta kalanların balıkların kan serumlarındaki pasif hemaglutinasyon testi ile antikor varlığı tespit edilmiştir ve antikor titresi (1/32) ile (1/256) arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.5.3.2.).

Çizelge 4.5.3.2. Deneysel olarak patojen *Yersinia ruckeri* ile enfekte edilen balıkların serumlarındaki antikor titresine ait pasif hemaglutinasyon test sonuçları

Enjeksiyondan Sonraki Haftalar	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Antikor titresi	256	256	256	256	256	128	128	128	128	128
Log ₂	8	8	8	8	8	7	7	7	7	7

4.5.4. İmmunodiffüzyon (ID) Testi İle İlgili Bulgular

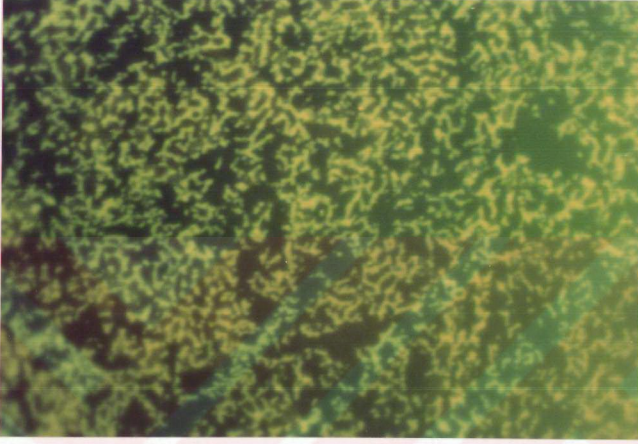
İntraperitoneal olarak *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların test serumlarını eriyik halindeki *Yersinia ruckeri* antijeni ile birleştirilmek için lam üzerine veya küçük petri kutularına dökülen saf agarda açılan çukurlarda ortadakine antijen çevredekilere test serumları konulduğunda, ortadaki antijen çukuru ile çevredeki test serumları arasında oluşması beklenen presipitasyon çizgilerinin oluşmadığı fakat test serum çukurlarının etrafında halka halinde bir bulanık zonun oluştuğu gözlenmiştir (Resim 26). Antijen ve test serumlarını içeren çukurlar arasında oluşması beklenen bulanık presipitasyon çizgileri oluşmamıştır.



Resim 26. Lam üzerinde immünodiffüzyon testi

4.5.5. İndirekt Floresans Antikor Testi (IFAT) İlgili Bulgular

İndirekt floresans antikor testi uygulanırken antijenin fiksasyon işleminde kullanılan iki yöntemden 60 °C de 5 dk tutma yönteminin, asetonla fiks etme yönteminden daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Antiserum ve konjugat titrasyon uygulamalarında da 1/10 dilüsyondaki balık antiserumu ve 1/80 dilüsyondaki konjugattan en iyi sonuç alındığı için testlerde bu titreler kullanılmıştır. İndirekt floresans testinin uygulaması sırasında lam üzerine elmas uçlu kalem ile çizilen halkaların içine antijen konularak fiksasyonu takiben, bu antijen kaplı halkalara pozitif , negatif ve test serumları damlatılarak antijen ve antikorun birleşmesi sağlanmıştır ve bu birleşmenin floresans mikroskopta görülmesinin temini içinde daha sonra bu halkalara daha sonra salmon antikoruna karşı oluşturulmuş ticari polyclonal tavşan antiserumu ve daha sonra Evans blue içeren FITC ile işaretli keçi antitavşan immunoglobulini damlatılarak antijen + antikor kompleksinin floresans mikroskopta floresans (elma yeşili renk) görülmesi sağlanmıştır (Resim 27). Sonuçların değerlendirilmesinde floresans yoğunluğuna göre kuvvetli, orta dereceli, zayıf veya floresans yok diye değerlendirilmiştir. IFAT testinin değerlendirilmesinde foto mikroskobun otomatik zaman ayarlayıcısının floresans ışığa göre çekim süresinin kısa veya uzun olma farklılığı da floresans yoğunluğunun kuvvetli, orta, zayıf veya yok diye değerlendirilmesinde ikinci bir kriter olmuştur. Kuvvetli floresans veren preparatlarda çekim süresi çok kısa bir zaman aralığına (15-48 sn) sahip olmuştur. Negatif ve kontrol serumlarının bulunduğu halkalarda floresans serumda spesifik antikor bulunmadığı için görülmemiştir.



Resim 27. FITC ile işaretli anti-tavşan immunoglobulin ,salmon antikoruna karşı oluşturulmuş ticari polyclonal tavşan antiserumu ve *Yersinia ruckeri* antijen-antikor kompleksinin floresans mikroskopta görünümü

4.5.5.1. *Yersinia ruckeri* Bakterini İle İmmunize Edilen Alabalık Serumlarına Ait IFAT Testi İle Bulgular.

Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların serumlarındaki antikor seviyeleri ile ilgili olarak yürütülen IFAT testinin sonuçları Çizelge (4.5.5.1) de verilmiştir. Bu testte diğer serolojik testlerde olduğu gibi bakterin enjeksiyonundan sonraki 1. haftada antikorun varlığı tespit edilemezken 2-3. haftalarda denemenin her iki grubuna ait balıklarda zayıf bir antikor teşekkülü 4. haftadan itibaren 20. haftaya kadar kuvvetli antikor teşekkülü kuvvetli floresans ışığın gözlenmesi ile tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5.5.1. Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen alabalık gruplarının serumlarına ait haftalık IFAT sonuçları

İmmünizasyon Sonrası Haftalar	Deneme Grupları	
	I.	II.
1	-	-
2	++	-
3	++	+++
4	++++	++++
5	++++	++++
6	++++	++++
7	++++	-
8	++++	++++
9	++++	++++
10	++++	++++
11	++++	++++
12	++++	+++
13	++++	++
14	++++	++++
15	++++	++++
16	++++	++++
17	++++	++++
18	++++	++++
19	++++	++++
20	++++	+++

I.PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu

II.Freund's incomplete adjuvant içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu

- : fluoresans yok + : var fakat zayıf fluoresans ++ : fluoresans var

+++ : orta dereceli fluoresans ++++ : kuvvetli fluoresans

4.5.5.2. Deneysel Olarak Patojen Bakteri İle Enfekte Edilen Alabalıkların Serumlarıyla İlgili IFAT Test Bulguları.

Deneysel olarak patojen *Yersinia ruckeri* ile enfekte edilen alabalıkların hayatta kalanlarına ait serum antikorlar seviyelerinin IFAT testi sonuçları Çizelge (4.5.5.2.) incelendiğinde patojen bakterinin enjeksiyonundan sonraki 5. haftadan itibaren enfekte balıkların kanında antikor oluştuğu görülmektedir.

Çizelge 4.5.5.2. Deneysel olarak patojen *Yersinia ruckeri* ile enfekte edilen alabalıkların serumlarındaki antikor seviyelerine ait IFAT test sonuçları (deneme süresince)

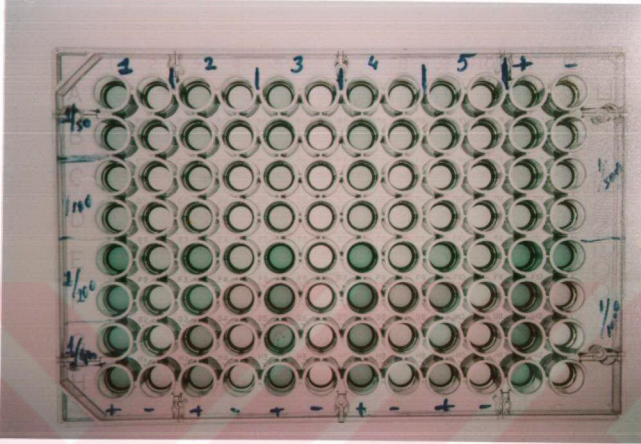
Enjeksiyondan Sonraki												
Haftalar	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
IFAT Sonuçları	-	+++	++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- : floresans yok + : var fakat zayıf floresans ++ : floresans var

+++ : orta dereceli floresans ++++ : kuvvetli floresans

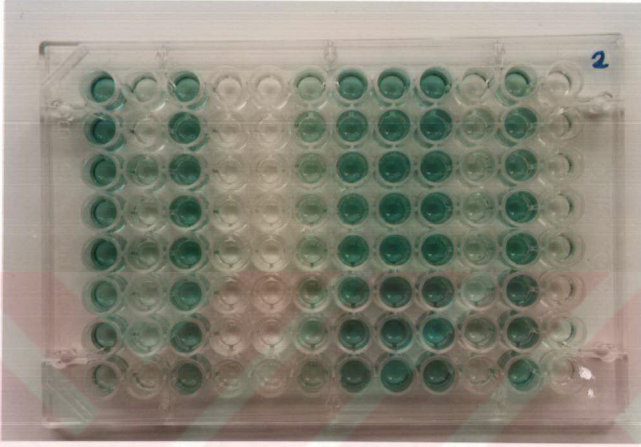
4.5.6. Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Testi İle İlgili Bulgular

ELISA testinin başarılı bir şekilde uygulanabilmesi için uygun eriyik antijen protein miktarı ile uygun antiserum ve konjugat titrelerinin tespiti amacıyla microwell plate üzerinde ön deneme çalışmaları yapılarak en iyi pozitif reaksiyon oluşturan antijen protein yoğunluğu, antiserum ve konjugat dilüsyonlarına ait değerler tespit edilerek deneme süresince bu değerlerdeki protein yoğunluğu, antiserum ve konjugat dilüsyonları kullanılmıştır (Resim 28). En iyi pozitif reaksiyon oluşturan antijen protein yoğunluğu 5µg/ml, antiserum dilüsyonu 1/400 ve konjugat dilüsyonu ise 1/1000 olarak tespit edilmiştir.



Resim 28. ELİSA testine ait en iyi pozitif reaksiyon olduğu antijen protein değeri antiserum (1/400) ve konjugat dilüsyonlarının (1/1000)tespit edildiği microwell plate (yeşil renk pozitif reaksiyon)

Yersinia ruckeri eriyik antijeni ile kaplanmış microwell çukurlarına bloklama işleminden sonra birinci sıradaki çukurlar pozitif serum, ikinci sıradaki çukurlar negatif serum diğer on sıra çukura test serumları konarak ve gerekli dilüsyonlar yapılarak antijen ve antikorun bağlanması sağlandıktan sonra salmon antikoruna karşı oluşturulmuş ticari polyclonal tavşan antiserumu ve daha sonra peroxidase işaretli anti-tavşan IgG konjugatı ve substrat ilavesinden sonra renk değişimi gözlenmiştir. Bu renk değişimleri spektrofotometrede optik yoğunluk olarak okunduktan sonra test serumlarının antikor titreleri ortaya çıkarılmıştır (Resim 29). Yeşil renk pozitif reaksiyonu gösterir.



Resim 29. ELİSA testinin uygulandığı microwell plate'de renk reaksiyonları (yeşil renk pozitif reaksiyonu gösterir).

4.5.6.1. *Yersinia ruckeri* Bakterini İle İmmunize Edilen Alabalık Serumlarına Ait ELİSA Testi İle İlgili Bulgular

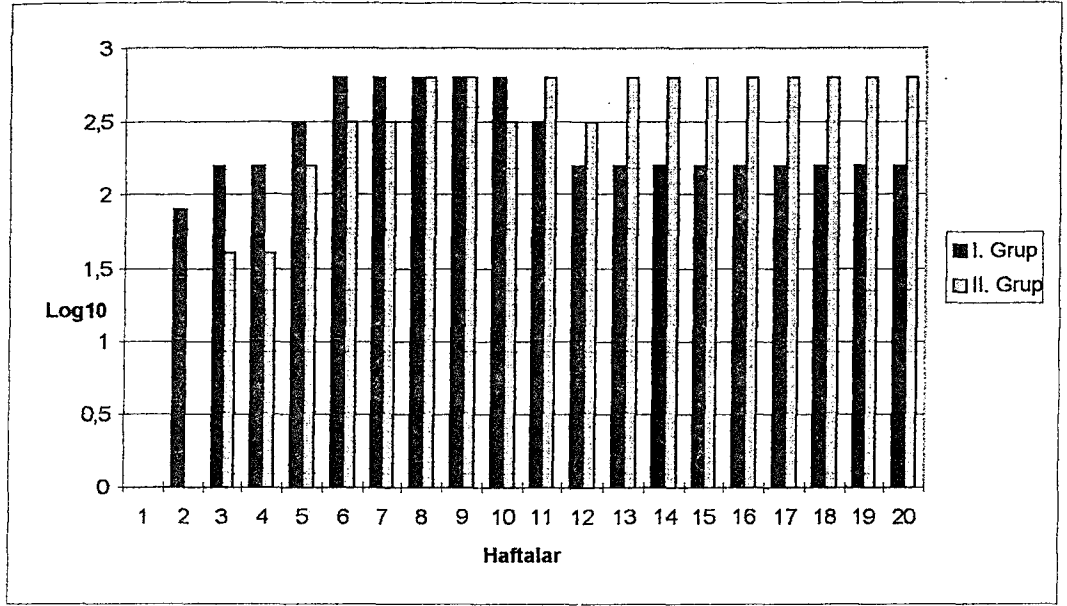
Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen alabalıkların serumlarındaki antikor titrelere ilgili olarak yürütölen ELİSA testinin sonuçları Çizelge (4.5.6.1.) de ve Şekil (4.5.6.1.) de verilmiştir. Balıklarda 1. haftada serumda antikor gözlenmemiştir. Düşük titreli antikor I. deneme grubu balıklarında, 2. haftada, II. deneme grubu balıklarında 3. haftada gözlenmesiyle başlamıştır. 6-8 haftalarda bu titrenin yükseldiği görölmüş ve I. deneme grubunda bu titrenin 11. haftada biraz düştüğü, II. deneme grubunda ise aynı titrede devam ettiği görölmüştür.

Çizelge 4.5.6.1. Freund's incomplete adjuvant ve PBS İçeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen alabalıkların ELİSA testi ile belirlenen haftalık antikor titreleri

İmmünizasyon Sonrası Haftalar	Deneme Grupları			
		I.		II.
		Log ₁₀		Log ₁₀
1	-	-	-	-
2	80	1,9	-	-
3	160	2,2	40	1,6
4	160	2,2	40	1,6
5	320	2,5	160	2,2
6	640	2,8	320	2,5
7	640	2,8	320	2,5
8	640	2,8	640	2,8
9	640	2,8	640	2,8
10	640	2,8	320	2,5
11	320	2,5	640	2,8
12	160	2,2	320	2,5
13	160	2,2	640	2,8
14	160	2,2	640	2,8
15	160	2,2	640	2,8
16	160	2,2	640	2,8
17	160	2,2	640	2,8
18	160	2,2	640	2,8
19	160	2,2	640	2,8
20	160	2,2	640	2,8

I.PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu

II.Freund's incomplete adjuvant içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu



Şekil 4.5.6.1 Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen alabalıkların kan serumunda oluşan antikor titrelerinin ELİSA testine göre haftalık dağılımı

I.PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu

II.Freund's incomplete adjuvant içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu

4.5.6.2. Deneysel Olarak Patojen Bakteri İle Enfekte Edilen Alabalıkların Serumlarıyla İlgili Test Bulguları

Deneysel olarak enfekte edilen alabalıkların hayatta kalan bireylerinin ELİSA testi ile tespit edilen serum antikor titreleri Çizelge (4.5.6.2.)'de verilmiştir. 13 haftalık deneme süresince hayatta kalan alabalıkların serum antikor titreleri ELİSA testi ile 1/320-1/640 olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.5.6.2. Deneysel olarak patojen *Yersinia ruckeri* ile enfekte edilen alabalıkların serumlarındaki antikor seviyelerine ait haftalık ELİSA test sonuçları

Enfeksiyondan Sonraki Haftalar	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ELİSA										
Antikor Titreleri	640	640	640	640	320	640	640	320	640	640
Log ₁₀	2,8	2,8	2,8	2,8	2,5	2,8	2,8	2,5	2,8	2,8

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İlk defa 1950'li yıllarda ABD'deki gökkuşacağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerinde görülen (Ross *et al.* 1966, Bullock *et al.* 1971, Busch 1982, Stevenson and Daly 1982, Frerichs and Roberts 1989) ve yüksek mortalite ile seyreden enterik kızıl ağız hastalığı (ERM) daha sonra dünyanın diğer ülkelerindeki işletmelerde de epizootikler oluşturmuştur (Bullock *et al.* 1977, Stevenson and Daly 1982, Roberts 1983, Lesel *et al.* 1983, Fuhrman *et al.* 1983, Bragg and Henton 1986). Türkiye'de ilk olarak bu hastalığın 1991 yılında Denizli'deki bir alabalık işletmesinde tespit edildiği bildirilmiştir (Timur and Timur 1991). Daha sonra bu hastalık yurdumuzun diğer bölgelerindeki alabalık işletmelerinde de görülerek alabalık işletmelerinin önemli bir hastalık sorunu haline gelmiştir (Çağırğan and Yürekli Türk 1991, Timur 1997).

Akut epizootiklerde gökkuşacağı alabalıklarında görülen halsizlik, iştahsızlık, rengin koyulaşması, gözlerin çevresinde hemorajiler, eksoftalmus, ağız ve boğaz bölgesinde, dil üzerinde ve yüzgeç diplerinde görülen subcutaneus hemorajiler gibi tipik klinik belirtiler (Busch 1982, Bullock and Anderson 1984, Ellis 1988d, Aushburner 1989, Bullock 1989, Frerichs and Roberts 1989) bu çalışmada deneysel olarak enfekte edilen gökkuşacağı alabalıklarında da gözlenmiştir.

Deneysel olarak enfekte edilen gökkuşacağı alabalıklarının otopsisinde ERM hastalığına yakalanan balıklarda gözlendiği bildirilen adipoz dokuda, viseral mezenteriumda, pankreas, pilorik kesesi, yüzme kesesi, lateral vücut kaslarında ve gonadlarda peteşiyal hemorajiler, büyümüş gevrek dalak, purulent mukoid materyal ile dolu hemorajik yangılı bir bağırsak (Busch 1982, Ellis 1988d, Bullock 1989, Timur and Timur 1991) gözlenmiştir.

Daha önce 1991 yılında Denizli'deki bir alabalık işletmesinde çıkan epizootikten Prof. Dr. Gülşen Timur tarafından izole edilen *Yersinia ruckeri* izolatından hazırlanan *Yersinia ruckeri* suşunun subkültürü deneme balıklarına i.p. enjekte edildikten sonra enfekte edilen balıklardan yeniden izole edilerek bakteri suşunun morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri incelendiğinde izolatın Gram negatif, hareketli, sitokrom oksidaz negatif, katalaz pozitif, O/F glukoz ortamında fermantatif özelliğe sahip olduğu ve *Yersinia ruckeri* suşuna özgü biyokimyasal özellikleri gösterdiği (Bullock *et al.* 1977, 1981, Busch 1982, Sanders

and Fryer 1988, Timur and Timur 1991) tespit edilmiştir. İzolat *Yersinia ruckeri* için selektif bir ortam olan tween 80 içeren Shotts-Waltman vasatında *Edwardsiella* genusunun bakterisinden farklı olarak etrafında hidroliz zonu olan yeşil koloniler oluşturmuştur (Sanders and Fryer 1988, Shotts and Teska 1989, Austin and Austin 1993).

Deneysel olarak banyo yöntemi ile oluşturulan ERM hastalığında inkübasyon süresinin 13-15°C de 5-10 gün arasında değiştiği bildirilmektedir (Bullock and Cipriano 1990, Busch 1982) Bu çalışmada deneysel olarak enfekte edilen ve 12°C su sıcaklığında tutulan gökkuşacağı alabalıklarında ölümlerin enjeksiyondan 5 gün sonra başladığı tespit edilmiştir. Patojen bakteri enjeksiyonu yapılan 20 adet gökkuşacağı alabalığından 5 gün sonra başlayan ölümlerle 5 gün içinde 10 tane balık ölmüş ve mortalite oranı % 50 olarak saptanmıştır. Doğal epizootik enfeksiyonlarda populasyonun % 30-70'inin kaybına neden olmaktadır (Busch 1982).

Deneysel olarak enfekte edilen balıkların viseral organlarından karaciğer ve böbreklerde gözlenen nekroz, yaygın hemoraji ve hiperemi, selüler infiltrasyon dalak ve böbreğin hemapoietik doku kısımlarında boşalma, bağırsak duvarında yangı ve bağırsak mukoza epitelinde dökülme şeklinde gözlenen histopatolojik bulgular diğer araştırmacılar tarafından ERM epizootiklerinden gözleendiği bildirilen tipik histopatolojik bulgulara (Busch 1982, Frerichs and Roberts 1989, Timur and Timur 1991) benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada *Yersinia ruckeri* bakterininin Freund's incomplete adjuvant veya sadece PBS içinde i.p. yolla verilmesiyle immunize edilen balıklara patojen bakteri verildiğinde (challenge) koruyucu immunitenin çok iyi geliştiği ve hayatta kalma oranının % 100 olduğu gözlenirken kontrol grubundaki balıklarda mortalite oranı % 85 olduğu dikkati çekmiştir.

Balıkların immunizasyonunda kullanılan bakterinlerin hazırlanması için bakterin inaktivasyonunda fenol, kloroform , formalin ve bakteriyel süspansiyonların sonikasyonu gibi çeşitli kimyasal madde ve yöntemler tavsiye edilmekte ise de (Anderson and Ross 1972, Amend *et al.* 1983) *Yersinia ruckeri* bakterisinden hazırlanan aşılar da aşının güvenliği ve üretim kolaylığı açısından formalin kullanıldığı için (Amend *et al.* 1983, Ellis 1988d) bu çalışmada da *Yersinia ruckeri* izolatından bakterin hazırlanmasında formalin kullanılmıştır. Formalin ile inaktive edilerek hazırlanan *Yersinia ruckeri* bakterini Freund's incomplete adjuvant içinde ve PBS içinde farklı deneme gruplarına verilmiş ancak diğer araştırmacıların

tavsiye ettiği gibi (Tatner and Horne 1985, Cossarini-Dunier 1986b, Ellis 1988a) PBS'li bakterinin Freund's incomplete adjuvantlı bakterin kadar kuvvetli immunizasyon sağlaması amacıyla bu gruba 3. hafta kuvvetlendirici 2. enjeksiyon (booster enjeksiyon) uygulaması yapılmıştır. Balıkların hayatta kalma % si ile ilgili Çizelge (4.4.)'ün ve diğer serolojik testlerle ilgili bulgulara ait diğer çizelgelerin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi antikor titrelerinin Freund's incomplete adjuvantlı bakterinin oluşturduğu serum antikor titresine yakın titrede (6.-11. haftalarda) oluşmasını sağladığı görölmektedir. Ancak bu kuvvetlendirici enjeksiyonun denemenin 11. haftasından itibaren daha düşük titrede antikor titresinin oluşmasına engel olmadığı görölmektedir.

Enfekte veya immun balıkların serumlarında mevcut antikorların antijen veya antijen taşıyıcıları ile aglutinasyon (kümeleşme) yapmak suretiyle ortaya çıkmasını sağlayan lam aglutinasyon, mikroaglutinasyon ve pasif hemaglutinasyon yöntemleri gibi çeşitli serolojik yöntemler bu çalışmada başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ancak lam aglutinasyon yöntemi; kısa sürede serumda antikorun varlığını veya yokluğunu göstermesi açısından pratik bir yöntem olarak kullanılmasına karşın uygulanması için daha uzun bir süre (24 saat) gereken mikroaglutinasyon yönteminde olduğu gibi serumdaki antikor titresinin düşük ve yüksek olarak belirlenmesi yerine sadece aglutinasyon yok, zayıf, orta veya kuvvetli aglutinasyon gibi kaba test sonuçlarını verebilmektedir. Pasif hemaglutinasyon testinde antijenle kaplanmış koyun eritrositleri mikrowell plate çukurlarında daha önceden konmuş test serumları ile dikkatlice karıştırıldığında çukurlarda oluşan dantel tarzındaki çöküntü pozitif reaksiyon kırmızı düğme tarzındaki kümeleşme reaksiyonu ise negatif reaksiyon olarak kabul edildiği için pasif hemaglutinasyon sonuçlarının okunmasının mikroaglutinasyon testi sonuçlarının okunmasından diğer araştırmacılarında bildirdiği gibi (Bilgehan 1993, Esendal 1994) daha kolay olmaktadır.

Lam aglutinasyon testi sonuçlarına göre; Freund's incomplete adjuvant veya PBS' li *Yersinia ruckeri* bakterini ile immünize edilen I. ve II. deneme grubu balıklarının serumlarında enjeksiyonu takip eden 1.hafta da antikorun oluşmadığı, 2. hafta ise PBS' li bakterin enjeksiyonu yapılan balıklarda zayıf bir aglutinasyon antikorunun oluştuğu 3. haftada her iki gruba ait balıkların serumlarında antikor oluştuğu 5. haftadan itibaren her iki gruba ait balıkların serumlarında kuvvetli aglutinasyon oluştuğu Çizelge (4.5.1.1)'nin

incelenmesinden anlaşılmaktadır. Muhtemelen PBS'li bakterin ile immunize edilen gruba 3. haftada uygulanan kuvvetlendirici (booster) enjeksiyon balıklarda Freund's incomplete adjuvantlı bakterinin oluşturduğu seviyede aglutinin antikorunun oluşmasına neden olarak deneme süresinin sonuna kadar kuvvetli bir aglutinasyon reaksiyonunun oluşmasına neden olmaktadır.

Mikroaglutinasyon ve pasif hemaglutinasyon testlerinin uygulandığı deneme ile ilgili test sonuçlarını içeren Çizelge (4.5.2.1.) ve Çizelge (4.5.3.1.) incelendiğinde I ve II nolu deneme balıklarının serumlarında aglutinin antikorlarının 2. ve 3. haftalarda zayıf olarak oluşmaya başladığı, 5 ve 7. haftalarda kan serumlarındaki aglutinasyon titresinin yükseldiği ve Freund's incomplete adjuvant ile verilen bakterinin oluşturduğu aglutinin titresinin kuvvetlendirici 2. enjeksiyon (booster injection) rağmen PBS'li bakterin enjeksiyonundan daha yüksek titrede aglutinin antikorlarının 12. haftadan itibaren oluştuğu anlaşılmaktadır.

İntraperitoneal olarak *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların serumları ile yapılan immunodiffüzyon testlerinde merkezdeki antijen çukuru ile periferdeki test serumlarının bulunduğu çukurlar arasında oluşması beklenen bulanık presipitasyon çizgilerinin (Bullock 1966, Anderson 1974, Gülmezoğlu 1975, Timur M. 1975, Ouchterlony and Nillson 1986, Bullock 1989, Bilgehan 1993, İzgür 1994) oluşmadığı ve test serum çukurlarının etrafında onları çevreleyen bulanık birer zonun oluştuğu gözlenmiştir. Ancak bu zonun presipitasyon zonu olup olmadığı anlaşılamamıştır. Ouchterlony and Nillson (1986) bu yöntemin uygulanması sırasında antijen konsantrasyonunun en yüksek olduğu şartlarda çukur etrafında tam bir halkanın oluştuğunu bildirmekte iselerde bu çalışmada eriyik antijenin çok sayıda değişik dilüsyonları denendiği halde presipitasyon çizgileri elde edilememiştir. Bu nedenle immunodiffüzyon testi sonuçları ile ilgili bulgular birçok araştırmacının da bildirdiği gibi bakteriyel balık patojenlerinin presipitin antikoru oluşturmadığı ve bazı bakterilere karşı çok zayıf oluşturduğu görüşünü desteklemektedir (Bullock 1966, Ellis 1978, Ingram and Alexander 1977).

İnsan ve veteriner hekimlikte ve balık patojenlerinin teşhisinde hızlı diagnostik test olarak kullanılan indirekt fluoresans antikor tekniği (Johnson 1974, Özcel 1978, Anderson 1993, Bilgehan 1993) bu deneysel çalışmada immun ve enfekte balık gruplarına ait kan serumlarındaki antikorların tespitinde başarıyla uygulanmıştır. PBS'li ve Freund's

incomplete adjuvantlı *Yersinia ruckeri* bakterini içeren inokulatın i.p. olarak enjeksiyonu ile immunize edilen balıkların test serumları ile ve pozitif ve negatif kontrol serumlarını içeren preparatların floresans mikroskopunda değerlendirilmesinde floresans görülme yoğunluğu diğer araştırmacıların bildirdiği gibi (Johnson 1974, Özcel 1978, Anderson 1993) zayıf, orta dereceli, kuvvetli veya floresans yok olarak değerlendirilmiştir.

Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların serumlarındaki antikor varlığı ve seviyesi ile ilgili olarak hazırlanan IFAT testine ait preparatlarda kuvvetli floresans yoğunluğunun gözlenmesi 4. haftadan itibaren 20. haftaya kadar balıkların kan serumlarında kuvvetli antikor seviyesinin oluştuğunu göstermiştir.

Son yıllarda geliştirilen ve enfeksiyonların teşhisinde çok geniş bir kullanım alanı bulan ELİSA serolojik test yöntemi balık hastalıklarının teşhisinde de geniş bir kullanım alanını bulmuştur (Engvall and Perlmann 1972, Voller *et al.* 1976, 1979, Dixon 1985, Manfredi 1986, Nakamura *et al.* 1986, Austin 1988, Arkoosh and Kaattari 1993, Yardımcı vd. 1993, İzgür 1994, Yardımcı vd. 1994). ELİSA testi çok hassas ve fazla zaman almayan bir serolojik testtir (Dixon 1985, Arkoosh and Kaattari 1993).

Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların serum antikor titreleriyle ilgili olarak yürüten ELİSA testi sonuçları da diğer serolojik testlere ait bulgularda tespit edildiği gibi deneme balıklarının immunizasyon enjeksiyonunu takip eden 1. hafta sonunda denemenin her iki grubundaki balıkların serumunda antikor oluşmadığını 2. haftada PBS'li bakterine karşı I. deneme grubu balıklarında zayıf bir antikorun oluştuğu, 3. haftada Freund's incomplete adjuvant içeren bakterine karşı II. deneme grubu balıklarında antikor oluşmaya başladığını, 4-5. haftalarda ise her iki gruba ait balıklarda antikor titresinin yükseldiğini ve denemenin son bulduğu 20. haftaya kadar adjuvantlı bakterin ile immunize edilen alabalıkların kan serumlarının biraz daha yüksek titrede antikor içerdiklerini göstermiştir.

Yersinia ruckeri bakterinine karşı deneme balıklarının kan serumunda oluşan antikorların üretim fazı süresine (2-3 hafta) ait bulgular diğer araştırmacıların pisi ve alabalıklarda bildirdikleri üretim fazı süresiyle ilgili bulguları desteklediği gibi (Ellis 1978) denemede antikor seviyesinin geliştiği (4-5-6. haftalar) ve bu seviyenin deneme süresince (20 hafta) kan serumunda sürekli yüksek kaldığı sürelerle ait bulgular diğer araştırmacıların

bulgularını desteklemektedir (Krantz *et al.* 1963, Ellis 1978, Cossarini-Dunier 1986a,b, Hamilton *et al.* 1986, Grayson *et al.* 1987, Tatner *et al.* 1987, Ellis 1989, Navarre and Halver 1989, Wichardt and Thuvander 1989, Olesen 1991).

Bu araştırmada kullanılan IFAT ve ELİSA yöntemleri çok hassas ve fazla zaman almayan metod olarak görülmüştür. Ancak IFAT testi için fluoresans mikroskoba , IFAT ve ELİSA için ise ticari antiserum ve konjugatlara ihtiyaç duyulduğu için pahalı ve hassas yöntemler olarak değerlendirilmiştir (Dixon1985, Olesen 1991, Esnedal 1994, İzgür 1994).

Lam aglutinasyon , mikroaglutinasyon , pasif hemaglutinasyon IFAT ve ELİSA gibi serolojik testler deneysel olarak patojen *Yersinia ruckeri* bakterisi ile enjekte edilen ve hayatta kalan alabalık serumlarına uygulandığında bu balıkların serumlarında deneme süresince (enjeksiyonu takiben 13 hafta boyunca) kuvvetli antikor titresinin oluştuğu tespit edilmiştir. Bu da doğal ERM epizootiklerinde hasta balıkların serumlarında antikorların oluştuğunu ve bu nedenle serolojik testlerin yardımıyla hasta balık serumlarından antikorun tespiti ile hızlı teşhis olanağının bulunduğunu bildiren ve savunan araştırmacıların görüşünü desteklemektedir (Johnson *et al.* 1974, Busch 1982).

Sonuç olarak bu çalışmada yurdumuzda ve dünyanın birçok ülkesinde endemik bir hastalık oluşturan ERM hastalığının etkeni olan *Yersinia ruckeri* bakterisinin formalin ile inaktivasyonundan sonra alabalıklara i.p. enjeksiyonu ile bu balıkların immunizasyonu sağlanmış ve kan serumlarında oluşturulan antikorların varlığı insan ve veteriner hekimliğinde yaygın olarak kullanılan ve günümüzde diğer bir çok ülkede balık hastalıklarının teşhisinde veya immun balıkların serum antikor titrelerinin tayininde yaygın olarak kullanılmaya başlanan lam aglutinasyon, mikroaglutinasyon, pasif hemaglutinasyon IFAT ve ELİSA gibi serolojik testlerle ortaya çıkarılması sağlanarak bu balıkların test serum antikor titrelerine ait bulguların karşılaştırılması sağlanmıştır. Alabalıklara PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterisinin i.p. enjeksiyondan 1 hafta sonra Freund's incomplete adjuvant içeren bakterinin i.p. enjeksiyonundan iki hafta sonra balıkların kan serumlarında zayıf bir antikor oluşturduğu, bu antikor seviyesinin 4-5.haftalarda kuvvetlendiği, 20 haftalık deneme süresinin son haftalarında adjuvantlı bakterin ile immunize edilen balıkların serumlarında daha yüksek titrelili bir antikor seviyesinin oluştuğu serolojik testlerle ortaya çıkarılmıştır. Patojen bakteri ile deneysel olarak enfekte edilen balıkların hayatta kalanlarında

enjeksiyondan sonraki deneme süresi olan 13 hafta boyunca kuvvetli bir antikor titresinin oluştuğu yine yukarıda belirtilen serolojik testlerle tespit edilmiştir. İmmun balıklara patojen bakteri verildiğinde (challenge) koruyucu immunitenin çok iyi geliştiği görülmüş; kontrol grubu balıklarda % 85 oranında ölüm görülürken immün balıklarda hayatta kalma oranının % 100 olduğu tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

- AAKRE, R., WERGELAND, H. I., AASJORD, P. M., ENDRESEN, C., 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing B-1, 3-M- glucan as adjuvant. Fish & Shellfish Immunology, 4, 47-61.
- ADAMS, A. A., 1991. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* biotype *alginolyticus* in penaeid shrimps using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay. Aquaculture, 93, 101-108.
- ADAMS, A., AUCHINACHIE, N., BUNDY, A., TATNER, M.F., HORNE, M.T., 1988. The potency of adjuvanted injected vaccines in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and bath vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. Aquaculture, 69, 15-26.
- AINSWORTH, A.J., CAPLEY, G., WATERSTREET, P., MUNSON, D., 1986. The use of monoclonal antibodies in the indirect fluorescent antibody technique (IFA) for the diagnosis of *Edwardsiella ictaluri*. Journal of Fish Diseases, 9, 439-444.
- AKHLAGHI, M., MUNDAY, B. L., WHITTINGTON, R. J., 1993. Comparison of the efficacy of two sites of intraperitoneal injection in fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 13 (5), 176-179.
- AKŞİT, F., AKGÜN, Y., KİRAZ, N., 1991. Mikrobiyoloji. Anadolu Üniv. Yayın. No: 490, Açıköğretim Fakültesi, No: 219, 250s.
- AL-HARBI, A.H., AUSTIN, B., 1993. Purification of macroglobulins from the Serum and skin and gut mucus of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunized with lipopolysaccharide (LPS) from a fish-pathogenic Cytophaga-Like Bacterium (CLB). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 13(2), 40-45.
- AL-HARBI, A.H., AUSTIN, B., 1992. Haemolysin and Haemagglutination Activity in the Serum and Skin and Gut Mucus of Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) Immunized with Lipopoly-saccharide (LPS) From a Fish Pathogenic Cytophaga-like bacterium (CB). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 12(1), 14-17pp
- ALPBAZ, A.G., 1990. Deniz Balıkları Yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Basımevi Bornova, İzmir. 335s.
- ALTINTAŞ, N., 1985. Kist Hisdatik ve İç Organlar Larva Göçü Hastalıklarında İmmunolojik Tanı Yöntemleri ve Değerleri . Doktora Tezi. Ege Üniv. Tıp Fakültesi Parazitoloji Bilim Dalı. İZMİR.
- ALVAREZ, J.D., AUSTIN, B., CONROY, D.A., 1992. First outbreak of enteric redmouth in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss* , Walbaum) cultured in Venezuela. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12 (6), 189-190.
- AMEND, D.P., JOHNSON, K.A., CROY, T.R., MCCARTHY, D.H., 1983. Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins . Journal of Fish Diseases, 6, 293-299.
- ANDERSON, D.P., 1974. Fish Immunology. T.F.H. Publications Inc. Ltd., USA, 239p.
- ANDERSON, D.P., 1993. Fluorescent Antibody Test. Techniques in Fish Immunology. (STOKEN, J.S., FLETCHER, T.C., ANDERSON, D.P., ROBERSON, B.S., Van MUISWINKEL, W.B., eds.). SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303 USA, 1-8.
- ANDERSON, D. P., DIXON, O. W., 1984. Fish biologics: antisera for fish disease diagnosis. Symposia Biologica Hungarica, 23, 251-260.

- ANDERSON, D.P., NELSON, J.R., 1974. Comparison of protection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) inoculation with and fed Hagerman Redmouth Bacterins. J. Fish Res Board Can., **31**, 2, 214-216.
- ANDERSON, D.P., ROBERSON, B.S., DIXON, O.W., 1979. Plaque-forming cells and humoral antibody in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) induced by immersion in a *Yersinia ruckeri* O-antigen preparation. J. Fish Res. Board can., **36**, 636-639.
- ANDERSON, D. P., ROBERSON, B. S., DIXON, O.W., 1982. Immunosuppression induced by a corticosteroid or an alkylating agent in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) administered a *Yersinia ruckeri* bacterin. Developmental and comparative Immunology, supplement. **2**, 197-204.
- ANDERSON, D.P., ROSS, A.J., 1972. Comparative Study of Hagerman Redmouth Disease Oral Bacterins. The Progressive Fish-Culturist **34**, 4, 226-228.
- ANTIPA, R., AMEND, D. F., 1977. Immunization of Pacific salmon: comparison of intraperitoneal injection and hyperosmotic infiltration of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* bacterins. J. Fish. Res. Board Can. **34**, 203-208.
- ARAKAWA, C.K., FRYER, J. L., SANDERS, J. E., 1986. Serology of *Mycobacterium chelonae* isolated from salmonid fish. Journal of Fish Diseases, **9**, 269-271.
- ARDA, M. 1974. Balıklarda Bakteriyel, Mantar, Viral ve Ekolojik Nedenlerden İleri Gelen Hastalıklar ve Tedavileri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları : 300. Ankara Üniversitesi Basımevi, ANKARA. 259s.
- ARDA, M. 1985a. Genel Bakterioloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları no. 402, Ankara Üniversitesi Basımevi, ANKARA. 531s.
- ARDA, M. 1985b. İmmunoloji (Bağışıklık Bilmi). Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayın ANKARA.no:404.305s.
- ARDA, M. 1994a. Bağışıklık (immunité). İmmunoloji. (NİDA, M. MİNBAI, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., eds). Neslihan Yayınevi. ANKARA. 9-18s.
- ARDA, M. 1994b. Bağışıklığı Etkileyen Faktörler. İmmunoloji. (NİDA, M. MİNBAI, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., eds). Neslihan Yayınevi. ANKARA. 19-24s.
- ARDA, M. 1994c. Mikroorganizmalarda Antijenik Substratlar. İmmunoloji. (NİDA, M. MİNBAI, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., eds). Neslihan Yayınevi. ANKARA. 39-46s.
- ARDA, M. 1994d. Antikorlar (İmmunoglobulinler). İmmunoloji. (NİDA, M. MİNBAI, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., eds). Neslihan Yayınevi. ANKARA. 47-52s.
- ARDA, M. 1994e. İmmunoglobulin Sınıfları, Alt sınıfları ve Özellikleri. İmmunoloji. (NİDA, M. MİNBAI, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., eds). Neslihan Yayınevi. ANKARA. 53-60s.
- ARDA, M. 1994f. Birincil ve İkincil Yanıtlarda Antikor Sentezi. İmmunoloji. (NİDA, M. MİNBAI, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., eds). Neslihan Yayınevi. ANKARA. 67-72s.
- ARDA, M. 1994g. İmmun Sistemin Hücreleri. İmmunoloji (NİDA, M. MİNBAI, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., eds). Neslihan Yayınevi. ANKARA. 127-146s.
- ARKOOSH, M.R., KAATTARI, S.L., 1993. Quantitation of Fish Antibody to a Specific Antigen by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: Techniques in Fish Immunology. (STOKEN, J.S., FLETCHER, T.C., ANDERSON, D.P.,

- ROBERSON, B.S., Van MUISWINKEI, W.B., eds.). SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303 USA, 15-24.
- ARNESEN, J. A., BJORNODOTTIR, R., JORGENSEN, T. D., EGGSET, G., 1993. Immunological responses in Atlantic salmon, *Salmo solar* L., against purified serine proteases and haemolysins from *Aeromonas salmonicida*. Journal of Fish Diseases, 16, 409-423.
- ASHBURNER, L.D., 1989. Clinical Examination of Diseased Fish. In: Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish. (AUSTIN, B. And AUSTIN, D.A., eds.) Edingburg, Scotland. 40-55.
- ATAY, D., 1980. Alabalık Üretim Tekniği. Başbakanlık Basımevi, Ankara, 171s.
- AUSTIN, B., 1988. Identification. In: Methods in Aquatic Bacteriology, (AUSTIN, B., ed.) John Wiley & Sons, Cichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 95-112.
- AUSTIN, B., AUSTIN, D.A., 1993. Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish. Second Edition. Ellis Norwood Ltd., New York, London, 381p.
- AUSTIN, B., BISHOP, I., GRAY, C., 1986. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and frunculosis in fish farms. Journal of Fish Diseases, 9, 469-474.
- AUSTIN, B., BUCKE, D., FEIST, S., RAYMENT, J., 1985. A false positive reaction in the indirect fluorescent antibody test for *Renibacterium salmoninarum* with a "Coryneform" organism. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol, 5(1), 8-9
- AVTALION, R. R., 1969. Temperature effect on antibody production and immunological memory, in carp (*Cyprinus carpio*) immunizeal against bovine serum albumin (BSA). Immunology, 17, 927-931.
- AVTALION, R.R., 1981. Environmental control of the immune response in fish. CRC Critical Reviews in Environmental control, volume II, Isave 2, 163-188
- AVTALION, R. R., WISHKOVSKY, A., 1987. Moduiatory effects of ambient temperature and antigen dose on the induction of specific toleranse to different protein antigens in carp (*Cyprinus carpio*). Developmental and Comparative immunology, Alan R Liss, Inc. 43-51.
- AYDIN, N., 1994a. Aşilar, Aşılamların Genel Prensipleri ve Immunoterapi. İmmunoloji. (NİDA, M. MİN BAY, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., eds). Neslihan Yayınevi ANKARA. 273-290.
- AYDIN, N., 1994b. Immunostimulasyon ve Immunostimulantlar. İmmunoloji (NİDA, M. MİN BAY, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., eds). Neslihan Yayınevi. ANKARA. 291-294.
- AYDIN, N., 1994c. Adjuvantlar. İmmunoloji (NİDA, M. MİN BAY, A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., eds). Neslihan Yayınevi. ANKARA. 305-312.
- BARAN, İ., TİMUR, M., 1985. Balık Yetiştiriciliğinin Temel Prensipleri. Akdeniz Üniv. Isparta Müh. Fak. Eğirdir Su Ürünleri Y.O. Ders Kitabı. Yayın No. 6. Isparta. 126s.
- BARAN, İ., TİMUR, M., AYDIN, N., İSTANBULLUOĞLU, E., AYDINTUĞ, M.K., 1980. Çifteler-Sakaryabaşı Balık Üretim ve Araştırma İstasyonunda Alabalıklarda (*Salmo gairdneri irideus*) Görülen Bakteriel Hemorajik Septisemi Hastalığı Üzerinde İncelemeler. A.Ü. Veteriner Fak. Derg. Cilt XXVII No 3-4. A.Ü. Basımevi, ANKARA.

- BARTON, R.N., WRATHMELL, A.B., HARRIS, J. E., JENKINS, P.G., DOGGETT, T.A., 1989. Systemic and Secretory Immun Responses of Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to *Yersinia ruckeri*. Disease of Fish and Shellfish, IV. EAAP International Conference, September 24-28, Spain. Book of Abstract, 67.
- BAYRAKTAR, R., BAYRAKTAR, L., DAĞISTAN, M., DEMİRALAY, O., 1995. ELISA Tekniğinde Kullanılacak Reagentlerin Hazırlanması. Etlik Yet. Mikrob. Derg, 8(1), 238-253.
- BERNETH, E. M., 1990. Screening for the fish disease agent *Aeromonas salmonicida* with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Journal of Aquatic Animal Health, 2, 99-103.
- BERNETH, E. M., BÖHM, K. H., 1988. Serological comparison between isolated strains of *Aeromonas salmonicida* by agglutination and enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA). J. Vet. Med. B. 35, 637-647.
- BİLGEHAN, H. 1993. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilmi. Barış Yayınları, Fakülteler kitapevi. İZMİR.587s.
- BLANC, M., BANERESCU, P., GAUDET, J.L., HUREAU, J.L. 1971.European Inland Water Fish A Multilingual Catalogue, Fishing News (Book) Ltd. LONDON.
- BLAZER, V.S., WOLKE, R.E., 1984a. Effect of diet on the immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 41, 1244-1247.
- BLAZER, V.S., WOLKE, R.E., 1984b. The effects of manginal deficiencies of ascorbic acid and alpha-tocopherol on the natural resistance and immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).Dissertation Abstracts international, B, 44 (8), 2376-2377.
- BLY, E. 1984. The Ontogeny of Immunity in Teleost Fishes with Particular Reference to Foeto-maternal Relationships. The British Library Document Supply Center Boston Spa. Wetterby. West Yorkshire United Kingdom. Doctoral Theses 235p.
- BOGWALD, J., STENOVAG, K., HOFFMAN, J., JORGENSEN, T., 1991. Antibody specificities in Atlantic salmon, *Salmo solar* L., against the fish pathogens *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. Journal of Fish Diseases, 14, 79-87.
- BOSSE, M.P., POST, G., 1983. Tribissen and tiamulin for control of enteric redmouth disease. Journal of Fish Diseases, 6, 27-32.
- BOULO, V., MIALHE, E., ROGIER, H., PAOLUCCI, F., GRIZEL, H. 1989. Immunodiagnosis of *Bonamia astreae* (*Ascetospora*) infection of *Astrea edulis* and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. Journal of Fish Diseases, 12, 257-262.
- BRAGG, R.R., HENTON, M.M., 1986. Isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout in South Africa. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 6,(1), 5-6.
- BÜCHMANN,K., OSTERGAARD, L., GLAMANN,J.,1992.Affinity purification of antigen-specific serum immunoglobulin from the European Eel (*Anguilla anguilla*).Scand. J. Immunol. 36, 89-97
- BUCHMANN, K., PEDERSEN,K. 1994. A study on teleost phlogeny using specific antisera. Journal of Fish Biology, 45, 901-903.
- BULLOCK, A.M., 1989. Laboratory Methods.In: Fish Patalogy (ROBERTS, R.S. ed) Second Edition. Bailliere Tindall, LONDON. 374-407.
- BULLOCK, G.L., 1966. Precipitin and agglutinin reactions of *Aeromonas* isolated form fish and other sources. Bull. Off. İnt. Epiz. , 65 (5-6), 805-824.
- BULLOCK, G.L., 1989. Enteric Redmouth Disease. Fish Health Bulletin 4. Department of the Interior U.S. Fish and Wildlife Service. 3.

- BULLOCK, G.L., ANDERSON, D.P., 1984. Immunization Against *Yersinia ruckeri*, Cause and Enteric Redmouth Disease.(Symposium on Fish Vaccination. Theoretical Background and Practical Results on Immunization Against Infectious Diseases). 20-22 February, O.T.E. 151-166 pp., PARIS.
- BULLOCK, G.L., CIPRIANO, R.C., 1990. Enteric Redmouth Disease in Salmonids. United States Department of the Interior Fish and Wild Life service, Fish Disease Leaflet 67, 4p.
- BULLOCK, G.L., CONROY, D. A., SNIESKO, S. F., 1971. Bacterial Disease of Fishes. Redmouth and Other Diseases Caused by Enteric Bacteria. Diseases of Fishes.(SNIEZKO, S. F., AXELROD, H.R., eds.). 51-54.
- BULLOCK, G.L., MAESTRONE, G., STARLIPER, C., SCHILL, B., 1983. Potentiated Sulfanomide Therapy of Enteric Redmouth Disease of Salmonids. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service. Fish Disease Leaflet 82, 7p.
- BULLOCK, G.L., SHOTTS, E.B., STARLIPER, C., 1981. Biochemical, Serological and Virulence Studies With *Yersinia ruckeri*, Proceeding of the Joint Meeting of the Fifth Annual Fish Health Section/AFS and the Sixth Annual Eastern Fish Health Workshop. July 21-23, Mississippi State University. 5, Mississippi 53-54.
- BULLOCK, G. L., STUCKEY, H. M., SHOTTS, E. B., (1977) Early records of North American and Australian outbreaks of enteric redmouth bacterium. Fish Health. News, 6,(2), 96-97
- BULLOCK, G. L., STUCKEY, H. M., SHOTTS, E. B., 1978. Enteric redmouth bacterium comparison of isolates from different geographical areas. J. Fish Disease, 1, 351-354.
- BUSCH, R.A., 1981. The Current Status of Diagnostic Serology for the Major Bacterial Diseases of Fishes. International Symposium on Fish Biologics. Serodiagnostics and Vaccines. Develop Biol. Standart. 49, 85-96. Wa. USA.
- BUSCH, R.A., 1982. Enteric Redmouth Disease. Symposium International de Talloires . 10-12 May., 1982, Les Antigenes des Micro-organismes pathogenes des Poissons. Collection Fondation Marcel Merieux. 201-224.
- BUSCH, R. A., LINGG, A. J., 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*salmo gairneri*). J. Fish. Res. Board can, 32(12), 2429-2432.
- CESCHIA, G., GIORGETTI, G., BERTOLDINI, G., FONTEBASSO, S., 1987. The *In vitro* sensitivity of *Yersinia ruckeri* to specific antibodies. Journal of Fish Diseases, 10. 65-67.
- CHART, H., PEARSON, T. W., TRUST, T. J., 1984. Detection of specific fish antibody using and inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (inhibition Elisa). Journal of immunobgical methods, 68, 19-24.
- CIPRIANO, R. C., PYLE, J. B., 1985. Development of a culture medium for determination of sorbitol utilization among strains of *Yersinia ruckeri*. Microbiss Letters, 28, 79-82
- CIPRIANO, R.C., RUPPENTHAL, T., 1987. Immunization of salmonids against *Yersinia ruckeri* : significiance of humoral immunity and cross protection between serotypes. Journal of Wildlife Diseases, 23(4), 545-550.
- CIPRIANO, R. C., RUPPENTHAL, T., SCHILL, W. B., PYLE, S. W., SHOTTS, E. B., 1987. Sysceptibility of brook. Tout (*Salvelinus fontinalis*) to experimental

- infections with different serotypes of *Yersinia ruckeri*. *microbios Letters*, **35**, 27-31.
- CIPRIANO, R. C., SCHILL, W. B., PYLE, S. W., HORNER, R., 1986. An epizootic in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by a sorbitol-positive serovar 2 strain of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Wildlife Diseases*, **22**(4), 488-492.
- COLLINS, C.H., LYNE, P.M. 1976. *Microbiological Methods*; Butterworths, London-Boston. 512p.
- COSSARINI-DUNIER, M., 1985. Indirect linked immunosorbent assay (ELISA) to titrate rainbow trout serum antibodies against two pathogens: *Yersinia ruckeri* and Egtved virus. *Aquaculture* **49**, 181-187.
- COSSARINI-DUNIER, M., 1986a. Protection against enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after vaccination with *Yersinia ruckeri* Bacterin. *Journal of Fish Diseases*, **9**, 27-33.
- COSSARINI-DUNIER, M., 1986b. Secondary response of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to DNP-haemocyanin and *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, **52**, 81-86.
- CULLING, C.F.A., 1963. *Handbook of Histopathological Techniques*. Second edition, Butterworths. 553 p.
- ÇAĞIRGAN, H., YÜREKLİTÜRK, O., 1991. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout farm in Turkey. In: The Fifth Conference of EAAP, Disease of Fish and Shellfish. 24-29 August 1991, Book of Abstract, 131.
- ÇELİKKALE, M.S. 1988. İç Su Balıkları ve Yetiştiriciliği, Karadeniz Tek. Üniv. Sürmene Deniz Bil. Ve Tekn. Yüksek okulu. Genel Yayın No: 124, Fak. Yay. No:2, Cilt I, Karadeniz Tek. Üniv. Bas. TRABZON 419s.
- ÇETİN, E.T., 1965. *Pratik Mikrobiyoloji*. İ.Ü. Tıp Fakültesi İstanbul.
- DALSGAARD, I., FROM, J., HORLYCK, V., 1984. First observation of *Yersinia ruckeri* in Denmark. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **4**, 1, 10.
- DAVIES, R.L., 1991a. Clonal analysis of *Yersinia ruckeri* based on biotypes, serotypes and outer membrane protein-types. *Journal of Fish Diseases*, **14**, 221-228.
- DAVIES, R. L., 1991b. *Yersinia ruckeri* produces four iron-regulated outer membrane proteins but does not produce detectable siderophores. *Journal of Fish Diseases*, **14**, 563-570.
- DAVIES, R.L., FRERICHS, G.N., 1989. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *Journal of Fish Diseases*, **12**, 357-365.
- DEAR, G., 1988. *Yersinia ruckeri* isolated from Atlantic salmon in Scotland. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **8**(2), 18-20.
- DEC, C., ANGELIDIS, P., LAURENCIN; F. B., 1990. Effects of oral vaccination against vibriosis in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Journal and sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **13**, 369-376
- DE GROOT, J., DIXON, P.F., 1989. The Development of Immunoassay to Detect Fish Antibodies Directed Against *Yersinia ruckeri*, *Renibacterium salmoninarum* and Infectious Pancreatic Necrosis Virus. IV. EAAP International Conference, Diseases of Fish and Shellfish, 24-28 September, Book of Abstract, 14, SPAIN
- DE KINKELIN, P., MICHEL, C., GHITTINO, P., 1985. *Precis De Pathologie Des Poissons*, INGRA-OIE, Paris, 248p.

- DE LA CRUZ, J.A., RODRIGUEZ, A., TEJEDER, C., DE LUCAS, E., OROLCO, L.R., 1986. Isolation and identification of *Yersinia ruckeri*, causal agent of enteric redmouth disease (ERM) for the first time in Spain. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 6(2), 43-44.
- DIXON, P.F., 1985. Rapid Detection and Identification of Fish Pathogens by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: Fish and Shellfish Pathology. (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press, London, 11-16.
- DIXON, P.F., 1987. Comparison of serological techniques for the identification of *Renibacterium salmoninarum*. J. Appl. Ichthyol. 3, 131-138.
- DİLER, Ö., KUBİLAY, A. 1996. Gökkuşluğu Alabalıklarında Yüksek Mortaliteye Neden olan Hemorajik Septisemi Etkeni *Pseudomonas* sp. Üzerinde Bir Çalışma. İ.Ü. II. International Symposium On Aquatic Products. September. Abstracts. İstanbul. 95.
- DOMINGUEZ, J., BOBIN, M., SANCHEZ, C., HEDRICK, R. P., 1991. Rapid serotyping of infectious pancreatic necrosis virus by one-step enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. Journal of Virological methods, 31, 93-104.
- ELLIS, A.E., 1978. The Immunology of Teleosts. In: Fish Pathology. (ROBERTS, R.J. ed.) Bailliere Tindall a division of Cassell Ltd. 93-104.
- ELLIS, A.E., 1988a. General Principles of Fish Vaccination. In: Fish Vaccination, (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press Ltd. London 1-19.
- ELLIS, A.E., 1988b. Ontogeny of the Immune System in Teleost Fish. In: Fish Vaccination, (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press Ltd. London 20-32.
- ELLIS, A.E., 1988c. Optimizing Factors for Fish Vaccination In: Fish Vaccination, (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press Ltd. London 32-46.
- ELLIS, A.E., 1988d. Vaccination Against Enteric Redmouth. In: Fish Vaccination, (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press Ltd. London 85-92.
- ELLIS, A.E. 1989. The Immunology of Teleosts. Fish Pathology. (ELLIS, A.E., ROBERTS, R.J., TYTLER, P. eds.). Second Edition. London. Bailliere Tindall, 135-153.
- ELLIS, A.E., BURROWS, A.S., HASTINGS, T.S., STAPLETON, K.J., 1988. Identification of *Aeromonas salmonicida* extracellular protease as a protective antigen against furunculosis by passive immunization. Aquaculture, 70, 207-218.
- ELLIS, A.E., ROBERTS, R.J., TYTLER, P. 1989. The Anatomy and Physiology of Teleost. In: Fish Pathology. (ELLIS, A.E., ROBERTS, R.J., TYTLER, P. eds.). Second Edition. Bailliere Tindall, London. 13-56.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P., 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. The Journal of Immunology, 109, 129-135.
- ERDAL, J.I., 1989. Vaccination of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Against Different Serovars of *Yersinia ruckeri*. Disease of Fish and Shellfish, IV. EAFP International Conference, September 24-28, Spain. Book of Abstract, 78.
- ERGÜVEN, H., SOYLU, E., 1988. Marmara bölgesinde gökkuşluğu alması (*Salmo gairdneri* R., 1836) yetiştiriciliği yapan üç işletmede görülen bakteriyel solungaç hastalığı. Su Ürünleri Dergisi, 2, 2:85-93.
- ESENDAL, Ö.M. 1994. Tavuklarda *Mycoplasma Gallisepticum*'a karşı oluşan antikorların çeşitli serolojik yöntemlerle (SPA, HI, AGP, ELISA) saptanması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 41 (1) 18-47.

- ESPELID, S., HOLM, K.O., HJELMELAND, K., JORGENSEN, T., 1988. Monoclonal antibodies in the indirect fluorescent antibody against *Vibrio salmonicida*: The causative agent of cold water vibriosis ('Hitra Disease') in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., Journal of Fish Diseases, **11**, 207-214.
- ESPELID, S., RODSETH, D. M., JORGENSEN, T. O., 1991. Vaccination experiments and studies of the humoral immune responses in cod, *Gadus morhua* L., to four strains of monoclonal-defined *Vibrio anguillarum*. Journal of Fish Diseases, **14**, 185-197
- ESTEVEZ, J., LEIRO, J., SANMARTIN, M. L., ULSEIRA, F. M., 1993. Isolation and partial characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins. Comp. Biochem. Physiol., **105 A**, 275-281
- EURELL, T. E., LEWIS, D. H., GRUMBLES, L. C., 1979. Stained bacterial antigens for use in microagglutination procedures. The Progressive Fish Culturist, **41**, (2), 55-57.
- EWING, W. H., ROSS, A. J., BRENNER, D. J., FANNING, G. R., 1978. *Yersinia ruckeri* sp. Nov., the redmouth (RM) Bacterium int. J. Syst. Bacteriol, **28**, 37-44.
- FUJIHARA, M. P., NAKATANI, R. E., 1971. Antibody production and immune responses of rainbow trout and coho salmon to *Chondrococcus columnaris*. J. Fish. Res. Bd. Canada, **28**, 1253-1258.
- FRERICHS, G. ., HOLLIMAN,A., 1991. Isolation of a brown pigment-producing strain of *Pseudomonas fluorescens* cross-reacting with *Aeromonas salmonicida* diagnostic antisera. Journal of Fish Diseases, **14**, 599-601.
- FRERICHS, G.N., ROBERTS, R.J., 1989. The Bacteriology of Teleosts.In: Fish Patalogy(ROBERTS, R.J. ed.) Second Edition. Bailliere Tindall,London 289-320.
- FRERICHS, G. N., STEWART, J. A., COLLINS, R. O., 1985. Atypical infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with *Yersinia ruckeri*. Journal of Fish Diseases, **8**, 383-387.
- FUDA, H., HARA, A., YAMAZAKI, F., KOBAYASKI, K., 1992. A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Developmental and comparative immunology. **16**, 415-423.
- FUDA, H., SOYANO, K., YAMAZAKI, F., HANA, A., 1991. Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). Comp. Biochem. Physiol., **99A**, 637-643.
- FUHRMAN, N., BÖHM, K. H., SCHLOTFELDT, H. J. (1983) An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany. J. Fish Dis, **6**, 309-311.
- GALL, G. ,CRANDEL, P.A.,1992. The Rainbow Trout. Aquaculture **100**, 1-10.
- GALL, G.A.E., DE GROOT, S.J., 1990. Taxonomic names for northern Pacific trout species editorial, **86**,1.
- GIORGEITTI, G., CESCHIA, G., BOVO, G., 1985. First Isolation of *Yersinia ruckeri* in Farmed Rainbow Trout in Italy. In:Fish and Shellfish Pathology. (ELLIS, A.E., ed.). Academic Press,London,161-166.
- GRAWINSKI, E., 1990. Occurrence of redmouth disease in rainbow trout in Poland. Medycyna weterynaryjna, **46**:(6), 183-185.
- GRAYSON, T. H., WILLIAMS, R. J., WRATHMELL, A. B., MUNN, C. B., HARRIS. J. E., 1987. Effects of imunopotentiating agents on the immune response of rainbow trout, salmo gairneri Richardson, to ERM vaccine.J. Fish Biol., **31** (Supplement A), 195-202.

- GUDMUNSDOTTIR, S., BENEDIKTSDOTTI, E., HELGASON, S., 1993. Detection of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid kidney samples: a comparison of results using double sandwich ELISA and isolation on selective medium. *Journal of Fish Diseases*, **16**, 185-195.
- GÜLMEZOĞLU, E. 1975. Bağışıklığın Temelleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. ANKARA. 176s.
- HAMILTON, A.J., CANNIG E.U. 1988. The production of mouse anti-Myxosoma cerapralis antiserum from percoll-purified spores and its use in immunofluorescent labelling of Historesin-embedded cartilage derived from infected rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Disease*, **11**, 185-190.
- HAMILTON, A. J., FALSON, M. J. M., ALEXANDER, J., CANNING, E. U., 1986. A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring antibody production during experimental *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Developmental and Comparative Immunology*, **10**, 443-448
- HANNA, P.J., ALTMANN, K., CHEN, D., SMITH, A., COSIC, S., MOON, P., HAMMOND, L.S., 1991. Development of monoclonal antibodies for the rapid identification of epizootic *Vibrio* species. *Journal of Fish Diseases*, **15**, 63-69.
- HARDIE, L. J., FLETCHER, T. C., SECOMBES, C. J., 1990. The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Aquaculture*, **87**, 1-13.
- HARDIE, L. J., FLETCHER T. C., SECOMBES, C. J., 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - *Aquaculture*, **95**, 201-214.
- HARREL, L.W., ETLINGER, H.M., HODGINS, H.O., 1975. Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. I. serum antibody protection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis. *Aquaculture*, **6**, 211-219.
- HASTING, T. S., ELLIS, A. E., 1988. The humoral immune response of rainbow trout, *Salmo gairneri* Richardson, and rabbits to *Aeromonas salmonicida* extracellular products. *Journal of Fish Diseases*, **11**, 147-160.
- HAWARSTEIN, L. S., ENDRESEN, C., HJELTNES, B., CHRISTIE, K. E., GLETTE, J., 1990. Specific immunoglobulins in serum from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., immunized with *Vibrio salmonicida* and infectious pancreatic necrosis. *Journal of Fish Diseases*, **13**, 101-111.
- HENKEN, A.M., TIGCHELAAR, A.J., MUISWINKER, W.B.V., 1987. Effects of feeding level on antibody production in African Catfish, *Clarias gariepinus* Burchell, after injection of *Yersinia ruckeri* O. *Antigen*. *Journal of Fish Diseases*, **11**, 85-88.
- HIBIYA, T., 1982. An Atlas of Fish Histology Normal and pathological Features. Kodansha Ltd. Tokyo. 143pp.
- HJELTNES, B., ANDERSEN, K., ELLINGSEN, H-M., 1989. Vaccination against *Vibrio salmonicida* the effect of different routes of administration and of revaccination. *Aquaculture*, **83**, 1-6
- HSU, H-M., BOWSER P.R., SCHACHTE, J.H., 1991. Development and evaluation of a monoclonal antibody- based enzyme-linked immuno-sorbent assay for the diagnosis of *Renibacterium salmoninarum* infection. *Journal of Aquatic Animal Health*, **3**, 168-175.

- HUNTER, V. A., 1980. Stress-Induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson, Journal of Fish Diseases, **3**, 467-472
- HYATT, A. D., EATON, B. T., HENGSTBERGER, S. RUSSEL, G., 1991. Epizootic haematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immunohistochemistry and immunoelectron microscopy. Journal of Fish Diseases, **14**, 605-617
- INGRAM, G.A., 1993. Diffusion in Gel Techniques. In: Techniques in Fish Immunology. (STOKEN, J.S., FLETCHER, T.C., ANDERSON, D.P., ROBERSON, B.S., Van MUISWINKEL, W.B., eds.). SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303 USA, 45-56.
- INGRAM, G. A., ALEXANDER, J. B., 1977. The primary immune response of brown trout (*Salmo trutta*) to injection with cellular antigens. J. Fish Biol., **10**, 63-72.
- ISRAELSSON, O., PETERSSON, A., BENGTEEN, E., WIERSMA, E. J., ANDERSON, J., GEZELLIUS, Q., PILSTRÖM, L., 1991. Immunoglobulin concentration in atlantic cad, *gadus morhua* L., serum and cross-reactivity between anti-cad-antibodies and immunoglobulins from other species. Journal of Fish Biology, **39**, 265-278
- İLTER, Ö., 1975. İmmunoglobuliner, İmmunoloji (II.Ulusal İmmunoloji Kongresi).İstanbul. 45-65s.
- İZGÜR, M., 1994. Antijen Antikor Reaksiyonları. ARDA, M., MİNBAŞ A., AYDIN, N., AKAY, Ö., İZGÜR, M., DİKER, S., İmmunoloji. Medisan Yayınevi. Ankara. 353-388s.
- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., 1996. İmmuno Biology .The İmmun System İn Healt and Disease .Second Edition ,Current Biology Ltd. Gorland Publishing İnc. New York and London.
- JANSSON, E., HANGSLO, T., LINDBERG, R., LJUNBERG, O., SVENSSON, B.M., 1991. Detection of *Renibacterium salmoninarum* and *Yersinia ruckeri* by the peroxidase-antiperoxidase immunohistochemical technique in melanin containing cells of fish tissues. Journal of Fish Diseases, **14**, 689-692.
- JANSSON, E., SVENSSON, B.M., LINDBERG, O., LJUNBERG 1989. An Immunochemical Method for Detection of *Renibacterium salmoninarum* and *Yersinia ruckeri* in Clinically Infected Rainbow Trout. Disease of Fish and Shellfish, IV. EAFF International Conference, September 24-28, Spain. Book of Abstract, 179.
- JENCIC, V., BROEZ, I., VIDMAR, M. 1991, Enteric redmouth disease in Solevenia. İn: The Fifth Conference of EAFF, Diseases of Fish and Shellfish 25-29. August 1991, Book of Abstracts, 167.
- JOHNSON, K.A: and AMEND, D.F., 1983a. Comparison of efficacy of several delivery methods using *Yersinia ruckeri* bacterin on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases, **6**, 331-336.
- JOHNSON, K. A., AMEND, D. F., 1983b. Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bakterins applied by oral and anal intubation of salmonids. Journal of Fish Diseases, **6**, 473-476
- JOHNSON, K.A., FLYNN, J.K. and AMEND, D.F., 1982a. Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bakterins. Journal of Fish Diseases, **5**, 197-205.

- JOHNSON, K.A., FLYNN, J.K., AMEND, D.F., 1982b. Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bakterins. Journal of Fish Diseases, 5, 207-213.
- JOHNSON, G. R., WOBESER, G., ROUSE, B. T., 1974. Indirect fluorescent antibody technique for detection RM bakterium of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Board can., 31, 1957-1959.
- KHVOINEW,A.,1988.Serological study of *Yersinia ruckeri* isolated from the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Veterinarna-Sbirka.86:7,42-43.
- KIMURA, T., EZURA, Y., TAJIMA, K., YOSHIMIZU, M., 1978. Serological diagnosis of bacterial kidney disease of salmonid (BKD): immunodiffusion test by heat stable antigen extracted from infected kidney. Fish Pathology, 13(2), 103-108.
- KITAO, T., YOSHIDA, T., ANDERSON, D. P., DIXON, O. W., BLANCH, A., 1987. Immunostimulation of antibody - producing cells and humoral antibody to fish bakterins by a biological response modifier. J. Fish Biol., 31.(Supplement A), 87-91.
- KRANTZ, G. E., HEIST, C.E., 1970. Prevalence of naturally acquired agglutinating antibodies against *Aeromonas salmonicida* in hatchery trout in central Pennsylvania. J. Fish. Res. Bd. Canada, 27, 969-973.
- KRANTZ, G.E., REDDECLIFF, J. M., HEIST, C. E., 1963. Development of antibodies against *Aeromonas salmonicida* in trout. J. Immunol 91,757-760.
- LANDOLT, M. L., 1989. The relationship between diet and the immune response of fish. Aquaculture, 79, 193-206.
- LARSEN, J. L., 1988. A successful vaccination trial with a trivalent vaccine. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 8 (4), 82-84
- LAUDAN, R., STOLEN, J. S., CALI, A., 1987. The immunomodulating effect of the microsporidooan *Glugea stephani* on the humoral response and immunoglobulin levels in winterflounder, *Pseudopleuronectes americanus*. J. Fish Biol., 81 (Supplement A), 155-160.
- LEE, E. G-H, GORDON, M. R., 1987. Immunofluorescence screening of *Renibacterium salmoninarum* in the tissues and eggs of farmed chinook salmon spawners. Aquaculture, 65, 7-14.
- LEIRO, J., ESTEVEZ, J., SANTAMARINA, M. T., SANMARTIN, M. L., UBEIRA, F. M., 1993. Humoral immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), to antigens from *Tetramicra breviviflum* matthewes & matthewes, 1980 (mikrospora). Journal of Fish Diseases, 16, 577-584.
- LESEL,R.,LESEL,M.,GAVINI,F.,VUÏLLAUME,A.,1983. Outbreak of enteric red mouth disease in rainbow trout ,*Salmo gairdneri* Richardson,in France.Bull.Eur.Ass.Fish Pathol.,6,385-387.
- LILLEHAUG, A., 1991. Vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)against cold. water vibriosis- duration of protection and effect on growth rate. Aquaculture, 92, 99-107.
- LILLEHAUG, A., 1989. Oral immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson,against vibriosisi with vaccines protected against digestive degradation.Journal of Fish Disease,12,579-584.
- LLEWLLYN,L.C.1980. A bacterium with similarities to the red mouth bacterium and *Serratia liquefaciens* causing mortalities in hatchery reared salmonids in Australia.J.Fish Dis3,1,29-39.

- LUND, V., JORGENSEN, T., HOLM, K. O., EGGSET, G., 1991. Humoral immune response in atlantic salmon, *Salmo solar* L., to cellular and extracellular antigens of *Aeromonas salmonicida*. Journal of Fish Diseases, **14**, 443-452
- MANANOS, E., NUNEZ, J., ZANUY, S., CARRILLO, M., LE MENN, F., 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II-validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Comp. Biochem. Physiol, **107** B, 217-223
- MANFREDI, E.T. 1986. Immunodiagnostic Methods for the Detection of Bacterial Kidney Disease in Salmonid Fishes. Doctor of Philosophy, University of Washington 183p.
- MANNING, M.J., MUGHAL, M.S. Factors Affecting the Immune Responses of Immature Fish. In: Fish and Shellfish Pathology. (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press, London 27-37.
- MARKIW, M.E., WOLF, K., 1978. *Myxosoma cerebralis* : Fluorescent antibody techniques for antigen recognition. J. Fish. Res. Board can, **35**, 828-832.
- McCORMICK, J.I, McLOUGHLIN, M.F., 1993. The characterization and pathogenicity of the first isolate of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Onchorynchus mykiss* Walbaum) in Northern Ireland. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. **13**(4), 138-140.
- MEYERS, T. R., SHORT, S. FARRINGTON, C., LIPSON, K., GEIGER, H. J., GATES, R., 1993a. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the fluorescent antibody test (FAT) for measuring the prevalences and levels of *Renibacterium salmoninarum* in wild and hatchery stocks of salmonid fishes in Alaska, USA. Dis. Aquat. Org., **16**, 181-189
- MEYERS, T. R., SHORT, S., FARRINGTON, C., LIPSON, K., GEIGER, H. J., GATES., 1993b. Establishment of a negative-positive threshold optical density value for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect soluble antigen of *Renibacterium salmoninarum* in Alaskan Pacific salmon. Dis. aquat. Org., **16**, 191-197
- MICHEL, C., DORSON, M., FAIVRE, B., 1991. Opsonizing activity of anti- *Aeromonas salmonicida* antibodies after inactivation of complement in rainbow trout. Ann. Rech. Vet., **22**, 51-58.
- MİNBAŞ, A., 1988. İmmunoloji Ders Notları. U. Üniv. Vet. Fak. Yay. Bursa. 131s.
- MOR, A., AVTALION, R. R., 1990. Transfer of antibody activity from immunized mother to embryo in tilapias. Journal of Fish Biology, **37**, 249-255
- MÖCK, A., PETERS, G., 1989. Lysozyme Activity in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson) Stressed by Handling and Transport. IV. EAAP International Conference, Diseases of Fish and Shellfish, 24-28 September, Book of Abstract, SPAIN.2.
- MUGHAL, M.S., MANNING, M.J., 1986. The immune system of juvenile thick-lipped grey mullet, *Chelon labrasus risso* : Antibody responses to soluble protein antigens. J. Fish Biol., **29**, 177-186.
- MÜFTÜOĞLU, E., BOLAMAN, Z., BİLGİN, O., ERTOP, Ş., 1993. İmmunoloji. Saray Medikal Yayıncılık, Bornova-İZMİR. 408s.
- NAGAE, M., FUDA, H., HARA, A., KAWAMURA, H., YAMAUCHI, K., 1993. Changes in serum immunoglobulin M (IgM) Concentrations early development of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) Aquaculture determined by sensitive ELISA technique. Camp. Biochem. Physiol., **106** A, 69- 74.
- NAGAE, M., FUDA, H., UNA, K., KAWAMURA, H., ADACHI, S. HARA, A., YAMAUCHI, K., 1994. The effect of cortisol administration on blood plasma

- immunoglobulin M(IgM) concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **13**, 41-48.
- NAGAE, M., FUDA, H., HARA, A., SANEYOSHI, M., YAMAUCHI, K., 1994. Changes in serum concentrations of immunoglobulin M(IgM), cortisol and thyroxine (T₄) during smoltification in the masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Fisheries Science*, **60**(2), 241-242.
- NAKAMURA, R.M., VOLLER, A., BIDWELL, D.E., 1986. Enzyme immuno assays. heterogenous and homogenous systems. In: *Immunochemistry*. Vol 1. (WEIR, D.M., ed.). Blackwell Scientific Publications. Chapter 27. Oxford, London. 1-20.
- NAVARRE, O., HALVER, J. E., 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, **79**, 207-221.
- OLEA, I., BRUNO, D. W., HASTINGS., 1993. Detection of *Renibacterium salmoninarum* in naturally infected atlantic salmon, *Salmo solar* L., enzyme-linked immunosorbent assay. *Aquaculture*, **116**, 99- 110
- OLESEN, N.J., 1991. Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterins by ELISA and passive immunization. *J. Appl. Ichthyol.*, **7**, 36-43.
- OLESEN, N.J., LORENZEN, N., JORGENSEN, P.E.V. 1991. Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50%PNT). *Dis Aquat. Org.* ,**10**, 31-38.
- OUCHTERLONY, Ö., NILSSON, L.A., 1986. Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. In: *Immunochemistry*. Vol 1. (WEIR, D.M., ed.). Blackwell Scientific Publications. Chapter 32. Oxford, London 1-50.
- ÖZCEL, M.A., 1978. Immunofluoresans ve Parazitolojide Uygulanması. Ege Üniv. Tıp. Fak. Yayınları No: 108. Ege Üniv. Matbaası. Bornova İZMİR. 106s.
- ÖZENSOY, S., 1996. Leishmaniasis'de Rezervuar Araştırmaları ve Kullanılan Serolojik Yöntemlerin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ege Üniv. Sağ. Bili Enst. Parazitoloji Programı. İZMİR.
- PASCHO, R, J., MULCAHY, D., 1987. Enzyme-linked immunosorbent assay for a soluble antigen of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of salmonid bacterial kidney disease. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**, 183-191
- PELCZAR, M.I., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R., 1986. *Microbiology*. Bound in Singapore by Forg and Sons Printers Pte. Ltd. 918p.
- PLUMB, A.J., BOWSER, R.P., 1983. *Microbial Fish Disease Laboratory Manual*. Brown Printing Company, Montgomery, Alabama. 95p.
- PLUMB, J.A., KLESIUS, P., 1988. -An Assessment of the Antigenic Homogeneity of *Edwardsiella ictaluri* Using Monoclonal Antibody. *Journal of Fish Diseases*, **II**, 499-509pp.
- PYLE, S. W., PUPPENTHAL, T., CIRPIONO, R. C., SHOTTS, E. B., 1987 Further characterization of biochemical and serological characteristics of *Yersinia ruckeri* from different geographic areas. *Microbios Letters*, **95**, 87-93
- RABB, L., CORNICK, J. W., MCDERMOTT, L. A., 1964. Amacroscopic- slide agglutination test for the presumptive diagnosis of furunculosis in fish the *Progressive Fish-Culturist*, 118-120.
- RAZQUIN B. E., CASTILLO, A., LOPEZ-FIERRO, P., ALVEZ., ZAPATA, A., VILLENA, A. J., 1990. Ontogeny of IgM- Producing cells in the lymphoid organs

- of rainbow trout, *salmo gairdneri richardson*: an immuno-and enzyme-histochemical study. *J. Fish Biol.* **36**, 159-173
- RINTAMAKI, P., VALIONEN, E.T., FRERICHS, G.N., 1986. Occurrence of *Yersinia ruckeri* Infection in Farmed Whitefish, *Coregonus peled* Gmelin and *Coregonus muskun* Pallas, and Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., in Northern Finland. *Journal of Fish Diseases*, **9**, 137-140.
- ROBERSON, B.S., 1993. Bacterial Agglutination. In: Techniques in Fish Immunology. (STOKEN, J.S., FLETCHER, T.C., ANDERSON, D.P., ROBERSON, B.S., Van MUISWINKEI, W.B., eds.). SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303 USA, 81-86pp.
- ROBERTS, M. S., 1983, A report of an epizootic in hatchery reared rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson at an English trout farm, caused by *Yersinia ruckeri*. *J. Fish. Dis.* **6**, 551-552.
- ROBERTS, R.J., SHEPHERD, C.J., Handbook of Trout and Salmon Diseases. Fishing News (Books) Ltd. England. 168p.
- RODAK, L., POSPISIL, Z., TOMANEK, J., VESELY, T., OBR, T., VALICEK, L., 1993. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) for the Detection of Spring Viraemia of Carp Virus (SVCV) in Tissue Homogenates of the Carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*, **16**, 101-111.
- RODGERS, C.J., 1991. The Usage of Vaccination and Antimicrobial Agents for Control of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*, **14**, 291-301.
- RODGERS, C. J., 1992. Development of a Selective- Differential Medium For the Isolation of *Yersinia ruckeri* and Its Application in Epidermilogical Studies. *Journal of Fish Diseases* **15**, 243-254s.
- RODGERS, C.J., AUSTIN, B., 1983. Oxoclonic Acid for Control Enteric Redmouth Disease in Rainbow Trout. *The Veterinary Record*, **112**, 83.
- ROMALDE, J.L., TORANZO, A.E., 1991. Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **11**(4), 147-149.
- ROMALDE, J.L., MAGARINOS, B., PAZOS, F., SILVA, A., TORANZO, A.E., 1994. Incidence of *Yersinia ruckeri* in two farms in Galida (NW Spain) during a one-year period. *Journal of Fish Diseases*, **17**, 533-539.
- ROMALDE, J.L., SANTOS, Y., LEMOS, M.I., TORANZO, A.E., 1989. Diversity Among Serotypes of *Yersinia ruckeri* in Relation to Several Molecular Characteristics. *c*, 100.
- ROSE, A. S., ELLIS, A. E., ADAMS, A., 1989. An assessment of routine *Aeromonas salmonicida* carrier detection by ELISA. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **9** (3) 65-67.
- ROSS, A.J., RUCKER, R.R., and EWING, W.N., 1966. Description of a bacterium associated with remouth disease of rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). *Canadian Journal of Microbiology.* **12**. 763-770.
- RUSSEL, P.H., 1974. Lymphocystis in wild plaice *Pleuronectes platessa* (L.) in British coastal waters: a histopathological and serological study. *J. Fish Biol.*, **6**, 771-778.
- SAEED, M. O., PLUMB, J. A., 1987. Serological detection *Edwardsiella ictaluri* Hawke lipopolysaccharide antibody in serum of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *Journal of Fish Diseases*, **10**, 205-209

- SAKAI, M., ATSUTA, S., KOBAYASHI, M., 1991. The detection of serum antibody to *Renibacterium salmoninarum* in pen-cultured coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, **14**, 243-246.
- SAKAI, M., ATSUTA, S., KOBAYASHI, M., 1993. The immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) injected with five *Renibacterium salmoninarum* bacterins. *Aquaculture*, **113**, 11-18.
- SALATI, F., ONO, K., KUSUDA, R., 1989. Active and Passive Immunization of Glass Eel Against *Edwardsiella torda* Infection. IV. EAFP International Conference, Diseases of Fish and Shellfish, 24-28 September, Book of Abstract, 53, SPAIN.
- SALOMONI, C., FIORENTINO, M., PALENZONA, D. L., 1987. Effects of diet, sham-immunization and bleeding on the immune response Kinetics for two strains of *Cyprinus carpio*. *J. Fish Biol.*, **31** (Supplement A), 93-99.
- SANCHEZ, C., COLL, J., DOMINGUEZ, J., 1991. One-step purification of the major rainbow trout immunoprotein, **27**, 383-391.
- SANDERS, E., FRYER, J.L., 1988. Bacteria of Fish. In: *Methods in Aquatic Bacteriology*, (AUSTIN, B., ed.) John Wiley & Sons, Cichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 115-170.
- SANDERS, J. E., HOLT, R. A., FRYER, J. L., 1976. Serological comparison of *Flexibacter columnaris* isolates using rabbit and *Rainbow trout* (*salmo gairdneri*) antisera. *J. Fish. Res. Board can.*, **33**, 1386-1388.
- SANTOS, Y. ROMALDE, J. L., BANDIN, I., MAGARINOS, B., NUNEZ, S., BARJA, TORONZO A.E., 1993. Usefulness of API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, **116**, 111-120.
- SAVVIDIS, G.K., 1990. First Isolation of *Yersinia ruckeri* from Rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, in Greece. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **10**(5), 131-132.
- SCHILL, W.B., BULLOCK, G.L., ANDERSON, D.P., 1989. Serology. In: *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*. (AUSTIN, B. And AUSTIN, D.A., eds.) 98-112.
- SCHILL, W. B., PHELPS, S. R., PYLE, S. W., 1984. Multilocus electrophoretic assesment of the genetic structure and diversity of *Yersinia ruckeri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 975-979.
- SECOMBES, C. J., RESINK, J. W., 1984. The immune response of carp, *Cyprinus carpio* L., following injection of antigen-antibody complexes. *J. Fish Biol.*, **24**, 193-200.
- SHARP, G.J.E, PIKE, A.W, SECOMBES, C.J., 1989. The immune response of wild rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to naturally acquired plerocercoid infections of *Diphyllbothrium dendritum* (Nitzsch, 1824) and *D. ditremum* (Creplin, 1825). *J. Fish Biol.*, **35**, 781-794.
- SHOTSS, E. B., BULLOCK, G. L., 1975. Bacterial disease fishes diagnostic procedures for Gram negatif pathogens. *J. Fish Res. Bd. Can.* **32**, 1243-1247.
- SHOTTS, E.B., TESKA, J.D., 1989. Bacterial Pathogens of Aquatic Vertebrates. In: *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*. (AUSTIN, B. And AUSTIN, D.A., eds.) 164-182.
- SITJA-BOBADILLA, A., WOO, P.T.K., 1994. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against the Pathogenic Haemoflagellate, *Cryptobia salmostica* Katz, and protection against cryptobiosis in Juvenile rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), inoculated with a live vaccine. *Journal of Fish Diseases*, **17**, 399-408.

- SMITH, P. D., 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Aeromonas salmonicida* in diseased fish tissue. *Develop. Biol. Standard.*, **49**, 97-100.
- SMITH, S.A., GEBHARD, D. H., HOUSMANN, J.M., LEVY, M.G. NOGA, E.J., 1993. Isolation, purification, and molecular-weight determination of serum immunoglobulin from *Oreochromis aereus*. *Journal of Aquatic Animal Health* **5**:23-35.
- SPARBOE, O., KOREN, C., HASTEIN, T., POPPE, T., STENWING, H., 1986. The first isolation of *Yersinia ruckeri* from farmed Norwegian salmon. *Bull. eur. Ass. Fish Pathol.* **6**, 2, 41-42.
- STAVE, J.W., COOK, T.M., LOBERSON, B.S., 1987. Chemiluminescent responses of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), phagocytes of strains of *Yersinia ruckeri*, *Journal of Fish Diseases*, **10**, 1-10.
- STEVENSON, R. M. W., DALY, J. G., 1982. Biochemical and serological characteristic of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **39**, 870-876.
- STEVENSON, R. M. W., IREDRIE, D. W., 1984. Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. *Journal of Fish Diseases*, **7**, 247-254.
- STRAND, J. A., FUJIHARA, M. P., BURDETT, R. D., POSTON, T. M., 1977. Suppression of the primary response in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, sublethally exposed to tritiated water during embryogenesis. *J. Fish. Res. Board can.*, **34**, 1293-1304.
- SZAKOLCZAI, J., CSABA, G., VANYI, A., 1989. Enteric red mouth disease of trout. Incidence and Spreading. *Disease of Fish and Shellfish*, IV. EAFP International Conference, September 24-28, Spain. *Book of Abstract.* p.56.
- TANRIKUL, T. T., 1994. Yersinioz Hastalığından Korunmada Aşı Uygulamaları ve Bu Uygulamaların Sonuçlarının Değerlendirilmesi. Doktora tezi. Bornova, 96s.
- TATNER, M. F., 1990. Quantitative and qualitative differences in the antibodies produced by immunosuppressed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, **88**, 205-211.
- TATNER, M.F., HORNE, M.T., 1985. The Effects of Vaccine Dilution, Length of Immersion Time, and Booster on the Protection Levels Induced by Direct Immersion Vaccination of Brown Trout, *Salmo trutta*, with *Yersinia ruckeri* Vaccine. *Aquaculture*, **46**, 11-18.
- TATNER, M. F., ADAMS, A., LESCHEN, W., 1987. An analysis of the primary and secondary antibody response in intact and tyhmectomized rainbow trout, *salmo gairdneri richardson*, to human gamma globulin and *aeromonas salmonicida*. *J. Fish. Biol.*, **31**, 177-195
- THOMOS, P. T., WOO, P. T. K., 1990. Dietary modulation of humoral response and anaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), infected with *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. *Journal of fish Diseases*, **13**, 435-446.
- THOMPSON, I., WHITE, A., FLETCHER, T.C., HOULIHAN, D.F., SECOMBES, C.J., 1993. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, **114**, 1-18.
- THORBURN, M. A., JANSSON, E. L. K., 1988. The effects of booster vaccination and fish size survival and antibody production follow *Vibrio* infection of bath-vaccinated rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, **71**, 285-291.

- THUVANDER, A., HONGOLO, I., JANSSON, E., SUNDQUIST, B., 1987. Duration of protective immunity and antibody titres measured by ELISA after vaccination of rainbow trout, *Salmo gairneri richardson*, against vibriosis. *Journal of Fish Diseases*, **10**, 479-486.
- TİMUR, G., 1975. A Study of Giant Cell in İnflamatory Lesions of the Plaice (*Pleuronectes pletessa* L.). PhD Thesis. Unit of Aquatic Pathobiology University of Stirling. 144p.
- TİMUR, G., 1985. Kültür Balıklarında Bakteriyel ve Viral Hastalıkların Teşhis Metodları ile Koruma Yöntemleri. II. Mühendislik Haftası Tebliğleri. 23-26 Mayıs 1984. Isparta Mühendislik Fak. Matbaası. 250-257.
- TİMUR, G., 1987. İçsu Balıkları Yetiştiriciliği Lisans Ders Notları. Akd. Üniv. Eğirdir Su Ürünleri Yüksekokulu, 1987.
- TİMUR, G., 1991. A histological study of a carp pox (viral epitheliomas) disease in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* **11**(5), 171-173.
- TİMUR, G., 1997. Kişisel Görüşme.
- TİMUR, G., KARATAŞ, S., ÇOLAK, S., AKAYLI, T., 1996a. Gökkuşuğu Alabalık (*O. mykiss* Wal., 1792) Yavrularında Görülen Frunkulosis Hastalığı Üzerine Bir Çalışma. İ.Ü.II. International Symposium On Aquatic Products. September. Abstracts. İstanbul. 64.
- TİMUR, G., TİMUR, M., 1985. Eğirdir gölü sudak (*Stizostedion lucioperca* L. 1758) balıklarında yüksek mortaliteye neden olan bakteriyel hemorojik sepitisemi hastalığı üzerinde bir araştırma. A.Ü. Yet. Fak. Dergisi **32**(1) 33-41s.
- TİMUR, G., TİMUR, M., 1991. An outbreak of enteric redmouth disease in farmed rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **11**(5), 182-183.
- TİMUR, G., 1992. Balık Patolojisi Doktora Ders Notları. Akdeniz Üniv. Eğirdir Su Ürünleri Yüksekokulu. Eğirdir.
- TİMUR, G., TİMUR, M., ARIK, F., ULUKÖY, G., 1993a. Bazı Alabalık ve Sazan İşletmelerimizde Yüksek Mortaliteye Neden Olan Paraziter Hastalıklar Üzerinde Bir Araştırma. I. Su Ürünleri Sempozyumu 23-25 Haziran 1993, Erzurum.
- TİMUR, G., TİMUR, M., KARATAŞ, S., AKAYLI, T., 1996b. *Ichthyophonus hoferi* ile Enjekte Olmuş Kültür Levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) Görülen Pasteurellosis Hastalığı Üzerine Bir Çalışma. İ.Ü.II. International Symposium On Aquatic Products. September. Abstracts. İstanbul. 59.
- TİMUR, G., TİMUR, M., KUBİLAY, A., SARMAŞIK, A., 1993b. Bazı Alabalık İşletmelerimizde Görülen İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis Hastalığı Üzerinde Histopatolojik ve Elektron Mikroskopik Çalışmalar. I. Su Ürünleri Sempozyumu. 23-25 Haziran 1993., Erzurum.
- TİMUR, M., 1975. A Study of the Çarrageenin Granuloma in the Plaice (*Pleuronectes pletessa* L.) PhD Thesis. Unit of Aquatic Pathobiology University of Stirling. 187p.
- TİMUR, M., 1983. İç Su Balıkları Yetiştiriciliğinde Hastalıklar, Hijyen ve Tedavi Yöntemleri. İç Sularda Balık Yetiştiriciliği ve Sorunları Semineri. Bakanlıklar-Ankara 8s.
- TİMUR, M., 1984. A Disease of Faired Eel (*Anguilla anguilla*) Due to *Aeromonas hydrophila* in Turkey and Bacteriological Studies. A.Ü. Yet. Fak. Derneği **30**(3) A.Ü. Basımevi, Ankara 361-366.
- TİMUR, M., 1990. Balıkçılık Tarihi Yüksek Lisans Ders Notları. Akd. Üniv. Eğirdir Su Ürünleri Yüksekokulu Eğirdir. 55s.

- TORANZO, A.E., BAYA, A.M., ROBERSON, B.S., BARJA, J.L., GRIMES, D.J., HETRICK, F.M., 1987. Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, **61**, 81-97.
- TRUST, T. J., 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. *Ann. Rev. microbiol.*, **40**, 479-502.
- VALTONEN, E.T., JOKINEN, I., 1989. The Occurance of *Yersinia ruckeri* in Fish From Four Central Finnish Lakes and from a Fish Farm. Disease of Fish and Shellfish, IV. EAFF International Conference, September 24-28, Spain. Book of Abstract, 93.
- VOLLER, A., BIDWELL, D. E., BARTLETT, A., 1976. Enzyme immunsassays in diagnostic medicine. *Bull. Wold Health Organ.* **53**, 55-65.
- VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A., 1979. The Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). A Guide With Abstracts of Microplate Applications. Dynatech Europe Broughouse, London 123p.
- VUILLAUME, A., BRUN, R., CHENE, P., SOCHON, E., LESEL, R., 1987. First isolation of *Yersinia ruckeri* from sturgeon *Acipenser baeri* Brandt, in South West of France. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* **7**(1), 18-19.
- WALTMAN, W. D., SHOTTS, E. B., 1984. A medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*. *Can J. Fish Aquat. Sci.*, **41**, 804-806.
- WATERSTRAT, P. R., BRAZIL, J., AINSWORTH, A. J., 1991. Use of an ELISA-based assay for the detection of antibody-secreting cells in channel calfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, **14**, 669-675.
- WEBER, J. M., ZWICKER, B. M., 1979. *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo solar*): occurrence of specific agglutinins to three bacterial pathogens. *J. Fish. Res. Board can.*, **36**, 1102-1107.
- WHYTE, S. K., ALLON, J. C., SECOMBES, C. J., CHAPPELL, L. H., 1987. Cerrariac and diplostomules of *Diplostomum spathaceum* (Digenea) elicit an immune response in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, **31** (Supplement A), 185-190.
- WICHARDT, U.P., THUVANDER, A., 1989. The Humoral Immun Response of Atlantic Salmon and Brown Trout Vaccinated Against Furunculosis at Low Temprature and With Different Vaccination Methods. Disease of Fish and Shellfish, IV. EAFF International Conference, September 24-28, Spain. Book of Abstract, 189.
- WILLIAMS, M. A., HOOLE, d., 1995. Immunolabelling of fish host molecules on the tegumental surface of *Ligula intestinalis* (cestoda: Pseudophyllidea). *Internationnal Journal for Parasitology*, **25**, 249-256.
- WISHKOVSKY, A., AVTALION, R. R., 1987. Induction of immunosuppression to bacterial antigens in carp, *Cyprinus carpio*. *J. Fish Biol.*, **31** (Supplement A), 101-106.
- YARDIMCI, H., DİKER, S., AKAN, M., 1993. Use of ELISA for Detection of *Campylobacter* Antibodies in Sheep. *Tr. J. Of Veterinary and Animal Sciences. TÜBİTAK* **18**, 129-133.
- YARDIMCI, H., 1989. Koyunlarda *Brucella melitensis* İnfeksiyonlarının Aglutinasyon, Rose Bergal ve ELISA Testleri ile Ortaya Konması ve Bu Testlerin Teşhislerdeki Değişikleri Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi. Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. Mikrobiyoloji Ana Bil. Dalı. Ankara.

ÖZGEÇMİŞ**T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Isparta ili Yalvaç ilçesinde 1966 yılında doğdum Isparta Bahçelievler İlkokulu ve Isparta Merkez Ortaokulu'ndan sonra 1984 yılında Isparta ŞAİK Lisesinden mezun oldum. Aynı yıl kazandığım Akdeniz Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Yüksekokulunu 1988 yılında tamamlayarak, aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Programına kaydoldum ve bu enstitüye Araştırma Görevlisi olarak atandım. Yüksek Lisansımı 1991 yılında tamamladım. Aynı yıl Eğirdir Su Ürünleri Yüksekokulu Araştırma Görevlisi kadrosuna yeniden sınavla atandım. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünün açtığı Doktora sınavını 1992 yılında kazanarak Doktora öğrenimine başladım. Daha sonra Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne geçiş yaptım. Evli ve bir çocuk annesiyim. Halen Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Hastalıklar Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.