

**T.C.  
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI (*Oncorhynchus mykiss* W,1792)  
İÇİN İNAKTİF BAKTERİYEL KORUYUCU AŞILARIN  
GELİŞTİRİLMESİ VE GELİŞTİRİLMİŞ AŞILARIN ETKİ  
SÜRELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Pınar YILDIRIM**

**Danışman  
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2019**



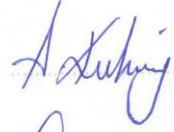
©2019 [Pınar YILDIRIM]

## TEZ ONAYI

**Pınar YILDIRIM** tarafından hazırlanan “**Gökkuşuğu alabalıkları (*oncorhynchus mykiss* w,1792) için inaktif bakteriyel koruyucu aşılarda geliştirilmesi ve geliştirilmiş aşılarda etki sürelerinin belirlenmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

**Danışman**

**Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY**  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



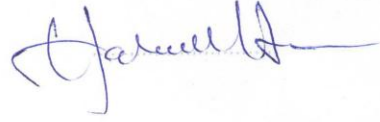
**Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Seçil METİN**  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Haluk HAMAMCI**  
Orta Doğu Teknik Üniversitesi



**Enstitü Müdürü**

**Prof. Dr. Yusuf UÇAR**

.....

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Pınar YILDIRIM**



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	6
2.1. Gökkuşluğu Alabalığı.....	6
2.2. Gökkuşluğu Alabalığı Yetiştiriciliği.....	7
2.3 Alabalıklarda Vibriosis, Yersiniozis ve Lactococcosis Enfeksiyonları .....	8
2.3.1. Lactococcosis.....	8
2.3.2. Yersiniozis .....	9
2.3.3. Vibriosis.....	10
2.4. Balıklarda Bağışıklık Sistemi .....	10
2.4.1. Bağışıklık sisteminin ontogenezi .....	13
2.4.2. Balıklarda lenfoid organlar .....	14
2.4.2.1. Timus .....	14
2.4.2.2. Böbrek.....	15
2.4.2.3. Dalak.....	15
2.4.3. Kazanılmış (Spesifik) bağışıklık.....	16
2.4.3.1. Antikorlar .....	16
2.4.3.2. İmmünolojik hafıza.....	17
2.4.3.3. Spesifik bağışıklıkta yer alan sitokinler .....	17
2.4.3.4. Bağışıklık yanıtı üzerindeki çevresel etki .....	18
2.5. Balıklarda İmmünizasyon.....	19
2.6. Ticari Bakteriyel Aşılar .....	21
2.7. Balık Aşılarında Kullanılan Bazı Adjuvantlar .....	23
2.7.1. Beta-glukan.....	23
2.7.2. Freund's Complete Adjuvant (FCA) .....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Araştırmada kullanılan balık materyali, uygulama yeri ve su kalitesi.....	25
3.1.2. Araştırmada kullanılan yem.....	26
3.1.3. Araştırmada kullanılan suşlar .....	27
3.1.4. Aşıların hazırlandığı kuruluş .....	27
3.1.5. Araştırmada kullanılan adjuvantlar.....	28
3.2. Yöntem .....	28
3.2.1. Aşı hazırlamada kullanılan patojenler ve özellikleri .....	28
3.2.2. <i>L. garvieae</i> , <i>V. anguillarum</i> ve <i>Y. ruckeri</i> suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi.....	28
3.2.3. Aşının hazırlanması .....	29
3.2.3.1. Aşı suşunun seçimi .....	29
3.2.3.2. Aşının üretimi .....	29
3.2.3.3. Sterilite testi .....	30
3.2.3.4. Toksikite denemeleri .....	30
3.2.3.5. Aşıların uygulanması .....	30

3.2.3.6. Aşı etkinliğinin değerlendirilmesi .....	31
3.2.3.7. Deneysel enfeksiyon (Epruvasyon) uygulamaları .....	32
3.2.3.8. Serum elde edilmesi.....	32
3.2.3.9. Pozitif kontrol serumunun hazırlanması .....	32
3.2.4. Aglutinasyon testi .....	33
3.2.4.1. Antijen hazırlanması .....	33
3.2.4.2. Lam aglutinasyon testinin uygulanması .....	33
3.2.4.3. Mikro-aglutinasyon testinin uygulanması .....	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	34
4.1. Aşı Suşlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular .....	34
4.2. Hazırlanan Aşının Toksikite Denemelerinin Sonuçları İle İlgili Bulgular .....	35
4.3. Hazırlanan Aşının Sterilite Denemelerinin Sonuçları İle İlgili Bulgular .....	35
4.4. Aşılınmış Balıkların Koruma Seviyesine Ait Bulgular .....	36
4.5. Lam Aglutinasyon Testi İle İlgili Bulgular .....	42
4.6. Mikroaglutinasyon Testi İle İlgili Bulgular.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	47
6. KAYNAKLAR .....	56
ÖZGEÇMİŞ .....	68

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

# GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI (*ONCORHYNCHUS MYKISS* W,1792) İÇİN İNAKTİF BAKTERİYEL KORUYUCU AŞILARIN GELİŞTİRİLMESİ VE GELİŞTİRİLMİŞ AŞILARIN ETKİ SÜRELERİNİN BELİRLENMESİ

Pınar YILDIRIM

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Bu tez çalışmasında gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) patojen olan *Lactococcus garvieae*, *Vibrio anguillarum* ve *Yersinia ruckeri*' ye karşı geliştirilen polivalan aşının adjuvantlar (Freund's Complete Adjuvant, FCA ve glukan) kullanılarak etkinliği değerlendirilmiştir.

Deneysel aşı, bakterilerin formalinle inaktive edilmesiyle yapılmış ve balıklara 0,1 ml intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon ve immersiyon (im) yöntemleriyle uygulanmıştır. Kontrol grubu balıklarına ise 0,1ml fosfat tamponlu salin-PBS verilmiştir. Deneme grupları 25'er balık ile 2 tekrarlı olarak yapılmıştır. Adjuvantsız polivalan ip. ve im. gruplarına 30 gün sonra rapel uygulanmıştır.

Intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon ile aşılardan sonraki 30, 90, 120 ve 270. günlerde immersiyon uygulanmış balıklara 90, 120 ve 270. günlerde LD<sub>60</sub> dozunda bakteriler intraperitoneal enjeksiyon ile verilerek epruvasyon yapılmıştır. Nispi Yaşama Oranları (RPS) aşılı gruptaki balıklarda ölümler temel alınarak hesaplanmıştır.

RPS; 270. günde adjuvantsız rapelli grupta *Y.ruckeri* için % 96,77, *V. anguillarum* için % 100; *L.garvieae* % 96,66, polivalan+glukan ilaveli grupta *Y.ruckeri* için % 93,54; *V.anguillarum* için % 96,77, *L.garvieae* için % 93,33 olarak; polivalan+FCA ilaveli grupta *Y.ruckeri* için % 100, *V.anguillarum* için % 87,09, *L.garvieae* için % 93,33 olarak belirlenmiştir.

İmmersiyon polivalan + im rapel aşılanmış gruplarda RPS değerleri, 270. günde *L. garvieae* için % 100 olarak belirlenmiştir. Aşılanan grupta 90. güne kadar *V.anguillarum*'a karşı koruma gözlemlendi. Bununla birlikte, aşılama, *Y. ruckeri*'ye karşı koruma sağlamadı.

Çalışmada antijen ve antikor reaksiyonun tespiti için lam aglütinasyon ve mikroaglütinasyon testleri kullanılmıştır. Aglütinasyon titresi olarak en yüksek aglütinasyonu veren serum dilüsyonu kaydedilerek, bu değerler log<sub>2</sub> tabanına göre değerlendirilmiştir. Lam aglütinasyon testinde tüm serumlarda aglütinasyon görülmüştür. Mikroaglütinasyon testinde i.p. aşı uygulanan tüm gruplarda en yüksek antikor titresi, tüm bakterilere karşı polivalan+booster ve polivalan+glukan gruplarında bulunmuştur. İmmersiyon aşı uygulaması yapılan gruplarda en yüksek

antikor titresi *V. anguillarum*'da, en düşük antikor titresi ise *Y. ruckeri*' de gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, intraperitoneal enjeksiyon ve immersiyon yolu ile uygulanan adjuvantlı ve adjuvantsız polivalan aşuların her üç patojen için iyi koruma sağladığı görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, polivalan aşuların, gökkuşuğu alabalıklarını *L. garvieae*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum*'a karşı etkili bir şekilde koruyabildiğini ve gökkuşuğu alabalığı çiftliklerinde bu enfeksiyonların önlenmesi için uygun bir strateji olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:***Oncorhynchus mykiss*, polivalan aşı, vibriozis, yersiniozis, lactococcosis

**2019, 70 sayfa**





## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### DEVELOPMENT OF PREVENTIVE INACTIVATED BACTERIAL VACCINES AND TO DETERMINE THE EFFECTS TIME OF DEVELOPED VACCINES FOR RAINBOW TROUT, (*Oncorhynchus mykiss* W,1792)

Pınar YILDIRIM

Isparta University of Applied Science  
The Institute of Graduate Education  
Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

In this thesis, the effectiveness of polyvalent vaccine against *Lactococcus garvieae*, *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri*, which is a pathogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), was evaluated using adjuvants (Freund's Complete Adjuvant, FCA and glucan).

The experimental vaccine was obtained by formalin inactivation of the bacteria and 0.1 ml intraperitoneal (ip.) injection and immersion (im.) were applied to the fish. Control fish were injected with 0.1 ml of phosphate buffered saline-PBS. The experimental groups were made with 25 fish and 2 replicates. The non-adjuvant polyvalent immersion and i.p vaccination groups were boosted after 30 days.

Fish were challenged by intraperitoneal injection ( $LD_{60}$  doses of bacteria) in 30, 90, 120 and 270 days for i.p. vaccinated groups and 90,120 and 270 days for immersion vaccinated groups. Relative Percentage Survival (RPS) were calculated based on mortality rates in vaccinated groups.

RPS values in i.p. injections groups were determined in Polyvalent+Booster vaccinated group: *Y.ruckeri* 96.77%, *V.anguillarum* 100%; *L.garvieae* 96.66%, Polyvalent+Glucan: *Y.ruckeri* 93.54%; *V.anguillarum* 96.77%, *L.garvieae* 93.33%, Polyvalent+FCA: *Y.ruckeri* 100%, *V.anguillarum* 87.09%, *L.garvieae* 93.33% at 270th day.

For RPS values to immersion vaccination groups, polyvalent+im booster vaccinated groups were determined as 100% for *L.garvieae* at 270<sup>th</sup> day. Im vaccinated group was observed protection until the 90th days against *V.anguillarum*. However, im vaccination did not confer protection against *Y. ruckeri*.

The slide agglutination and microagglutination tests were used to determine the antigen and antibody reaction in this study. Serum dilution giving the highest agglutination as agglutination titer is recorded and these values were evaluated according to  $\log_2$  base. In the slide agglutination test, agglutination was observed in all blood serum. The highest antibody titer in microagglutination test in injections

groups were found polyvalent + booster and polyvalent + glucan groups against all tested bacteria. In immersion vaccine groups, the highest antibody titer were observed in *V. anguillarum*, while the lowest antibody titer were observed in *Y. ruckeri*.

In conclusion, non-adjuvant and adjuvant polyvalent vaccines administered by intraperitoneal injection and immersion routes provided good protection for all three pathogens. Our results demonstrate that these polyvalent vaccines can effectively protect rainbow trout against *L. garvieae*, *Y. ruckeri* and *V. anguillarum* and is considered will to be an appropriate strategy to prevent these infections in rainbow trout farms.

**Keywords:** *Oncorhynchus mykiss*, polyvalent vaccine, vibriosis, yersiniosis, lactococcosis.

**2019, 70 pages**



## TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni ynlemdiren, karşılaştığım zorluklarda bilgi ve tecrübesi yolumu aydınlatan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a teőekkürlerimi sunarım. Çalışmam süresince yardım ve katkıları için kıymetli hocalarım Doç. Dr. Seçil METİN'e ve Doç. Dr. Behire Işıl DİDİNEN' ne, Su rnleri Mühendisi Sercan ÇİFTÇİ' ye teşekkür ederim.

0347-STZ-2013-2 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Sanayi Tezleri Programı'na H2Bıyotek Ltd. Őti'ne ve VETAL Hayvan Sağlığı rnleri A.Ő. personeline teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Pınar YILDIRIM  
ISPARTA, 2019

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).....	6
Şekil 2.2. Balıklarda lenfoid organlar .....	14
Şekil 3.1. Denemenin gerçekleştirildiği balık üretim tesisi ve denemede kullanılan fiberglas balık tankları .....	26
Şekil 3.2. Araştırmada Kullanılan Adjuvantlar .....	28
Şekil 4.1. a. Shotts-Waltman agarda (SWA) da <i>Y.ruckeri</i> , b. Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agarda (TCBS) <i>V. anguillarum</i> .....	35
Şekil 4.2. TSB de sterilite kontrolü yapılan aşılar .....	36
Şekil 4.3. Farklı aşılarla İ. P olarak aşılana gökkuşığı alabalıklarında antijenlerin <i>Y.ruckeri</i> 'e karşı koruyuculuk değerlerinin (RPS) karşılaştırılması .....	39
Şekil 4.4. Farklı aşılarla İ.P olarak aşılana gökkuşığı alabalıklarında antijenlerin <i>L. garvieae</i> karşı koruyuculuk değerlerinin (RPS) karşılaştırılması .....	39
Şekil 4.5 Farklı aşılarla İ.P olarak aşılana gökkuşığı alabalıklarında antigenleri <i>V. anguillarum</i> 'a karşı koruyuculuk değerlerinin (RPS) karşılaştırılması .....	40
Şekil 4.6. İmmersiyon olarak aşılana 3 grlık gökkuşığı alabalıklarında antijenlerin <i>Y. Ruckeri</i> , <i>L. garvieae</i> ve <i>V. anguillarum</i> 'a karşı koruyuculuk değerlerinin (RPS) karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.7. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antigenin oluşturduğu kümeler A) negatif kontrol B) pozitif kontrol C) test serumu .....	42
Şekil 4.8. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antigenin oluşturduğu kümelerin ışık mikroskopunda görünümü .....	42
Şekil 4.9. İmmun test serumlarını içeren microwell aglutinasyon plate çukurları <i>Y. ruckeri</i> .....	43
Şekil 4.10. İmmun test serumlarını içeren microwell aglutinasyon plate çukurları <i>L. garvieae</i> .....	43
Şekil 4.11. İmmun test serumlarını içeren microwell aglutinasyon plate çukurları <i>V. anguillarum</i> .....	44
Şekil 4.12. <i>Y. ruckeri</i> 'e karşı immunize edilen balıkların kan serumunda oluşan aglutinin titreleri (Log <sub>2</sub> ) .....	45
Şekil 4.13. <i>L. garvieae</i> karşı immunize edilen balıkların kan serumunda oluşan aglutinin titreleri (Log <sub>2</sub> ) .....	46
Şekil 4.14. <i>V. anguillarum</i> a karşı immunize edilen balıkların kan serumunda oluşan aglutinin titreleri (Log <sub>2</sub> ).....	46

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Gökkuşuğu alabalığının sistematikteki yeri .....	7
Çizelge 2.2. Gerçekçeneli balıklar (Gnathostomata) ve memeliler arasındaki immun sistem farkları.....	12
Çizelge 2.3. Anadrom ve tatlı su alabalık için piyasada mevcut ticari lisanslı aşular ve antijenlerin özeti .....	22
Çizelge 3.1. Deneme süresince kullanılan ticari alabalık yeminin kimyasal besinbileşenleri .....	27
Çizelge 3.2.Çalışmada kullanılan suşlar .....	27
Çizelge3.3. Aşı deneme grupları ve uygulama şekilleri .....	31
Çizelge 4.1. Aşı suşlarının klasik yöntemlerle tespit edilen fenotipik özellikleri ile ilgili bulgular (22 °C 24 saatlik inkübasyon) .....	34
Çizelge 4.2. Hazırlanan antijenlerin toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçları.....	35
Çizelge 4.3. I.p. enjeksiyon yöntemiyle aşılana 20 gr ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında 30. günlerde yapılan deneysel enfeksiyon (LD <sub>60</sub> ) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	37
Çizelge 4.4. I.p. enjeksiyon yöntemiyle aşılana 20 gr ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında 90. günlerde yapılan deneysel enfeksiyon (LD <sub>60</sub> ) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	37
Çizelge 4.5. I.p. enjeksiyon yöntemiyle aşılana 20 gr ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında 120. günlerde yapılan deneysel enfeksiyon (LD <sub>60</sub> ) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	38
Çizelge 4.6. I.p. enjeksiyon yöntemiyle aşılana 20 gr ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında 270. günlerde yapılan deneysel enfeksiyon (LD <sub>60</sub> ) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	38
Çizelge 4.7. İmmersiyon yöntemiyle aşılana 3 gr ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında 90. günde yapılan deneysel enfeksiyon (LD <sub>60</sub> ) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	40
Çizelge 4.8. İmmersiyon yöntemiyle aşılana 3 gr ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında 120. günde yapılan deneysel enfeksiyon (LD <sub>60</sub> ) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	41
Çizelge 4.9. İmmersiyon yöntemiyle aşılana 3 gr ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında 270. günde yapılan deneysel enfeksiyon (LD <sub>60</sub> ) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	41
Çizelge 4.10. <i>Y. ruckeri</i> 'e karşı immunize edilen balıkların immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri ve aglutinin titreleri (Log <sub>2</sub> ).....	44
Çizelge 4.11. <i>L. garvieae</i> karşı immunize edilen balıkların immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri ve aglutinin titreleri (Log <sub>2</sub> ).....	45
Çizelge 4.12. <i>V. anguillaruma</i> karşı immunize edilen balıkların immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri ve aglutinin titreleri (Log <sub>2</sub> ).....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

dk	dakika
FCA	Freund's complete adjuvant
g	gram
Ig	immunoglobulin
IU	international unit
i.p.	periton içi
kob(cfu)	koloni oluşturan birim
log	logaritma
mg	miligram
MMC	melanomacrophage centers
PBS	phosphate buffered saline
pH	hidrojen iyonu konsantrasyonu
°C	derece santigrat



## 1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen faktörlerin başında hastalıklara bağlı sorunlar gelmektedir. Balıkçılığın ve balık yetiştiriciliğinin beklenen düzeyde gelişmesi, balıkların uygun koşullarda yetiştirilmesi ve hastalıklardan korunmasına bağlıdır. Ticari su ürünleri yetiştiriciliğinde, bulaşıcı hastalıklara sebep olan patojenler, üzerinde durulması gereken en önemli problemler arasında gelmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde salgın hastalıklar büyük ekonomik kayıplara neden olabilmekte ve çoğu durumlarda, koruyucu ve tedavi edici önlemler alınmamaktadır. Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliğinde meydana gelen ekonomik kayıpların bir kısmı hastalıklardan kaynaklanmaktadır.

Gökkuşaağı alabalığı yetiştiriciliğinde kullanılan etkili aşular, yetiştiriciliğın başarısı ve balıkların hızlı büyümesi için önemli faktörlerden birisidir. Su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe yoğun üretimde sektörün gelişimi ve hastalıklardan ileri gelen balık kayıplarının önlenmesi için aşular ve aşılama rejimlerinin geliştirilmesi çok önemlidir. Günümüzde alabalıklar için bir çok hastalığa karşı lisanslı aşular ve otojen aşular mevcuttur( Brudeseth vd., 2013)

Yetiştiricilikte balıklarda aşılama giderek daha önemli bir hal almış mono ve polivalan bakteriyel ve viral aşular, başarılı bir şekilde gelişmiş ve ticari olarak üretilmektedir. Salmonid yetiştiriciliğinde aşuların kullanımı çok yaygındır (Mohamed ve Soliman, 2013).

Gökkuşaağı alabalığının üretiminde hızlı üretim artışının sürdürülebilir olmasındaki en önemli sorunlardan biriside özellikle fırsatçı bir patojen olan *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae* ve *Vibrio anguillarum*' un etken olduğu enfeksiyonların ortaya çıkışının önlenememesi ve işletmelerde kontrol altına alınamamasıdır.

Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) yetiştiriciliği ülkemizde 1970'li yıllarda başlamış ve günümüzde çok önemli bir noktaya ulaşmıştır. 2017 yılında iç sularda 103.705 ton, denizlerde 5.952 tona varmıştır. (TÜİK,2018). Sürekli

büyüyen bu artışa bağlı olarak işletmelerde ortaya çıkan bakteriyel balık hastalıkları en önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Hastalık, kemoterapötiklerle tedavi edilsede sonuca ulaşana kadar geçen sürede önemli kayıplar verilmektedir. Enfeksiyonların birden çok defa tekrarlanması daha sık kemoterapötik kullanımına bu da tedavi maliyetlerinin artmasına yol açarken, kemoterapötik madde kalıntılarının suya geçmesi ile birlikte doğal ortamda bulunan su canlılarında birikime neden olmaktadır ve bu canlıların insan tarafında tüketimi insan sağlığını tehdit etmektedir. Nitekim kemoterapötiklerin uzun süre kullanımı hem flora bozukluğuna hemde vitamin noksanlığına neden olarak, balıklarda gelişim geriliğine neden olmaktadır. Ayrıca kemoterapötiklerin immun sistemi üzerinde olumsuz etkileri vardır. Bu nedenle tüm dünyada bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinden çok, korunma hedeflenmiş ve bu hastalıklar için etkin aşılar geliştirilmiştir. Genel olarak aşının pozitif etkileri su ürünleri yetiştiriciliğinde ölüm oranlarını azaltmaktadır (Sommerset, 2014).

Balıklarda uygulanan aşılama metotları, söz konusu olan canlının su içerisinde yaşaması ve intensif yetiştirilmesi nedeniyle diğer kara hayvanlarından bazı farklılıklar göstermektedir. Bununla birlikte balıklarda aşılar enjeksiyon yöntemi başta olmak üzere oral, püskürtme (sprey), immersiyon (daldırma), banyo, hiperozmotik infiltrasyon ve anal intubasyon yoluyla uygulanmaktadır. Bunlardan en etkili enjeksiyon yolu ile aşının uygulanmasıdır. Gerek ikinci derecede etkili olan anal intubasyon yöntemi ile ve gerekse enjeksiyon yöntemi ile binlerce balığı aşılama pratik değildir. Oral yolla verilen aşı ise sindirim kanalında tahribata uğraması veya rezorbe olmaması nedeniyle yeterli seviyede bağışıklık vermemektedir. Şu anda da bakteriyel hastalıklardan korunmada ticari aşılama metodu olarak immersiyon ya da banyo yöntemi tercih edilmektedir.

Vibriozis ülkemizde hem tatlı su hemde deniz balıklarında görülen en yaygın ve önemli hastalıklardan biridir. Etkeni olan *Vibrio anguillarum* (*Listonella anguillarum*) İlk kez 1893 yılında izole edilmiş ve *Bacterium anguillarum* olarak adlandırılmıştır. 1909 yılında *V. anguillarum*, 1986 yılında *Listonella anguillarum* olarak adlandırılmıştır. Vibriozis aşısı ilk defa 1970'li yıllarda Kuzey Amerika kıyılarında görülen *V.anguillarum* ve *V.ordalii* enfeksiyonlarına karşı uygulanmıştır.



Günümüzde ticari olarak hem yerli hem de ithal aşları mevcuttur (Timur ve Korun, 2004; Tanrıkul, 2007; Korun ve Timur, 2008; Çağırğan vd.,2009; Ekici,2010; Türk vd., 2013; Altınok vd., 2015).

Yersiniozis, kızıl ağız adıyla bilinen ve alabalıklarda yaygın görülen hastalıktır. Etkeni olan *Yersinia ruckerii* ilk kez Amerika'da 1950'de Idoha – Hagermann Vadisi'nde izole edilmiştir (Ross vd,1966, Bursch,1982, Ellis, 1988a,b). Ülkemizde ise ilk izolasyon 1991 de yapılmıştır (Timur ve Timur, 1991). Ticari olarak hem yerli hem de ithal aşları mevcuttur (Austin ve Austin, 1999,2007)

Lactococcosis 1974 yılında Japonya'da tespit edilmiştir. Ülkemizde 2001 yılında tespit edilmiştir (Diler vd., 2002; Altun vd., 2004). Etkeni olan *Lactococcus garvieae* (Synonime *Entereococcus seriolicida*)'nin neden olduğu enfeksiyonlar (Streptococcosis veya Lactococcosis) dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki tatlı su ve deniz balığı türlerinde yaygın olarak görülmektedir. Hem yavru hemde Pazar boyu balıklarda önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Ticari olarak hem yerli hem de ithal aşları mevcuttur (Ceschia vd., 1998; Eldar ve Ghittino, 1999; Diler vd., 2002; Eyngor vd., 2004; Salati vd, 2005 Romalde vd., 2004; Kubilay vd, 2008)

Günümüzde virülensi yüksek insan ve hayvan hastalıkları aşılama ile kontrol altına alınabilmektedir. Halbuki balık hastalıklarına karşı geliştirilen mevcut aşılar hala gelişme aşamasındadır. *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum*, *Pasteurella piscicida* ve *Aeromonas salmonicida* bakterileri ile ticari aşılar geliştirilmiştir. Bunlardan vibriosis, yersiniozis, frunkulozis ve pasteurelozis aşıları ticari olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak aşılarda başarı korumanın yüksek olması ve koruma süresidir. Yapılan araştırmalar mevcut aşılarda yarılanma sürelerinin yanısıra etkinliğini artırmak üzere yapılmaktadır. Bu amaçla farklı adjuvantlar ile aşılama denemeleri yapılmaktadır (Sommerset, 2014).

Bir bölgede hüküm süren birkaç hastalığa karşı birden fazla aşı karışımının verilmesi ancak çok duyarlı araştırmaların neticesine göre mümkün olmalıdır. Çünkü aşılarından birisi diğerinden daha çok immunojenik olabilir. Bu nedenle antijenik rekabet sebebiyle daha çok immunojenik olanlar immu sistemi daha etkin olarak

kamçılıdığından diğer aşuya karşı vücudun tepkisi baskı altına alınmış olur. Hangi aşuların bir arada kullanılıp kullanılmayacağına bir kurala bağlama olanağı yoktur. Bu ancak araştırmalarla saptanır. Balıklarda vibrio suşlarına karşı geliştirilmiş polivalan aşular monovalan, bivalan aşılarından daha iyi sonuç vermiştir.

Tek bir aşı ile aşılama yapıldığı zaman, o aşının yapısında bulunan çeşitli antijenlere karşı antikor oluşur. Fakat bu antikorların çok azı koruyucu etkiye sahiptirler. Bu nedenle genelde bağışıklıkta etkin olan antijenler genelde aşı olarak kullanılır. Böylelikle antikor oluşturan sistem yalnızca bağışıklık veren antijenlerle uyarılmış olur. Oysa adjuvant kullanımı aşının etkinlik süresini uzatarak tek seferde uzun süreli koruma imkanı sunarak, çiftliklerde aşı maliyetini düşürme olanağı sağlamayı hedeflemektedir.

İnaktif mikroorganizmaların vücutta çok hızlı şekilde katabolize olmaları, immun yanıtı yeterince uzun süre uyaramamalarına neden olur. Bu nedenle inaktif aşuların etkinliğini arttırmak için, vücutta daha uzun süre kalmalarını sağlayacak ve immunolojik belleği uyuracak şekilde verilmeleri gerekir. Bu amaçla kullanılan maddelere adjuvant denir (Ellis, 1989).

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. Balıklarda immunizasyonda bir çok kimyasal ve biyolojik madde sonradan kazanılan bağışıklığı arttırmak için kullanılmaktadır. Freund's incomplete adjuvant antikor üretimini arttırması ve yüksek immunostimulant etkiye sahip olması nedeniyle balık immunolojisinde genişçe kullanılmaktadır. Ancak bu adjuvantın kullanılması enjeksiyon yerinde nekrotik veya granulatöz lezyonlara neden olmaktadır (Anderson ve Dixon, 1984, Ellis, 1989). Balıklarda etkili olarak kullanılan diğer adjuvantlar arasında banyo yolu ile uygulanan dimethylsulphoxide (DMSO) ve intravenöz enjeksiyonla verilen deniz tunicat (*Ecteinascidia turbinata*) ekstraktı (ETE) bulunur ve bu adjuvantlar ticari olarak kullanılmaktadır.

Vibriozise karşı aşı uygulaması ilk defa 1970'li yıllarda Kuzey Amerika kıyılarında görülen *V.anguillarum* ve *V.ordalii* enfeksiyonlarından korunmaya yönelik olarak

uygulanmıştır. Günümüzde vibriozise karşı geliştirilmiş olan ticari aşuların büyük çoğunluğu inaktif aşulardır. Bu inaktif aşularda, sahada ağır hastalık tablosu oluşturan (patojenitesi yüksek olan) suşlar kullanılmıştır (Toranzo vd., 2005).

İnfeksiyoz hastalıklardan korunmak amacıyla aşı uygulamaları 200 yıl öncesine dayanmaktadır. Balıklarda aşı çalışmaları 70-80 yıllık bir geçmişı olmakla birlikte son 30 yıldır ise çalışmalar büyük gelişme kaydetmiştir. Yapılan son çalışmalar aşuların etkinliği ve koruma süresini artırmaya yöneliktir (Gudding vd.,2014).Vibriozis, yersiniozis ve lactococcozise karşı yapılan çok sayıda araştırma mevcuttur ve bu hastalıklara karşı ticari aşularda geliştirilmiştir. Ancak bu üç patojene karşı karma aşı uygulaması olmadığı gibi koruma süreleri ile ilgili çalışmalarda sınırlı kalmaktadır.

Ayrıca yapılan çalışmalar araştırmacıların ülkelerindeki ekonomik öneme sahip türler üzerinde yoğunlaşmıştır. Ülkemizdeki en önemli türlerden biri olan gökkuşağı alabalığının son dönemlerde bu enfeksiyonlara sıkça maruz kalması da göz önünde bulundurularak aşı çalışmalarının bu etkenler üzerinde denenmesi büyük önem arz etmektedir.

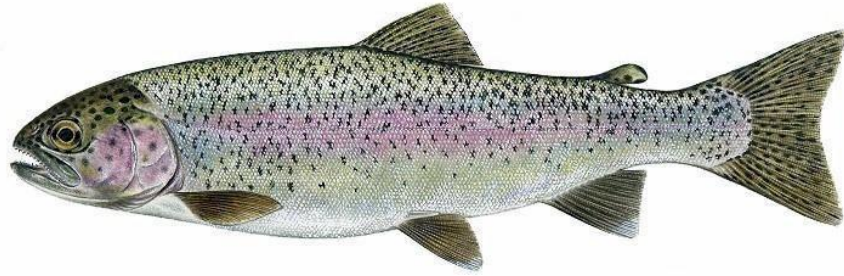
Bu araştırmada, gökkuşağı alabalığına (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) için yersiniozis, lactococcozis ve vibriozis enfeksiyonuna karşı inaktif polivalan adjuvanlı aşuların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada fakültemizde hasta gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae* ve *Vibrio anguillarum*, suşlarından aşı üretimi gerçekleştirilerek, aşının etkinliğinin ve süresinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Gökkuşığı Alabalığı

Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Kuzey Amerika'ya ait bir tür olup 19. yüzyılda Avrupa'ya getirilmiştir. Ülkemizde 1970'li yıllarda başlayan yetiştiricilik çalışmaları günümüzde oldukça önemli gelişmeler göstermiştir (Alpbaz, 2005).

Balıkçılık Derneği balık isimleri komitesi tarafından *Salmo gairdnerii* olarak bilinen gökkuşığı alabalığının bilimsel adı *Oncorhynchus mykiss* olarak değiştirilmiştir (Tippets ve Moyle 1978, Çağıltay, 2011). Gökkuşığı alabalığının vücudu uzun, kısmen basık yapıdadır. Pulları sikloid ve küçüktür (Şekil 2.1). Çok sayıda beneklere sahip yan çizgisi gökkuşuğunu andıran bir renkte olması nedeniyle diğer alabalık türlerinden kolayca ayırt edilebilir. Karın kısmı gümüşü renkte, sırt rengi koyu yeşilden kahve-yeşile değişen bir renktedir. Kuyruk yüzgeci çatallı kuyruk ve yağ yüzgecinde çok sayıda siyah noktalar vardır (Emre ve Kürüm, 2007; Çağıltay, 2011). Gökkuşığı alabalığının sistematikteki yeri Çizelge 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Çizelge 2.1. Gökkuşığı alabalığının sistematikteki yeri

	Gökkuşığı alabalığı
Alem (Regnum)	Animalia
Altalem (Subregnum)	Eumetazoa
İnfraalem (İnfraregnum)	Bilateria
Üstşube (Superphylum)	Deuterostomia
Şube (Phylum)	Chordata
Altşube (Subphylum)	Vertebrata
İnfrşube (İnfraphylum)	Gnathostomata
Üst sınıf (Superclassis)	Osteichthyes
Sınıf (Classis)	Actinopterygii
Alt sınıf (Subclassis)	Neopterygii
İnfrasınıf (İnfraclassis)	Teleostei
Üst takım (Superordo)	Protacanthopterygii
Takım (Ordo)	Salmoniformes
Aile (Familia)	Salmonidae
Altaile (Subfamilia)	Salmoninae
Cins (Genus)	Oncorhynchus
Tür (Species)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> *

\* Integrated Taxonomic Information System

Gökkuşığı alabalığı çevre koşullarına çok iyi adapta olması, aktif yem alması nedeniyle beslemenin kolay olması, diğer alabalık türlerine göre nispeten daha kısa kuluçka süresinin olması, sağım, döl alımı, yavruların yapay yemle beslenmesi ve büyütme işlemlerinin daha kolay ve ekonomik olması, hastalıklara karşı daha dirençli olması yetiştiriciliğinin yaygınlaşmasına sebep olmuştur.

## 2.2. Gökkuşığı Alabalığı Yetiştiriciliği

Gökkuşığı alabalığı, yüksek sıcaklıklara, uygun olmayan çevre şartlarına daha dayanıklı, büyüme hızı daha fazla ve yemden yararlanması daha iyi olduğu için en yaygın yetiştiriciliği yapılan türdür. Ortalama 10-11 ayda porsiyonluk ağırlığa ulaşabilmektedir.

Gökkuşığı alabalığının Türkiye’de yetiştiriciliği ise 1970’li yıllarda kamu ve özel girişimciler tarafından başlatılmıştır. Dünya genelindeki kültür balıkçılığının gelişimine koşut olarak ülkemizde de özellikle üstün yetiştirme avantajları nedeniyle Gökkuşığı alabalığı üretimi büyük aşamalar katetmiştir. Önceleri küçük işletmeler

tarafından gerçekleştirilen Gökkuşığı alabalığı üretimi, 1990'lı yıllardan itibaren entegre üretim tesislerine dönüşmüştür (Yılmaz, 2011).

## 2.3 Alabalıklarda Vibriozis, Yersiniozis ve Lactococcosis Enfeksiyonları

### 2.3.1. Lactococcosis

*Lactococcus garvieae* (=Synonime *Enterococcus seriolicida*) 'nin etken olduğu enfeksiyonlar ( Streptococcosis veya Lactococcosis ) dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki tatlı su ve deniz balığı türlerinde yaygın olarak görülmektedir (Kusuda ve Salati 1999; Chen vd., 2001; Eldar ve Ghittino 1999; Toranzo vd., 1994; Nieto vd., 1995; Salati vd., 1996; Muzquiz vd., 1999; Austin ve Austin, 1999). Ülkemizde ise 2001 yılında ortaya çıkmıştır (Diler vd., 2002, Altun vd., 2004).

Gram pozitif, flagellasız, hareketsiz, sporsuz, tek ya da kısa zincirler oluşturan bir bakteri olan *L. garvieae*, birçok tatlı su ve deniz balığında lactococcosis hastalığının etkenidir. *L. garvieae*'nin neden olduğu Lactococcosis hiperakut ve hemorajik septisemi olarak tanımlanmıştır.

Bu hastalık ilk olarak Japonya'da 1958 yılında hasta gökkuşığı alabalıklarında enterokok cinsi bakteriler tarafından oluşturulan bir olgudan izole edilmiştir. Avrupa'dagökkuşığı alabalıklarında ilk salgın 1988 yılında İspanya'da ortaya çıkmıştır. Ülkemizde hastalığın ortaya çıkışı 2001 yılında Muğla bölgesindeki alabalık işletmelerinde olmuştur (Diler vd, 2002). *L. garvieae*, gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde özellikle su sıcaklığının 15°Cve üzerine çıktığı dönemlerde (su kalitesi ve işletmedeki hijyen şartlarının iyi olmadığı durumlarda) ciddi kayıplara neden olmaktadır (Altun vd, 2004).

Gökkuşığı alabalıklarında her boyda (porsiyonluk ve anaçlar dahil) yüksek mortaliteye neden olması sebebiyle balık işletmelerinin ekonomik kayıpları büyük olmaktadır. Hastalığın, antibiyotik kullanılarak önlenmesi ise tedavi sonrası oluşacak stres koşullarında enfeksiyonun nüks etmesi sonucu sınırlı olmakta ve antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir. Ayrıca antibiyotik kullanımı bağışıklık sisteminin baskılanmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle bu hastalığa karşı mücadelede en etkili

yöntem aşılama yapmaktır (Eldar vd., 1997). İşletmelerde hastalıktan korunmada en etkili yol; optimum yetiştiricilik şartları, gerekli hijyenik tedbirler sağlanarak ve hastalık ortaya çıkmadan önce balıkların immunizasyonudur.

### 2.3.2. Yersiniozis

Enterobakterilerin karakteristik özelliğini gösteren Gram negatif bakteriyel balık patojenidir. Bu patojen gökkuşağı alabalıklarında akut bakteriyel bir enfeksiyon olan enterik kızıl ağız hastalığına (ERM) neden olmaktadır. ERM hastalığının etkeninin izolasyonu 1950 yılında Rucker tarafından yapılmış ve bu etken Ewing (1978) tarafından identifiye edilerek *Yersinia ruckeri* olarak isimlendirilmiştir.

*Yersinia ruckeri*, özellikle solmonlarda septisemik karakterli akut veya kronik seyir gösteren yersiniozise (enterik kızıl ağız hastalığına) neden olur. Tüm dünyada çok geniş bir yayılım gösterir (Austin ve Austin 1999). Fakat gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) hastalıktan en fazla etkilenen türdür. *Y. ruckeri*'nin ülkemizde ilk defa, 1991 yılında Denizli ve İzmir'deki işletmelerden izole edildiği bildirilmiştir (Çağırğan ve Yürekli Türk 1991; Timur ve Timur 1991).

Yersiniozis, balık nakilleri, rezervuar canlıların rolü (salmonid olmayan balıklar, su samuru, hindi, yer solucanı, misk faresi, kerevit, martı) ve koruyucu önlemlerin (hijyenik tedbirler, aşılama) alınmaması nedeniyle işletmelere hızla yayılarak alabalık yetiştiriciliğinin en önemli sorunlarından biri haline gelmiştir. Doğal enfeksiyonlarda ölümler, patojene maruz kaldıktan 5-19 gün sonra başlar, alınan patojenin miktarına göre, 30-60 gün devam eder. Etken bu balıkların dışkılarıyla suda yayılım göstererek diğer balıklarda enfekte eder. Hastalığın seyri 15 – 18 °C su sıcaklığında en yüksek seviyeye çıkarken, 10 °C ve daha altındaki sıcaklıklarda ise balıklarda klinik belirtiler görülmez (Altun, 2001).

### 2.3.3. Vibriozis

Vibriozis, *Vibrio* türlerinin neden olduğu bir bakteriyel hastalık olup hemen hemen tüm dünyada kültür balıkçılığı yapan işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olan bulaşıcı bir hastalıktır. Etken Vibrionaceae familyasına ait *Vibrio* türlerinden olup, en önemli türü *Vibrio(Listonella) anguillarum*'dur (Austin ve Austin, 1999; Toranzo vd., 2005). Ilık su hem de soğuk su balık türlerinde görülen ve hemorojik septisemiye neden olan bir etkidir (Toranzo vd., 2005). *V. anguillarum*'den fazla balık türünde hastalığa neden olur. Bu bakteriyel hastalığın dominant türü olması nedeniyle diğer *Vibrio* türleri de bu hastalıkta rol oynar (Akaylı, 2001).

Vibriozis ülkemizde de deniz balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerde özellikle levrek ve son zamanlarda gökkuşuğu alabalığı yetiştiriciliği yapan işletmelerde ciddi kayıplara neden olan bakteriyel bir hastalıktır (Çağırğan, 1993; Akaylı, 2001; Ekici vd., 2005). Ülkemizde tatlı suda kültürü yapılan alabalıklarda ilk defa 2000 yılında bir kuluçkahanede yetiştirilen yavru alabalıklarda görülmüştür. Hastalığın oluşmasının nedeni olumsuz çevre koşulları ve strestir. Etken deri, solungaç ve anüs yoluyla vücuda girmektedir. Enfekte gıdaların ağız yoluyla verilmesiyle hastalık bulaşmaktadır. Bu nedenle taze yemler pastörize edilmelidir. Tatlı sularda 1- 4 °C gibi düşük sıcaklıklarda da görülebilir. Ağır metaller vücut yüzeyindeki mukusu denatüre etmesi nedeniyle hastalığın ortaya çıkışını kolaylaştırır. Bu nedenle  $CuSO_4$  uygulamaları vibriozis salgınlarında patlamalara neden olmaktadır. Hastalık deniz balıklarında olumsuz çevre koşulları ve stres varlığında % 40-60'lara varan mortaliteye neden olmaktadır. Salmonidlerde ise mortalite oranı % 90' a kadar çıkabilmektedir (Austin ve Lee 1992).

### 2.4. Balıklarda Bağışıklık Sistemi

Balıklarda bağışıklık sistemi doğal (spesifik olmayan) ve kazanılmış (spesifik) bağışıklık olarak iki ana grupta sınıflandırılabilir (Kav ve Erganiş 2007). Balıkların bağışıklık sistemi, bazı farklılıklara rağmen, yüksek omurgalılar ile fizyolojik olarak benzerlik göstermektedir. Balıklar yüksek omurgalıların aksine, yaşamlarının erken



embriyonik aşamalarından itibaren serbest yaşayan organizmalardır ve hayatta kalmak için doğal bağışıklık sistemine bağımlıdırlar. (Rombout vd., 2005).

Tüm omurgalılarda olduğu gibi, balıklarda da hücrel ve humoral bağışıklık tepkileri ve ana fonksiyonu bağışıklık savunmasında yer alan merkezi organlar bulunur. Balıklar ve memeliler bağışıklık fonksiyonuyla ilgili bazı benzerlik ve farklılıklar göstermektedir (Çizelge2.2). Vücut kompartmanlarına ve hücre düzenine bağlı farklılıkları dikkate alarak, memelilerde bulunan jeneratif ve sekonder lenfoid organların çoğu, lenfotik nodüller ve kemik iliği hariç, balıklarda da bulunur. Bunun yerine, ön böbrek, aglomerüler, hemopoietik işlevler üstlenir ve yüksek omurgalıların aksine melanomakrophajik merkezler yoluyla IgM ve bağışıklık hafızasının fagositoz, antijen işleme ve oluşumundan sorumlu ana bağışıklık organıdır (Tort vd., 2003).

Çizelge 2.2. Gerçekçeneli balıklar (Gnathostomata) ve memeliler arasındaki immun sistem farkları

		<b>Gerçekçeneli balıklar (Gnathostomata)</b>	<b>Memeliler</b>
<b>Biyotik Faktörler</b>	<b>Sıcaklık aralığı</b>	-2°C /35°C	36,5°C /37,5°C
	<b>Öncül çevre</b>	Su	Hava
	<b>Metabolizma</b>	Poikilotermik (Bazı balıklarda Endotermik)	Homotermik
	<b>Humoral Çeşitlilik</b>		
	<b>Ig tipleri</b>	IgM, IgD (Teleostei) IgM, IgX/IgR, IgW (Chondrichthyes)	IgM, IgA ,IgD, IgE, IgG
	<b>Ig gen düzenlenmesi</b>	Çokluküme ( bazı Teleostei ve Chondrichthyes)	Translokon
	<b>Non-spesifik çeşitlilik</b>	birkaç C3 izoformu (Teleostei)	C3 izoformu yok
<b>Genel performans</b>	<b>Antikor afinitesi</b>	Düşük	Yüksek
	<b>Antikor yanıtı</b>	Yavaş	Hızlı
	<b>Hafıza yanıtı</b>	Zayıf	Güçlü
	<b>Afinite olgunlaşması</b>	Düşük ya da Eksik	Yüksek
	<b>Düşük Sıcaklık</b>	Yüksek bağışıklık, immunsupresif yanıt (sadece Poikilotermik balıklarda)	Düşük bağışıklık
<b>Lenfoid Organlar</b>	<b>Hematopoetik doku</b>	Önböbrek (Teleostei) Epigonal ve Leydig organları, Meningeal doku, orbital ve subcranial hematopoetik doku (Chondrichthyes)	Kemik iliği
	<b>Timus</b>	Türe bağlı mevsimsel ve hormonal değişikliklerden etkilenir	Yaşa göre etki gösterir
	<b>Lenfoid düğümler</b>	Yok	Var
	<b>Bağırsak bağlantılı lenfoid dokular (GALT)</b>	Organize değil, lenfoid agregatlar, Leydig organı ve spiral vana (Chondrichthyes)	Organize, Payer plakları
	<b>Germinal merkez</b>	Yok	Var

#### 2.4.1. Bağışıklık sisteminin ontogenezi

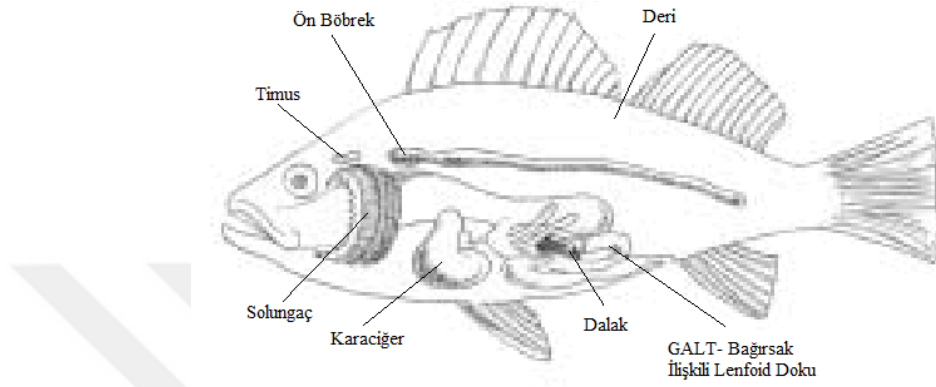
Ontogenezi bir organizmanın döllenmiş yumurtadan veya zigottan başlayarak ergin ve olgun bir foruma gelinceye kadar embriyonel safhalarda geçirdiği değişimleri ve gelişimleri tanımlamaktadır. Balık immün sistemi olgunlaşmasının analizinde, balıkların patojenlere cevap vermesine ve aşı ile korunmaya erişmesine izin veren immüno uygunluğun durumunun belirlenmesinde önemli bir sorundur (Uribe vd, 2011).

Teleost balıklarının bağışıklık sisteminin ontogenezi gökkuşağı alabalığı, yayın balığı (*Ictalurus punctatus*), zebra balığı (*Danio rerio*) ve orfoz (*Acanthistius brasilianus*) da dahil olmak üzere çeşitli türlerde incelenmiştir. Teleostlar, hematopoezin ilkel modelleri olarak tanımlanmış, ilk hematopoietik organa intermediate hücre kütlesi (ICM) adı verilmiştir. Afrika Killifish balığı (*Pseudepiplatys annulatus*) ve gökkuşağı alabalıklarında yumurta sarısı kesesinde kısa bir süre için hematopoez mevcuttur ve daha sonra ICM'ye geçer (Zapata vd. 2006). Bağışıklık tepkisine katılan organların gelişimiyle ilgili olarak n böbrek ve timus, gökkuşağı alabalığı ve Atlantik somon balıklarında kuluçka başlamadan önce tamamlanmış olarak kabul edilir (Razquin vd. 1990); buna karşın ipura (*Sparus aurata*), orfoz ve kalkan (*Scophthalmus maximus*) balıklarında dahil birçok deniz türünde inkübasyonun sonunda bu netlik kazanılmamıştır (Uribe vd, 2011). Farklı teleostlarda, her türdeki gelişim evrelerini belirlemek için kullanılan farklı yöntemler ve bu aşamaların sıcaklık, fotoperiyod ve benzeri çevresel parametrelere bağımlılığı nedeniyle, somut, ortak bir bağışıklık sistemi gelişimi modeli oluşturmak zordur (Iwama ve Nakanishi, 1996). Bu farklılıklara rağmen, deniz teleostlarındaki lenfomiyeloid organ gelişim sırası şoyledir: böbrek, dalak ve timus ancak larval dalak, lenfopoetik fonksiyona göre daha fazla eritropoetik fonksiyona sahiptir (Schroder vd., 1998).

Lenfositlerde IgM'nin ilk ortaya çıkışı balık türleri arasında oldukça farklılık göstermektedir (Magnadottir vd., 2005). Bununla birlikte, B-lenfositleri ve immünoglobulinlerin ilk ortaya çıkışı, tatlı su türlerine kıyasla deniz türlerinde daha geç ortaya çıkmaktadır ve IgM ilk ortaya çıktığında larvalar yaklaşık 20-30 mm uzunluğa ulaşmıştır. Benekli wolfish (*Anarhichas minor*, Olafsen) balıklarının döllenmemiş yumurtalarında anneden transferi kanıtlayan kompleman bileşeni C3 bulunmuştur (Uribe vd, 2011).

## 2.4.2. Balıklarda lenfoid organlar

Timus, böbrek (ön ve orta) ve dalak, teleostlarda en büyük lenfoid organlardır.



Şekil 2.2. Balıklarda lenfoid organlar

### 2.4.2.1. Timus

Bu organın iki lobu vardır, homojendir ve operkulumun dorsal komissüründe subkutanöz olarak düzenlenmiş ve farengeal epitelin mukoza dokusu ile örtülmüş ince bir oval lenfoid doku tabakası ile temsil edilmektedir. Balık timusunu karakterize eden yapı, lenfoid kabuğu dokusunu çevreleyen bir kapsüldür. Temel olarak, timus, T hücrelerinin kapsüllenmiş çoğalmasını destekleyen makrofajların bir birleşmesi olarak düşünülebilir (Davis vd 2002). Timus yapısının farklılaşması, teleostlarda oldukça değişkendir ve birçok türde, yüksek omurgalılarda bulunan korteks ve medulla arasındaki farklılığı gözlemlemek mümkün değildir (Bowden vd, 2005). Ayrıca, bu organda miyeloid hücreler ve eozinofilik granüler hücreler bulunur. Timus, T hücrelerinin üretiminden sorumludur (Uribe vd, 2011). Timusun balıktaki inversiyonu, hormonal döngülere ve mevsimsel değişimlere daha fazla bağlıdır. Kan filtrasyonu ve eritrositik yıkım, elipsoid kılcal damarlara bağlı makrofajların birikmesiyle oluşan melanomakrophajik merkezler tarafından gerçekleştirilir. Bu merkezler antijenleri uzun süreli immün kompleksler olarak tutabilirler (Tort vd, 2003).

#### **2.4.2.2. Böbrek**

Teleost balıklarındaki böbrek, omurgalılarda kemik iliğinin eşdeğeri ve yetişkinliğe kadar olan en büyük hematopoez alanıdır (Zapata vd. 2006). Gökkuşığı alabalığındaki böbrek, kuluçkadan sonra, özellikle kırmızı kan hücreleri ve granülositleri üretiminde iyi gelişmiştir. Yapılan çalışmalarda döllenmeden 12 ila 14 gün sonra IgM salınan lenfoid hücrelerin varlığını göstermektedir (Castillo vd., 1993) ve inkübasyon periyodunun sonundan sekiz gün önce embriyolarda ELISA ile IgM'nin iki varyantı da tespit edilmiştir (Sanchez vd, 1995). Bu bulgu, B hücrelerinin bir kaynağının böbrekte veya diğer hematopoietik alanlarda kuluçka döneminin bitiminde önce bulunduğunu ileri sürmektedir. Yapısal olarak anteriör böbrek, lenf dokusu için destek sağlayan bir retiküler lif ağından oluşur ve sinüsal retiküloepitelyayı hizalayan hematopoietik sistem hücreleri arasında dağılmış olarak bulunur. Anterior böbrekte bulunan ana hücreler, melanomakrofaj merkezleri (MMC'ler) ve lenfoid hücreler olarak adlandırılan ve tüm gelişme evrelerinde bulunan ve çoğunlukla Ig + hücreleri (B hücreleri) olarak bulunan makrofajlardır (Press vd., 1994). Retiküler hücreler, lenfoid hücrelerin fonksiyonu için gerekli etkileşimlerin sağlanmasında ve sinüzoidlerin endotel hücrelerinde önemli bir rol oynamaktadır. İkinci sistem, endositozu gerçekleştirme kabiliyeti nedeniyle kan filtrelemesinin ana bileşenidir (Danneving vd, 1994; Uribe vd, 2011). Balıkta böbreğin kendine özgü bir özelliği vardır: ön böbrek aynı zamanda memeli adrenal bezleri ile homolog olan, kortikosteroidleri ve diğer hormonları salgılayan önemli bir endokrin organdır. Böylelikle, önemli düzenleyici işlevler ve bağışıklık-endokrin etkileşimleri ve hatta nöroimmunoendokrin bağlantılar için merkezi bir organdır (Tort vd, 2003).

#### **2.4.2.3. Dalak**

Dalak, elipsoidleri, melanomakrofaj merkezleri (MMC) ve lenfoid doku sisteminden oluşmakta ve çoğu türde, elipsoidler birlikte kümelenecek diğer iki bileşenin çevresinde düzenlenmiştir (Ferguson, 1989). Elipsoidler, pulpa içinde açılan ve splenik arteriollerin bölünmesinden kaynaklanan kalın duvarlı kılcallardır. Duvarlardaki hücreler, antijenlere ait makrofaj fagositozuna aktif olarak katılmaktadırlar. Genellikle antikorlar veya metabolik ürünler şeklinde antijenler,

immünolojik hafızada önemli bir role sahip olan uzun süre gözlemlenebilmektedir. Zebra balıklarında dalak, döllenen sonraki 30 gün içinde büyük miktarda eritroblast içeren küçük bir organ olarak kalarak sonraki üç ayda, lenfoblastlar dalakta görüldüğünde, ortaya çıkan elipsoidler antijenin tutulmasında yer almaktadır. Atlantik somon balığı, orkinos ve yayın balığı gibi diğer balıklarda da benzer bir gelişim paterni tanımlanmıştır (Tort vd, 2003, Uribe vd.,2011).

#### **2.4.3. Kazanılmış (Spesifik) bağışıklık**

Spesifik bağışıklık tepkisi, vücudun yüksek özgünlük ve afiniteye sahip antijenlere, antikora ve efektör hücrelere spesifik olarak cevap vermesi için gerekli araçları sağlayan özel hücreler, proteinler, genler ve biyokimyasal mesajlar içeren karmaşık bir ağ içeren mekanizmalar yoluyla oluşur.

##### **2.4.3.1. Antikorlar**

Teleostlarda baskın olan immünoglobülin, IgM sınıfının bir tetrameri olup sekiz antijenik birleştirici bölge içerir (Acton vd, 1971). Gökkuşuğu alabalığındaki monomerik ve tetramerik IgM'nin bağlanma afiniteleri benzerdir, ancak tetramerik IgM molekülünün bir kısmındaki yapısal bir farklılığa bağlı olarak kompleksi monomerik formdan daha etkin bir şekilde aktive eder (Elcombe vd, 1985). IgD balıklarda tanımlanan ikinci immunoglobulin izotipidir. B hücrelerindeki ekspresyonu ve IgM geninin hemen altındaki konumu ile memelilerdeki IgD ile sekans benzerliği gösterir. Dahası, salmonidlerin serumundaki IgM konsantrasyonu, diğer teleostlara (Japon yılanbalığı, cyprinidler ve bazı Perciformes türleri) göre oldukça düşüktür. Teleost antikorları deride, bağırsakta, solungaç mukusunda, safrada, ve plazmada sistemik olarak bulunur. Deride ve solungaçların bağışıklık önemlidir, çünkü bu organlar çevreyle doğrudan temas halindedir. Spesifik antikorlar mutlaka sistemik bir yanıt üretmeksizin deride, bağırsakta ve solungaçlarda üretilebilir (Uribe vd., 2011).

### **2.4.3.2. İmmünolojik hafıza**

Balık, ikinci bir antijen maruziyetinden önce bellek tepkisi geliştirir. Gökkuşuğu alabalığı aynı antijene ilk kez maruz bırakıldıktan sonra, her iki T lenfositin suboptimal dozlarına antijen bağımlı ve bağımsız bir şekilde tepki verir. Balık, T'ye bağlı antijenlere ikinci kez tepki vermeden önce iki maruz kalmanın kayda değer olduğunu, oysa T'den bağımsız antijenin yalnızca bir dozlamayı gerektirdiğini belirtilmiştir. Buna ek olarak, yanıt daha hızlıdır ve birincil yanıtta daha büyük boyutta iken, dalaktaki antijene spesifik B hücrelerinin sayısı, B hücrelerine spesifik antijen prekürsörlerinin frekansı ile doğru orantılıdır. Bu bulgu, sekonder yanıtın bellek B hücrelerinin genişlemesinden kaynaklandığını ve antikordaki spesifik bir farklılığın olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, antijenin optimal olmayan seviyelerine cevabı belki de yüksek afiniteli reseptörlü B hücrelerinin bellek B hücreleri olarak seçildiğini göstermektedir (Arkoosh ve Kaattari, 1991; Morrison ve Nowak, 2002).

### **2.4.3.3. Spesifik bağışıklıkta yer alan sitokinler**

Sitokinler, balıklarda adaptif bağışıklıkta ve yakın geçmişte teleostlarda CD4 bulunmasıyla tanımlanmıştır; bu sitokinler, T hücresi alt gruplarının aktivasyonunu ve farklılaşmasını farklı sitokin repertuarlarını serbest bırakmak için yönlendiriyor gibi görünmektedir. Th1 hücre farklılaşmasını potansiyel olarak sürdürebilen tip I ve tip II interferonlar (IFN) mevcut olup, IFN-g ile birlikte tamamen Th1 yanıtlarının IL-12, IL-15 ve IL-18 ile efektör olmasını sağlamaktadır. Th2-tipi sitokinlerle ilişkili olarak, yakın zamanda IL-4'ün bir homologu olduğu iddia edilen bir molekül bulunmuştur; ancak bilinen omurgalı IL-4 genleri ile bariz bir benzerliği yoktur. Bununla birlikte, Th2 hücre farklılaşmasını yönlendiren transkripsiyon faktörünün varlığı, Th2 yanıtlarının balıkta var olabileceğini düşündürür, ancak bunun kanıtlanması gereken bir husustur. Son olarak, IL-10 ve TGF- $\beta$  balıklarda bulunur ve bu nedenle potansiyel T düzenleyici hücrelerin efektörlerini oluşturabilir (Uribe vd, 2011).

#### 2.4.3.4. Bağışıklık yanıtı üzerindeki çevresel etki

Balıkların bağışıklık sistemi ve tepkisi sıcaklık, ışık, su kalitesi, tuzluluk ve farklı stres indükleyicileri gibi çeşitli dış faktörlerden büyük ölçüde etkilenebilir. Balıkların poikilotermik doğası gereği önemli olan sıcaklık düşüşleri, fizyolojik işlevlerinin hızını etkiler (Hayward vd, 2009). Gökkuşaağı alabalığında, fotoperiyodun, artan gündüz saatlerinin neden olduğu dolaşımdaki lökosit sayısındaki bir azalma yoluyla bağışıklık tepkisini etkilediği de gösterilmiştir. Fotoperiyodun bir artışı, lizozim aktivitesinde ve dolaşımdaki IgM düzeylerinde artışlar da oluşturabilir. Dahası, çevredeki oksijen seviyeleri bağışıklık tepkisini modüle edebilir; Hipoksi, makrofajların solunum patlama aktivitesini baskı altına alır ve dolaşımdaki antikor düzeylerini düşürür ve bu da hiperoksi ile yükselir (Watts vd, 2001; Bowden, 2008).

Öte yandan, balık ortamındaki askıda katıların artan seviyeleri, solungaçların oksijeni yakalamadaki yeteneğini telafi etmek için hematokrit seviyelerini yükseltmeye yardımcı olur. Bu faktör, parçacıklar açısından zengin bir ortamda beklenen yüksek seviyede patojenlere yanıt olarak lizozim aktivitesini ve dolaşımdaki IgM düzeylerini de artırır. Tuzluluk artışı, litik enzimlerin aktivitesini, makrofajların solunum patlamasını ve dolaşımdaki IgM düzeylerini arttırarak bağışıklık parametrelerini de etkiler. Bununla birlikte, bu değişikliklerin tuzluluk ile ilişkilendirilmesinin nedeni şu an bilinmemektedir, ancak bazı araştırmacılar, tuzluluk seviyelerindeki artışların ortamdaki patojen yükünü arttıracağını ve daha elverişli bir ozmotik ortam yarattığını önermektedir (Bowden, 2008).

Çevresel pH seviyelerindeki değişiklikler, dolaşımdaki lizozim ve IgM seviyeleri gibi bağışıklık sistemi parametreleri için çelişkili sonuçlar ortaya koymaktadır. Ekosistem oluşturma ve üretim yönetimi ile ilişkili nüfus yoğunluğunun bir sonucu olarak balıklarda stres, dolaşımdaki kortizol düzeylerini artırabilir, spesifik bağışıklıkta bir düşüş meydana getirir ve bu nedenle balıkları fırsatçı patojenlere yatkındır (Uribe vd., 2011).



## 2.5. Balıklarda İmmünizasyon

Balıklar poikilothermal canlılardır, bu nedenle aşılama yaklaşımları aşılardan türü, aşılacak balık türleri, aşılamadan sonra immün yanıtın artırılması için oral veya intraperitoneal uygulama, uygulama protokolüne özel bir odaklanma gerektirir (Muktar vd, 2016).

Balıklarda antibiyotik direncinin artması nedeniyle, mevcut aşılardan etkinliğinin artırılmasının yanı sıra ileri aşılardan geliştirilmesi ve üstün immünomodülatör diyetin sunulması konusunda önemli ilerleme kaydedilmiştir. Şu anda, kültür balıkçılığında aşı kullanımı, hormon, ilaç ve antibiyotik kalıntılarından kaynaklanan olumsuz etkilerin üstesinden gelmekle birlikte insan sağlığı üzerinde potansiyel yararlı etkiler göstermiştir (Meeusen vd, 2007).

Gudding ve Van Muiswinkel (2013), ilk balık aşılardan kullanımına 1938'de Snieszko vd, tarafından sazandaki *Aeromonas punctata*'ya karşı uygulandığını bildirmiştir. Laboratuvarında öldürülmüş bakteri ile enjeksiyondan sonra balıklarda koruyucu bağışıklık uyarıldığını bildirmişlerdir. Bu yenilikten sonra Amerika Birleşik Devletleri'nde balık aşılama, balık hastalıklarında uygulama ve balık sağlığı yönetimi konularında çalışmalar ilerlemiştir.

Balıkların aşıyla bağışıklanması ile ilgili ilk rapor Duff tarafından kaydedildi ve kloroformla öldürülmüş *Aeromonas salmonicida* bakterisini içeren bir diyet ile beslenen alabalıklarda, furunküloza karşı korumayı arttırdığını ortaya koymuştur (Duff, 1942). *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum*'a karşı ilk aşı, 1970'li yıllarda geliştirilmiş ve 1980'lerin başlarında ticari su ürünleri yetiştiriciliğine dahil edilmiştir (Dadar, 2016).

Daha sonra 1990'dan itibaren bakteriyel aşılardan rutin olarak kullanılmış ve bu da su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotik uygulamasının azaltılmasına olanak sağlamıştır (Brudeseth vd, 2013). *Salmon salar* ve *Oncorhynchus mykiss*'teki Pankreas hastalığının (PD) etken maddesi olan salmonid alfa virüsü (SAV) olarak da bilinen Salmon pankreas hastalığı virüsüne (SPDV) karşı aşılama etkili bulunmuştur. Aşılamadan sonra, aşılanmış balıklarda PD'nin mortalite ve salgın insidansı da azalmıştır. Şimdi, aşılardan 17'den fazla balık türüne erişebilir ve 40'tan fazla ülkede

22'den fazla farklı türde bakteri hastalığının yanı sıra 6 viral hastalık için koruma sağladığını bildirmiştir (Dadar, 2016).

Balıklarda aşılamanın sıkı bir şekilde uygulanması için, balık çiftliğinde aşılardan sonra üretilen koruyucu bağışıklığın süresini ve yoğunluğunu değerlendirmek için tam bir balık immün yanıtı bilgisi gereklidir. Araştırmalar, interferon üretimine neden olan interferon yanıtı genlere (IRG'ler) dayanan doğal immünitinin, balıklarda viral enfeksiyonlarla karşılaşmada birincil rol oynadığını bildirmiştir. Ayrıca, IRG'ler önemli anti-viral aktiviteden sorumludur ve bunlar, teleostlar da dahil olmak üzere farklı balık ailelerindeki evrim sırasında bile korunmuş gen kümeleridir (Langevin vd, 2013).

Balık aşılı son yıllarda iki, üç, dört ve beş farklı antijen karışımından oluşmaktadır. Bu tür polivalan aşılı bağışıklık sisteminde daha geniş ve karmaşık bir antijenler dizisi oluşturur. Tüm antijenlerin koruyucu bir bağışıklık tepkisini teşvik etmesi, ancak antijenlerin bağışıklığın birbirlerine göre değişmesi ve sınırlı bir kapasitede olması, karışımları güvenli ve etkili ticari ürünler haline gelmesinde önemlidir. Balıkların çoklu antijenlere cevap verme kapasitesi, konakçı türleri ve yaşı, su sıcaklığı, uygulama yolu ve zamansal hususlar dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Aşılı antijenik ve antijenik olmayan bileşenlerinin sinerjik veya antagonistik olarak etkileşebileceği ve spesifik antijenlere karşı bağışıklık tepkisini uyarabildiği, çapraz reaksiyona girdiği, inhibe ettiği veya bastırabileceği yönünde değişik bilgiler mevcuttur (Busch, 1996).

Aşılama, su ürünleri yetiştiriciliğinde bulaşıcı hastalıkları önlemenin en etkili ve ekonomik yollarından biridir. Bununla birlikte, etkili aşılı gelişimi, özellikle farklı patojenlerin bir arada olduğu polivalan aşılı için halen sınırlıdır. Bu bağlamda, polivalan aşılı olarak görev yapan polivalan koruyucu immünojenler tanımlanması, aşılı geliştirmede önemli bir adım olmuştur.

## 2.6. Ticari Bakteriyel Aşılar

Dünyada en az 18 bakteriyel hastalığa karşı ticari aşı geliştirilmiştir. Ticari aşılar üç uygulama metodu yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle banyo ile başlar bunu oral veya banyo takip eder, son olarak balıklara enjeksiyon aşısı yapılmaktadır. Bununla birlikte Şili'de piscirickettsiosis enfeksiyonuna karşı enjeksiyon aşısından sonra oral aşı uygulanmaktadır. Aşı rapelleri banyo ya da oral uygulanması iş gücünü azalttığı gibi streside azaltmaktadır. İmmersiyon uygulamaları deniz levreklerinde vibriosis ve pasteurellozise karşı uygulanmaktadır (Brudeseth vd., 2013).

► Küresel yetiştiricilik değeri yüksek sanayileşmiş salmonid türleri olarak Atlantic salmon, coho salmon, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ve ayu (*Plecoglossus altivelis*) bulunmaktadır. Bu türlerde görülen hastalık tipleri farklı olduğu gibi farklı bölgelerde şiddeti ve oluşumu da farklıdır. Çizelge 2.3' te aşılar, farklı kullanımı, uygulanan aşılama stratejileri listelenmiştir.

Çizelge 2.3. Anadrom ve tatlı su alabalık için piyasada mevcut ticari lisanslı aşilar ve antijenlerin özeti.

Tür	Bölge	<i>A.salmonicida</i>	<i>V.anguillarum</i>	<i>V.salmonicida</i>	<i>V.ordalii</i>	<i>M.viscosa</i>	<i>Y.ruckeri</i>	<i>P.salmonis</i>	<i>R.salmoninarum</i>	<i>F.columnaris</i>	<i>L.garvieae</i>	IPNV	ISAV	PDV	IHNV
Atlantik salmon	Norveç	Enj	Enj	Enj		Enj	İm					Enj	Enj	Enj	
	Faroe Adaları	Enj	Enj	Enj		Enj	İm					Enj	Enj		
	Şili	Enj			Enj		İm	Enj, oral				Enj, oral	Enj, oral		
	İngiltere	Enj										Enj		Enj	
	İrlanda	Enj										Enj		Enj	
	Kuzey Amerika	Enj, im	Enj, im	Enj			İm		Enj				Enj		Enj*
Alabalık	Norveç	Enj	Enj	Enj		Enj									
	Avrupa	Enj	Enj, im, oral				Enj, im, oral				Enj				
	Şili	Enj			Enj		İm	Enj, oral				Enj, oral			
	Kuzey Amerika	Enj, im	Enj				İm		Enj	İm					
	Japonya		İm												
Gümüş salmon	Şili	Enj			Enj		İm	Enj, oral				Enj, oral	Enj, oral		
	Japonya		İm												
Ayu balığı	Japonya		İm												

Enj = Enjeksiyon aşısı, İm = İmmersiyon aşısı, Oral = Oral Aşısı.

Enj\* = DNA aşısı

Gökkuşığı alabalığının iç sularda ve deniz suyunda üretimi yapılabilmektedir. Gökkuşığı alabalığının, Avrupa, Kuzey Amerika, Şili, Japonya ve Avustralya'da üretim alanları bulunmaktadır. Tatlısu gökkuşığı alabalığı üretimi karşı en sık kullanılan mevcut lisanslı aşılarda: furunculosis (*A. salmonicida*), vibriosis (*L. anguillarum* ve *V. ordalii*), kış ülseri (*M. viscosa*), yersiniozis-ERM (*Y. ruckeri*), lactococcosis (*L. garvieae*), flavobacteriosis (*F. columnare*), piscirickettsiosis (*P. salmonis*) ve IPN aşılardır (Brudeseth vd., 2013).

## 2.7. Balık Aşılarında Kullanılan Bazı Adjuvantlar

Adjuvant Latince de yardımcı olmak anlamına gelen adjuvare den köken alır ve geleneksel olarak, bir aşının uyarlanabilir bir tepkisinin büyüklüğünü artıran yardımcı maddeler (potens) veya enfeksiyon ve ölüme önleme yeteneği (etkinlik) olarak tanımlanmıştır. Ancak günümüzde bilim insanları, adjuvanların, spesifik bir patojene karşı adaptif tepki tipini yönlendirmesi bakımından daha önemli olabileceğini kabul etmişlerdir. Bu nedenle, adjuvanlar şimdi bir antijenin iç immünojenitesini modüle edebilen yapısal olarak heterojen bir bileşikler grubu olarak tanımlanmıştır (Tafalla,2013).

Enjeksiyon aşılarının kullanımı, su ürünleri endüstrisindeki bulaşıcı hastalıkların kontrolünde anahtar rol oynamaktadır. 1990'dan beri, yağ bazlı adjuvantlı aşılarda, mevcut en yaygın ve en etkili aşılardır. Bununla birlikte, büyümede gecikme, pigmentasyon ve bağırsakların yapışması gibi yan etkilere sahip olan adjuvantların olumsuz yan etkileri önlemede önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, yeni adjuvanlar aramaya başlamıştır. Deneysel aşılarda, beta-glukanlar, polinosinik polisiktrilik asit (poli I: C), CpG, flagellin ve kapsül içine alınmış sitokinler gibi immüno-uyarıcıları içermektedir. Aşıların biyolojik olarak parçalanabilen poli (laktik-ko-glikolik asit (PLGA) içinde kapsüllenmesi özellikle ilgi çekicidir (Bøgdal ve Dalmo,2012).

### 2.7.1. Beta-glukan

Beta-glukanlar, beta-glikosidik bağlarla bağlı D-glukoz monomerlerinin polisakaritleridir. Tahıllarda, mayada, mantarlarda, deniz yosunlarında ve bazı

bakterilerde bulunan değerli bir diyet lifi kaynağıdır. Kimyasal olarak beta-glukanlar, lineer zincirlerde tekrarlayan glikoz kalıntıları olan nişasta olmayan polisakaritlerdir veya glikoz üniteleri, elde edildiği kaynağa bağlı olarak birkaç şekilde dallanmış halde çoğaltılmış dallanmış yapılardır.

Beta-glukanlar, bira mayası *Saccharomyces cerevisiae*, mantar ve bazı bakterilerin hücre duvarlarının ana yapısal bileşenleridir. Kaynağa bağlı olarak, çözünlükleri, moleküler kütleleri, üçüncül yapıları, dallanma dereceleri, polimer yükleri ve çözelti şekilleri arasında beta-glukanlar arasında belirgin farklılıklar vardır ve bunlar immün modüle edici etkilerini değiştirmektedir (Bohn ve BeMiller, 1995; Eccles, 2005). Buna göre, beta- (1, 6) dallanması olan bir beta- (1, 3) zincirine sahip olan beta-glukanlar, yalnızca beta- (1, 3) doğrusal zincirinden daha etkilidir (Bohn ve BeMiller, 1995; Lam ve Cheung, 2013).

### **2.7.2. Freund's Complete Adjuvant (FCA)**

Deneyisel amaçlar için en yaygın kullanılan ve en etkili adjuvan, Freund's Complete Adjuvanttır (FCA). FCA, ısıyla öldürölmüş Mikobakteriler ve sürfaktanlı bir mineral yağdan oluşmaktadır. Enjeksiyondan önce, sulu bir çözeltideki antijen FCA ile karıştırılarak stabil bir yağ/su emülsiyonu üretilerek FCA ve antijenlerle immünizasyon güçlü Th1 ve Th17 cevaplarına neden olmaktadır. FCA'nın kullanımı, enjeksiyon bölgesinde granüloza dahil olmak üzere çeşitli ciddi yan etkilerle ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, FCA'nın kullanımı, etkili bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarla sınırlandırılmıştır (Tafalla,2013).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Araştırmada kullanılan balık materyali, uygulama yeri ve su kalitesi

Araştırmada kullanılan gökkuşaağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) Aksu-Isparta'da bulunan özel bir işletmeden temin edilmiştir. Balıklar oksijen tüpü desteği ile taşıma tankında taşınmıştır. Denemede kullanılan balıkların geçmişte hastalık geçirmediikleri işletme sahiplerinden öğrenildiği gibi, araştırmaya başlamadan rastgele seçilen 10 adet balıkta bakteriyolojik, parazitolojik ve fungal enfeksiyon yönünden incelemeler yapılmış, ön böbrek ve karaciğerden triptik soy agara (TSA) ekimler yapılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda mikrobiyolojik yönden (bakteri, mantar, parazit) herhangi bir enfeksiyon taşımadığı görülmüştür.

Balıklar Eğiridir Su Ürünleri Fakültesi'nde betonarme havuzlara yerleştirilerek 21 gün boyunca izlenmiş adaptasyonu sağlandıktan sonra aşı uygulaması yapılmıştır. 1.eprüvasyon için denemenin sürdürüleceği Eğiridir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Ünitesi'nde ki 16 adet yuvarlak fiberglas (0,6 m<sup>3</sup> hacimli, 450 lt su bulunan) tank (Şekil 3.1.) kullanılmıştır. Araştırma süresince kullanılan artezyen suyun debisi 12 L/dk, tanklarda ki suyun ortalama sıcaklığı 12,3-12,5° C, pH'sı 7,2 ve suda çözülmüş oksijen miktarı 7,4 mg/lt olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.1. Denemenin gerçekleştirildiği balık üretim tesisi ve denemede kullanılan fiberglas balık tankları

Araştırmada toksisitide denemeleri için 200 adet, immersiyon aşı uygulamaları için 660 adet (ortalama ağırlık 3,28 g ), ayrıca i.p. enjeksiyon yoluyla aşı denemesi (canlı ağırlık ortalama 15-20 g). Boy ortalaması 8-10 cm olan 2640 adet olmak üzere toplam 3100 adet sağlıklı gökkuşuğu alabalığı kullanılmıştır.

### 3.1.2. Araştırmada kullanılan yem

Deneme balıkları adaptasyon ve deneme süresince ticari alabalık pelet yemi günde iki kez doyuncaya kadar beslenmiştir (Çizelge 3.1).



Çizelge 3.1. Deneme süresince kullanılan ticari alabalık yeminin kimyasal besin bileşenleri

<b>Teknik Özellikler</b>	<b>Değerler</b>
Ham Protein	%42
Ham Yağ	%22
Ham Kül	%12
Selüloz	%3
Nem	%10
Fosfor	1,5
Metabolik Enerji	4350kcal/kg
Amino Asitler	1,6
Yağ Asitleri	%1
Koruyucular	%1,4
Vitaminler	125mg/kg

### 3.1.3. Araştırmada kullanılan suşlar

Araştırmada daha önce Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında yapılan çalışmalarda etkili olan *L.garvieae*, *V.anguillarum* ve *Y.ruckeri* suşları kullanılmıştır. Bu suşların kökenleri Çizelge 3.2.verilmiştir.

Çizelge 3.2. . Çalışmada kullanılan suşlar

<b>Patojen Suşlar</b>	<b>Köken</b>
<i>Y.ruckeri</i> YR-18/1	Gökkuşığı Alabalığı
<i>V.anguillarum</i> VA-M1	Gökkuşığı Alabalığı
<i>L.garvieae</i> LG-M1	Gökkuşığı Alabalığı

### 3.1.4.Aşıların hazırlandığı kuruluş

Bu araştırmada, immersiyon ve enjeksiyon uygulaması için *L.garvieae*, *V.anguillarum* ve *Y.ruckeri* aşıları Vetel Hayvan Sağlığı Tic. A.Ş., Organize Sanayi Bölgesi / Adıyaman'da hazırlanmıştır.

### 3.1.5. Araştırmada kullanılan adjuvantlar

Araştırmada adjuvant olarak Glukan (Sigma G5011) ve Freund's Complete Adjuvant (FCA) (Sigma-F5881) kullanılmıştır (şekil 3.2).



şekil 3.2. Araştırmada Kullanılan Adjuvantlar

## 3.2.Yöntem

### 3.2.1.Aşı hazırlamada kullanılan patojenler ve özellikleri

DeneySEL aşı üretiminde kullanılmak üzere seçimi yapılan bakteri suşları stok kültürden alınarak *V.anguillarum* %2 NaCl ilave edilmiş tuzlu triptik soy agara (TSA), *L.garvieae*, ve *Y.ruckeri* ise TSA' ya ekilmiş ve 22<sup>0</sup>C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda üreyen bakterilerin saflık kontrolleri yapılmıştır. Genel bakteriyolojik testler ile etkenler teyit edilmiştir (Austin ve Austin, 2007).

### 3.2.2. *L. garvieae*, *V. anguillarum* ve *Y. ruckeri* suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi

*L.garvieae*, *V.anguillarum* ve *Y.ruckeri* suşlarında Gram boyama, hareket testi (asılı damla metodu), oksidasyon-fermentasyon (O/F), sitokram oksidaz, katalaz, O/129 geleneksel bakteriyolojik testler yapılmıştır (Collins ve Lyne, 1976; Holt vd., 1994, Arda vd., 2002; Austin ve Austin, 2007).

### 3.2.3.Aşının hazırlanması

#### 3.2.3.1.Aşı suşunun seçimi

Saflık kontrolleri yapılan *Y. ruckeri*, *L. garvieae* ve *V.anguillarum*suşları TSB'de 22°C'de 24 saat inkübasyondan sonra TSA'a üçer paralel olacak şekilde ekimler yapılarak canlı bakteri sayımı (kob / ml) yapılmıştır (Arda, 1998). Ayrıca bakterilerin TSB'da 24 saatlik kültürlerinden spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda Optik Dansite Değeri (0.80) belirlenmiş böylece kob/ml değeri ile O.D. değeri karşılaştırılarak, hazırlanacak deneysel aşının standardizasyonu (mililitredeki bakteri sayısının her defa belli sayıda olmasının sağlanması) yapılmıştır. Polivalan aşı her bir suştan eşit miktarda ve dozda üretilerek hazırlanmıştır.

#### 3.2.3.2.Aşının üretimi

*Y. ruckeri*, *L. garvieae* ve *V. anguillarum* bakterilerinin saf kültürlerinden kob/ml sayısı belli olan bakteri inokulumları hazırlanmış ve fermentörde inokule edilerek bakterilerin kültürü yapılmıştır. Fermentörde üretilen bakteri kültürleri aşı çalışmalarında kullanılmak üzere hedeflenen kob/ml'de bakteri sayısına ulaştığı zaman fermentasyon durdurularak bakterilerin inaktive edilmesi için son konsantrasyonu %0,4 ile %0,7 olacak şekilde formaldehit ilavesi yapılmıştır. Böylece bakterilerin 24 saatte inaktivasyonları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra fermentörde üretim ve inaktivasyon aşamalarından sonra elde edilen ürünün bakteri sayısı  $10^9$  ile  $10^{10}$  kob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Aşılar Vetel Hayvan Sağlığı Tic. A.Ş., Organize Sanayi Bölgesi / Adıyaman'da hazırlanmış soğuk zincirde uygulama yapıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Hazırlanan deneysel aşı, immersiyon ve i.p. enjeksiyon yolu ile immunizasyonda kullanılmıştır.Adjuvanlı aşılarda FCA 1:1 oranında karıştırılmış, glukan ise 100 µg/ml oranında ilave edilmiştir.

### **3.2.3.3.Sterilite testi**

Üretilen aşılarda herhangi bir mikrobiyal kontaminasyonu'nun varlığının tespiti için sterilite kontrolleri yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan Brain Heart Infusion agar (BHI), Tirptic Soy agar (TSA), sıvı thioglycolate medium, MacConky agar (MCA), kanlı agar, saboraraude dexstrose agar ve TSB besiyerine 2 paralel olacak şekilde ekilerek 22 ve 36 °C de 21 gün süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Sterilite kontrolü yapılmış olan aşılar +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Ellis, 1988a).

### **3.2.3.4.Toksisite denemeleri**

Toksisite denemelerinde; aşı ve kontrol grubu olmak üzere 2 grup oluşturulmuş ve her gruba ortalama 20 gr ağırlığında 25' er balık konmuştur. Hazırlanan aşidan 0,1 ml aşılı gruba i.p. yolla enjeksiyon yapılmıştır. Kontrol grubuna ise PBS 0,1 ml i.p. yolla verilmiştir. Balıklar 21 gün süreyle takip edilip toksik etki gözlenmiştir (Amend vd., 1983, Ellis,1988a).

### **3.2.3.5. Aşıların uygulanması**

Denemede toplam 5 grup kullanılmış ve deneme 2 paralel yapılmıştır. Denemede adjuvantsız polivalan aşı; immersiyon ve enjeksiyon olarak; polivalan aşı + gluklan ve polivalan aşı + FCA adjuvantlı aşılar enjeksiyon olarak uygulanmıştır. Gluklan 100 µg/ml ilave edilmiştir. FCA aşı ile 1:1 oranında kullanılmıştır (Çizelge 3.3.). Adjuvantsız polivalan uygulanan balıklara rapel 1 ay sonra uygulanmıştır. Adjuvant kullanılan gruplara rapel (booster = aşı tekrarı) yapılmamıştır.

Çalışmada immersiyon aşı olarak hazırlanan aşılar, 3 g ağırlığındaki toplam gökkuşağı alabalığına 1:10 oranında sulandırılarak 1 dk süreyle banyo yaptırılmak suretiyle, inaktif enjeksiyon aşılar ise her biri 20 g ağırlığında gökkuşağı alabalığına (i.p. enjeksiyon yöntemiyle) 0.1 ml miktarda uygulanmıştır.

Çizelge 3.3. Aşı deneme grupları ve uygulama şekilleri

Deney Grupları	Uygulama Metodu ve Miktarı	Balık Sayısı/Grup	Eprüvasyon dönemleri
AŞISIZ -Kontrol grubu(K-1)	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml (PBS)	50(25x2)	30, 90, 120, ve 270. gün
<i>Y. ruckeri</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>L. garvieae</i> (Polivalan)	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml, 30 gün sonra rapel	50(25x2)	30, 90, 120, ve 270. gün
Polivalan+Glukan (PG-2)	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml	50(25x2)	30, 90, 120, ve 270. gün
Polivalan+FCA(PFCA-2)	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml	50(25x2)	30, 90, 120, ve 270. gün
<i>Y. ruckeri</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>L. garvieae</i> (İmmersiyon)	1:10 oranında sulandırılarak 1 dk immersiyon	50(25x2)	90, 120, ve 270. gün

### 3.2.3.6.Aşı etkinliğinin değerlendirilmesi

Aşının etkinliğinin değerlendirilmesinde deneysel enfeksiyon (Eprüvasyon) uygulamaları ve aşılı balıkların antikor titreleri belirlenmesi amacıyla lam aglütinasyon ve mikro-aglütinasyon kullanılmıştır (Arkoosh ve Kaattari, 1993; Kubilay ve Timur, 2001; Rauta vd, 2013).

Aşı uygulanan balıklarda i.p. yolla uygulamada 30,90,120 ve 270. günlerde; immersiyon uygulamasında ise 90,120 ve 270. Günlerde deneysel enfeksiyon uygulanarak aşının etkinliği değerlendirilmiştir. Ayrıca aynı günlerde her gruptan 5 balığın kaudal venasından kan örnekleri alınarak serumları çıkarılmış ve derin dondurucuda muhafaza edilerek aglütinasyon testlerinde kullanılmak üzere saklanmıştır.

Balıklarda aşının sağladığı bağışıklık, nispi hayatta kalma yüzdesi (RPS= Relative Percent Survival) temel alınarak değerlendirilmiştir (Ellis, 1988a).

$$RPS = \left( 1 - \frac{\text{Aşılı balıklardaki ölüm miktarı \%}}{\text{Aşısız balıklardaki ölüm miktarı \%}} \right) \times 100$$

### **3.2.3.7. Deneysel enfeksiyon (Eprüvasyon) uygulamaları**

*V. anguillarum* suşları tuz ilaveli TSB, *Y. ruckeri*, *L. garvieae* ise TSB'de 22°C'de 24 saat inkübasyondan sonra katı besiyerinde üçer paralel olacak şekilde ekimler yapılarak canlı bakteri sayımı (kob / ml) ve optik dansite değerleri (O.D.) tespit edilmiştir (Arda, 1998). Aşılana balıklarda bağışıklığın tespitine geçmeden önce, test yapılacak balık popülasyonunda % 60'ini öldüren bakteri sayısı (LD<sub>60</sub>) belirlenmiştir (Ellis, 1999).

Balıkların i.p. enjeksiyon ve immersiyon yolla aşılmasını takiben 30., 90., 120. ve 270. günlerde LD<sub>60</sub> dozu belirlenen miktarda patojenler verilerek balıklarda hayatta kalma yüzdesi ortaya çıkarılmıştır. Aşılama sonrası deneysel enfeksiyon, tüm gruplara i.p. enjeksiyonla LD<sub>60</sub> oranındaki bakterinin 0.1 ml miktarında aşı ve kontrol grubu balıklarına 50'şer adetlik gruplar halinde uygulanmıştır. Deneysel enfeksiyondan sonra balıklar 21 gün boyunca izlenerek, ölümler günlük olarak kayıt edilmiştir. Deneysel enfeksiyon sonrası; ölü veya ölmekte olan balıkların iç organlarından reizolasyon için TSA ve T-TSA'ya ekimler yapılmıştır. Ekimler sonucu ölümlerin patojenlerin neden olduğu enfeksiyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığı tespit edilmiştir.

### **3.2.3.8. Serum elde edilmesi**

Balıklardan alınan kan 1 saat oda sıcaklığında ve daha sonra gece boyunca +4 °C de tutulmuştur. Daha sonra soğutmalı santrifüjde (Sigma 2-16K) +4 °C de 3000 devirde 15 dakika süre ile santrifüj edilerek üstte kalan sıvı kısım otomatik pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde alınmıştır. Elde edilen serumlar aglütinasyon testlerinde kullanılmak üzere -20 °C de derin dondurucuda saklanmıştır (Strand vd., 1977; Thuvander, 1987; Aakre vd., 1994, Ekici, 2010).

### **3.2.3.9. Pozitif kontrol serumunun hazırlanması**

Testlerde pozitif kontrol serumu olarak Vetal firmasında *Y. ruckeri*, *L. garvieae* ve *V. anguillarum* patojenlerine karşı tavşanlardan elde edilen antiserumlar kullanılmıştır.

### **3.2.4. Aglutinasyon testi**

#### **3.2.4.1. Antijen hazırlanması**

Antijen hazırlamak için; aşı suşlarının saflığı kontrol edildikten sonra TSB ve T-TSB'ye ekilerek 22°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteri kültürleri 5000 devirde 15 dk santrifüj edilerek, çökelti kısmı ayrılmış ve % 0,3 formaldehit ilave edilmiş PBS ile sulandırılmıştır. Daha sonra 100 °C'de 1saat süreyle otoklavda bekletilerek ısıya dayanıklı O antijeni elde edilmiştir. Otoklavlanan bakteri kültürleri 5000 devirde 15 dk santrifüje edilerek PBS ile sulandırılmıştır. Sulandırma sonucu oluşan süspansiyon (antijen) yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0.7 O.D. ayarlanmıştır. Böylece hazırlanan antijenler somatik O antijenleri olarak mikro-aglutinasyon testinde kullanılmak üzere saklanmıştır (Sorensen ve Larsen, 1986).

#### **3.2.4.2. 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. Test sonuçları 2-3 dk içerisinde değerlendirilmiş ve 5 dk sonra oluşan zayıf aglutinasyon negatif olarak kabul edilmiştir. Testin kontrolü, immunize edilmemiş balık serumları ve PBS ile yapılmıştır (Kubilay, 1997; Ekici, 2010).

#### **3.2.4.3. Mikro-aglutinasyon testinin uygulanması**

Yuvarlak tabanlı polyester mikropalaklar soldan sağa doğru birinci sıradaki çukurlarına test serumları konulmuştur. Sonra yukarıdan aşağıya doğru serumlar 1/2 dilüsyondan başlayarak otomatik sulandırıcı ile her seferinde 50 µlt bir aşağıdaki çukura aktarılmak suretiyle 2 katlı dilüsyonları yapılmıştır. Plakların tüm çukurlarına çoklu pipetle önceden hazırlanmış aglutinasyon antijeninden 50 µlt ilave edilerek karıştırıcı (vorteks) ile iyice karıştırılmıştır. Plaklar iki saat oda sıcaklığında ve tüm gece boyunca +4 °C de inkübe edilmiştir (Sorensen ve Larsen, 1986; Kubilay, 1997; Boesen vd., 1999). Testin kontrolü için pozitif ve negatif serumlar çalışılan her plağın sondan bir ve ikinci gözlerine konulmuştur. Aglutinasyon titresi olarak en yüksek aglutinasyonu veren serum dilüsyonu kaydedilerek, bu değerler log<sub>2</sub> tabanına göre değerlendirilmiştir (Sorensen ve Larsen, 1986; Boesen vd., 1999).

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. Aşı Suşlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

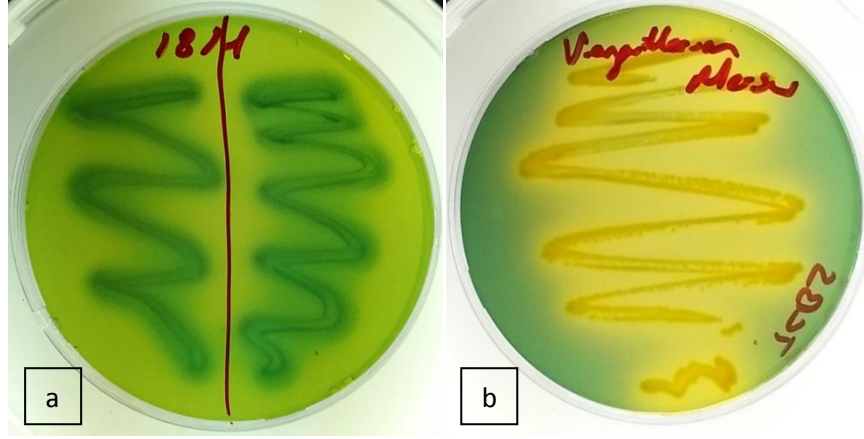
Aşı hazırlamada kullanılacak olan *V. anguillarum*, *L. garvieae* ve *Y. ruckeri* suşlarında genel bakteriyolojik testlerden Gram boyama, oksidasyon-fermentasyon (O/F), hareket testi (asıllı damla metodu), sitokrom oksidaz, katalaz, O/129 (10 ve 150 µg), 37 ve 45°C’ de üreme testleri yapılmıştır (Çizelge 4.1). *Vibrio anguillarum* için selektif besiyeri olan Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS), *Yersinia ruckeri* içinse Shotts–Waltman Agar (SWA)’ da üremeye bakılmıştır (Şekil 4.1) (Arda vd., 2002; Austin ve Austin, 2007).

Çizelge 4.1. Aşı suşlarının klasik yöntemlerle tespit edilen fenotipik özellikleri ile ilgili bulgular (22 °C 24 saatlik inkübasyon)

	<i>V. anguillarum</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>L. garvieae</i>
<b>Gram boyama</b>	-	-	+
<b>S.O.</b>	+	-	-
<b>Katalaz</b>	+	+	-
<b>Hareket</b>	+	+	-
<b>O/F</b>	Fermentatif	Fermentatif	Fermentatif
<b>O/129 (10µg)</b>	Duyarlı	*	*
<b>O/129 (150µg)</b>	Duyarlı	*	*
<b>TCBS agarda üreme</b>	Sarı koloni	*	*
<b>SW agarda üreme</b>	*	Yeşil zonlu yeşil koloni	*
<b>37°C de üreme</b>	+	+	+
<b>45°C de üreme</b>	+	*	+

+ pozitif, - negatif, \* test yapılmadı O/F : Oksidatif ve Fermantatif





Şekil 4.1.a. Shotts-Waltman agarda (SWA) da *Y.ruckeri*, b. Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agarda (TCBS) *V. anguillarum*

#### 4.2. Hazırlanan Aşının Toksikite Denemelerinin Sonuçları İle İlgili Bulgular

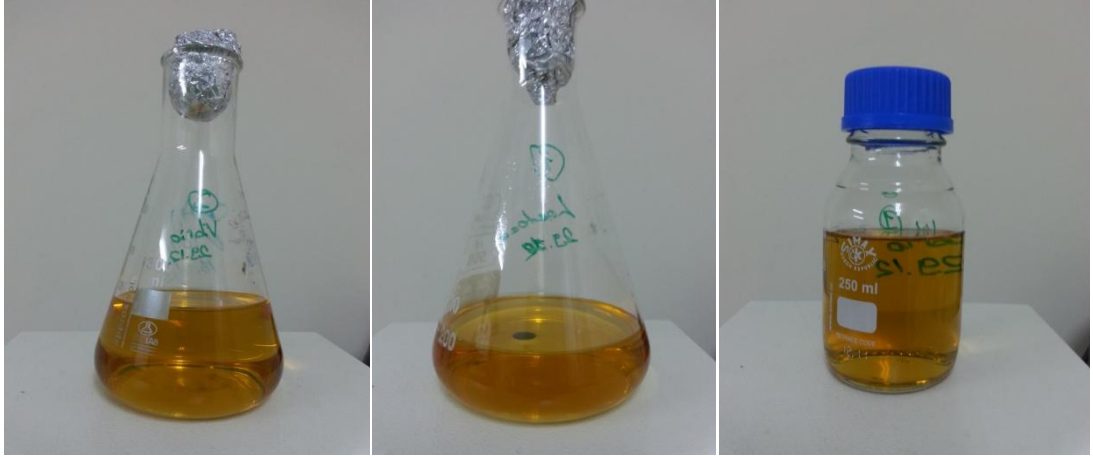
Yapılan toksisite testi sonucunda aşı uygulanan grupta aşının hazırlanması sırasında kullanılan PBS , antijen ve antijen+adjuvant ilaveli gruplarda herhangi bir toksik etkinin olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Hazırlanan antijenlerin toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçları

Aşı	Balık Adedi	Mortalite	Yaşam Oranı (%RPS)
PBS	25	0	100
Polivalan	25	0	100
Polivalan-Glukan	25	0	100
Polivalan -FCA	25	0	100

#### 4.3. Hazırlanan Aşının Sterilite Denemelerinin Sonuçları İle İlgili Bulgular

Üretilen aşılardan steril olup olmadığının anlaşılması için farklı besiyerlerine yapılan ekimler sonucunda üremenin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil4.2.). Sterilite kontrolü yapılmış olan aşılardan +4 °C’de muhafaza edilmiştir



Şekil 4.2..TSB de sterilite kontrolü yapılan aşilar

#### 4.4. Aşılanmış Balıkların Koruma Seviyesine Ait Bulgular

Deneysel aşiların etkinliğini değerlendirmek için, aşilamadan sonra balıklara 30., 90., 120. ve 270. günlerde epruvasyon uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla her gruptaki balıklar karanfil yağı ile bayılarak tüm gruplara i.p. enjeksiyonla 0.1ml LD<sub>60</sub> oranında *V. anguillarum*, *L. garvieae* ve *Y. ruckeri* suşları ile challenge yapılmıştır. Epruvasyon uygulanan balıklar 21 gün boyunca izlenerek, ölen balıkların iç organlarından da reizolasyon için ekimler yapılmıştır (Çizelge 4.3., Çizelge 4.4., Çizelge 4.5.). Patojen izole edilen balıklar spesifik mortalite olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 4.3. I.p. enjeksiyon yöntemiyle aşılana 20 gr ağırlığındaki gökkuşığı alabalıklarında 30. günlerde yapılan deneysel enfeksiyon (LD<sub>60</sub>) sonrası elde edilen RPS değerleri

30.Gün (uygulama tarihi: 14.02.2015)	Balık sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite %	RPS %
Kontrol- <i>Y. ruckeri</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>L. garvieae</i>	50	30	60	
Kontrol- <i>V. anguillarum</i>	50	31	62	
Polivalan- <i>Y. ruckeri</i>	50	0	0	100
Polivalan - <i>L. garvieae</i>	50	0	0	100
Polivalan- <i>V. anguillarum</i>	50	1	2	96,77
Polivalan+Glukan- <i>Y. ruckeri</i>	50	1	2	96,77
Polivalan+Glukan- <i>L. garvieae</i>	50	0	0	100
Polivalan+Glukan - <i>V. anguillarum</i>	50	3	6	90,32
Polivalan+FCA- <i>Y. ruckeri</i>	50	0	0	100
Polivalan+FCA- <i>L. garvieae</i>	50	0	0	100
Polivalan+FCA- <i>V. anguillarum</i>	50	4	8	87,09

Çizelge 4.4. I.p. enjeksiyon yöntemiyle aşılana 20 gr ağırlığındaki gökkuşığı alabalıklarında 90. günlerde yapılan deneysel enfeksiyon (LD<sub>60</sub>) sonrası elde edilen RPS değerleri

90. Gün (uygulama tarihi: 12.04.2015)	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite %	RPS %
Kontrol- <i>Y. ruckeri</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>L. garvieae</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>V. anguillarum</i>	50	31	62	
Polivalan- <i>Y. ruckeri</i>	50	0	0	100
Polivalan - <i>L. garvieae</i>	50	0	0	100
Polivalan- <i>V. anguillarum</i>	50	0	0	100
Polivalan+Glukan- <i>Y. ruckeri</i>	50	0	0	100
Polivalan+Glukan- <i>L. garvieae</i>	50	0	0	100
Polivalan+Glukan- <i>V. anguillarum</i>	50	17	34	45,16
Polivalan+FCA- <i>Y. ruckeri</i>	50	1	2	96,77
Polivalan+FCA- <i>L. garvieae</i>	50	0	0	100
Polivalan+FCA- <i>V. anguillarum</i>	50	0	0	100

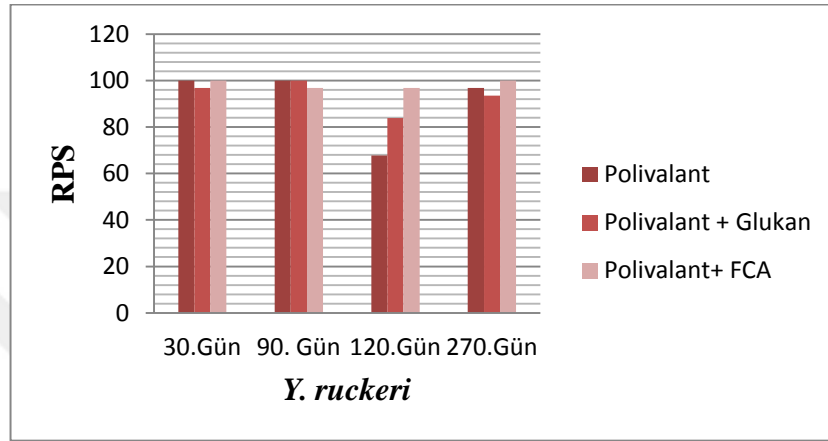
Çizelge 4.5. I.p. enjeksiyon yöntemiyle aşıl原因anan 20 gr ağırlığındaki gökkuşuğı alabalıklarında 120. günlerde yapılan deneysel enfeksiyon (LD<sub>60</sub>) sonrası elde edilen RPS değerleri

120. Gün (uygulama tarihi: 10.05.2015)	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite %	RPS %
Kontrol- <i>Y. ruckeri</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>L. garvieae</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>V. anguillarum</i>	50	31	62	
Polivalan- <i>Y. ruckeri</i>	50	10	20	67,74
Polivalan - <i>L. garvieae</i>	50	2	4	93,54
Polivalan- <i>V. anguillarum</i>	50	0	0	100
Polivalan+Glukan- <i>Y. ruckeri</i>	50	5	10	83,87
Polivalan+Glukan- <i>L. garvieae</i>	50	1	2	96,77
Polivalan+Glukan- <i>V. anguillarum</i>	50	3	6	90,32
Polivalan+FCA- <i>Y. ruckeri</i>	50	38	76	
Polivalan+FCA- <i>L. garvieae</i>	50	0	0	100
Polivalan+FCA- <i>V. anguillarum</i>	50	16	32	48,38

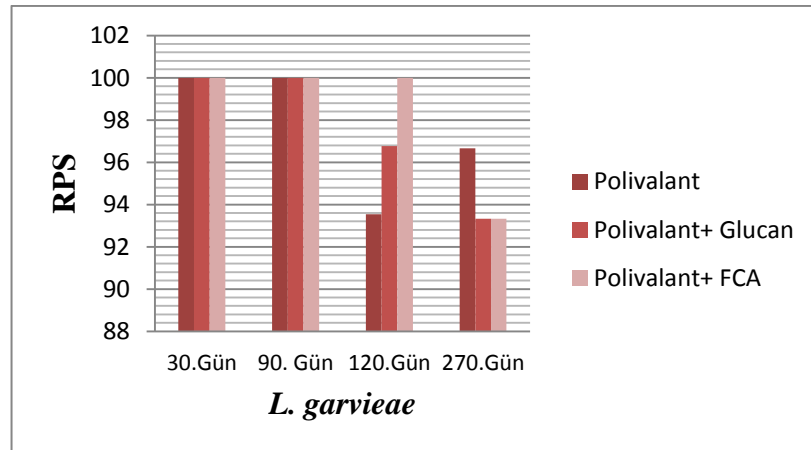
Çizelge 4.6. I.p. enjeksiyon yöntemiyle aşıl原因anan 20 gr ağırlığındaki gökkuşuğı alabalıklarında 270. günlerde yapılan deneysel enfeksiyon (LD<sub>60</sub>) sonrası elde edilen RPS değerleri

270. Gün (uygulama tarihi: 01.07.2015)	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite %	RPS %
Kontrol- <i>Y. ruckeri</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>L. garvieae</i>	50	30	60	
Kontrol- <i>V. anguillarum</i>	50	31	62	
Polivalan- <i>Y. ruckeri</i>	50	1	2	96,77
Polivalan - <i>L. garvieae</i>	50	1	2	96,66
Polivalan- <i>V. anguillarum</i>	50	0	0	100
Polivalan+Glukan- <i>Y. ruckeri</i>	50	2	4	93,54
Polivalan+Glukan- <i>L. garvieae</i>	50	2	4	93,33
Polivalan+Glukan- <i>V. anguillarum</i>	50	1	2	96,77
Polivalan+FCA- <i>Y. ruckeri</i>	50	0	0	100
Polivalan+FCA- <i>L. garvieae</i>	50	2	4	93,33
Polivalan+FCA- <i>V. anguillarum</i>	50	4	8	87,09

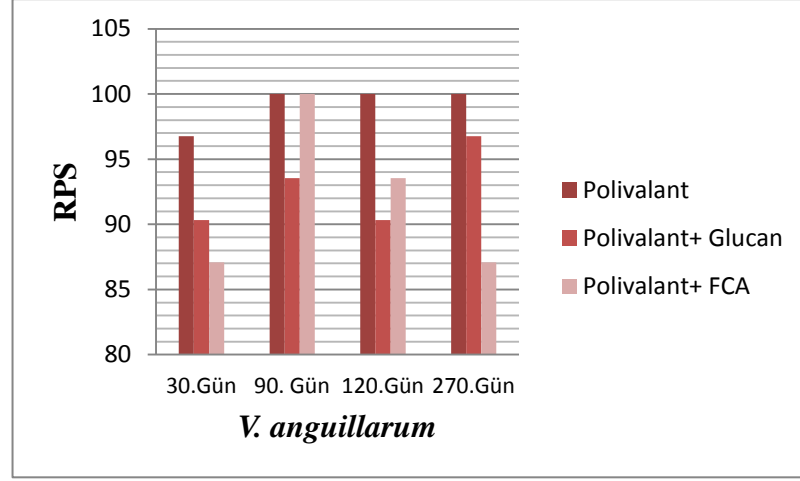
İ.p. enjeksiyon yöntemi ile aşıl原因anan balıklarda RPS değeri 9 ay boyunca tüm gruplarda % 80' in üzerinde bulunmuştur. 9. Ayda *Y. ruckeri* karşı, en yüksek koruma FCA' lı grupta tespit edilmiştir (Şekil 4.3). *L. garvieae* için en yüksek koruma polivalan grupta % 96,66 olarak (Şekil 4.4), *V. anguillarum* da ise polivalan grupta %100 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.3. Farklı aşularla İ.P olarak aşıl原因anan gökkuşığı alabalıklarında antijenlerin *Y. ruckeri*'e karşı koruyuculuk değeri (RPS) karşılaştırılması



Şekil 4.4. Farklı aşularla İ.P olarak aşıl原因anan gökkuşığı alabalıklarında antijenlerin *L. garvieae* karşı koruyuculuk değeri (RPS) karşılaştırılması



Şekil 4.5 Farklı aşılarda İ.P olarak aşılanan gökkuşuğu alabalıklarında antijenlerin *V. anguillarum* 'a karşı koruyuculuk değerlerinin (RPS) karşılaştırılması

İmmersiyon grubunda aşılardan etkinliğini değerlendirmek için, aşılamadan sonra balıklara 90., 120. ve 270. günlerde epruvasyon uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla her gruptaki balıklar karanfil yağı ile bayıltılarak tüm gruplara i.p. enjeksiyonla 0.1ml LD<sub>60</sub> oranında *V. anguillarum*, *L. garvieae* ve *Y. ruckeri* suşları ile challenge yapılmıştır. Epruvasyon uygulanan balıklar 21 gün boyunca izlenerek, ölen balıkların iç organlarından da reizolasyon için ekimler yapılmıştır (Çizelge 4.7., Çizelge 4.8., Çizelge 4.9.). Patojen izole edilen balıklar spesifik mortalite olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 4.7. İmmersiyon yöntemiyle aşılanan 3 gr ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında 90. günde yapılan deneysel enfeksiyon (LD<sub>60</sub>) sonrası elde edilen RPS değerleri

90. Gün (uygulama tarihi:12.04.2015)	Balık Sayısı	Ölen Sayısı	Balık Mortalite %	RPS %
Kontrol- <i>Y. ruckeri</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>L. garvieae</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>V. anguillarum</i>	50	31	62	
Polivalan- <i>Y. ruckeri</i>	50	21	42	32,25
Polivalan - <i>L. garvieae</i>	50	8	16	74,19
Polivalan- <i>V. anguillarum</i>	50	1	2	96,77

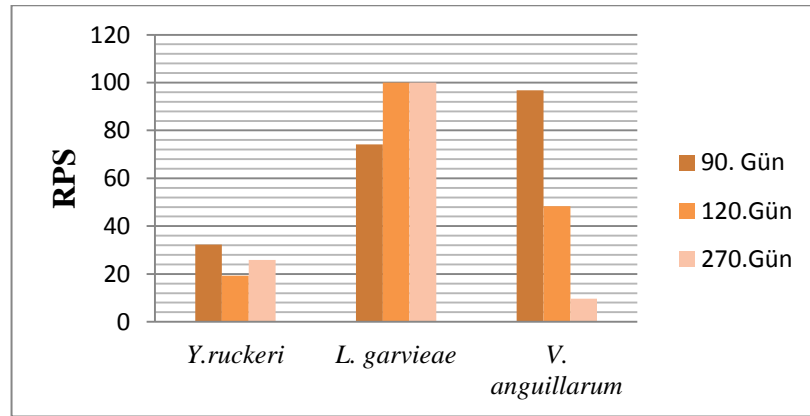
Çizelge 4.8. İmmersiyon yöntemiyle aşılana 3 gr ağırlığındaki gökkuşığı alabalıklarında 120. günde yapılan deneysel enfeksiyon (LD<sub>60</sub>) sonrası elde edilen RPS değerleri

120. Gün (uygulama tarihi:10.05.2015)	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite %	RPS %
Kontrol- <i>Y. ruckeri</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>L. garvieae</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>V. anguillarum</i>	50	31	62	
Polivalan- <i>Y. ruckeri</i>	50	25	50	19,35
Polivalan - <i>L. garvieae</i>	50	0	0	100
Polivalan- <i>V. anguillarum</i>	50	16	32	48,38

Çizelge 4.9. İmmersiyon yöntemiyle aşılana 3 gr ağırlığındaki gökkuşığı alabalıklarında 270. günde yapılan deneysel enfeksiyon (LD<sub>60</sub>) sonrası elde edilen RPS değerleri

270. Gün (uygulama tarihi: 01.07.2015)	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite %	RPS %
Kontrol- <i>Y. ruckeri</i>	50	31	62	
Kontrol- <i>L. garvieae</i>	50	30	60	
Kontrol- <i>V. anguillarum</i>	50	31	62	
Polivalan- <i>Y. ruckeri</i>	50	23	46	25,8
Polivalan - <i>L. garvieae</i>	50	0	0	100
Polivalan- <i>V. anguillarum</i>	50	28	56	9,67

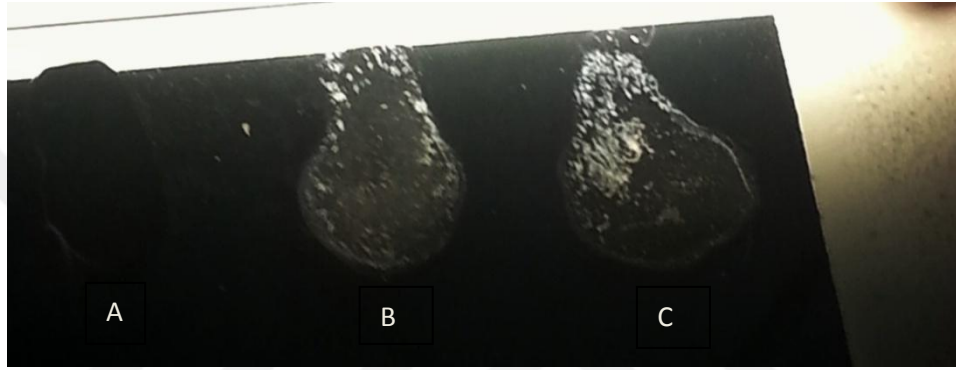
İmmersiyon yolla polivalan + 30. günde rapel uygulanarak aşılana balıklarda *Y. ruckeri*' e karşı koruma oluşumu görülmemiştir. *L. garvieae*' e karşı tam koruma görülmüş, *V. anguillarum* da ise en yüksek koruma 90. günde tespit edilmiştir (Şekil4.6).



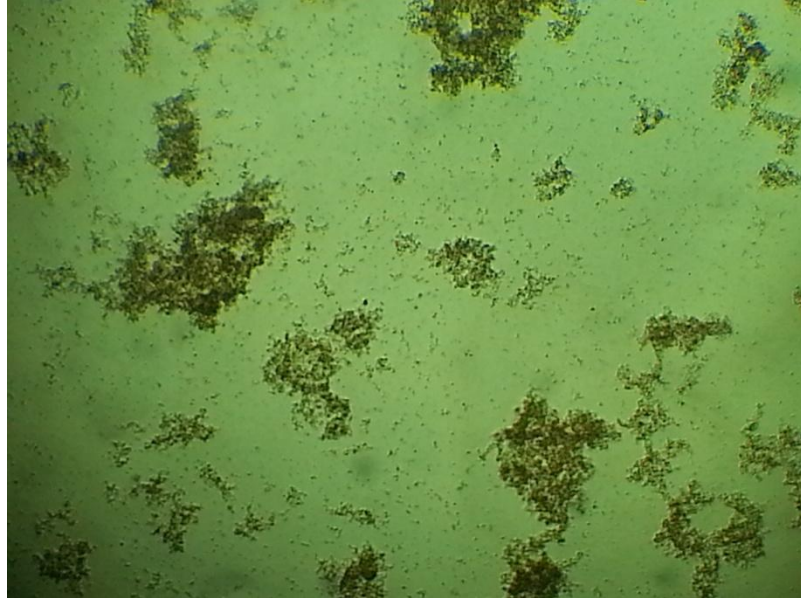
Şekil 4.6. İmmersiyon olarak aşılana 3 grlık gökkuşığı alabalıklarında antijenlerin *Y. ruckeri*,*L. garvieae* ve *V. anguillarum* 'a karşı koruyuculuk değerlerinin (RPS) karşılaştırılması

#### 4.5. Lam Aglutinasyon Testi İle İlgili Bulgular

Aglutinasyon antijeni ile immün test serumlarının lam üzerinde karıştırılması halinde tüm aşılı gruplarda aglütinasyon görülmüştür (Şekil 4.7). Aglutinasyonun olduğu lamların ışık mikroskobu altında incelenmesi halinde bakterilerle antikorun oluşturduğu kümeleşmeler gözlenmiştir (Şekil 4.8 ).



Şekil 4.7. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antijenin oluşturduğu kümeler A) negatif kontrol B) pozitif kontrol C) test serumu

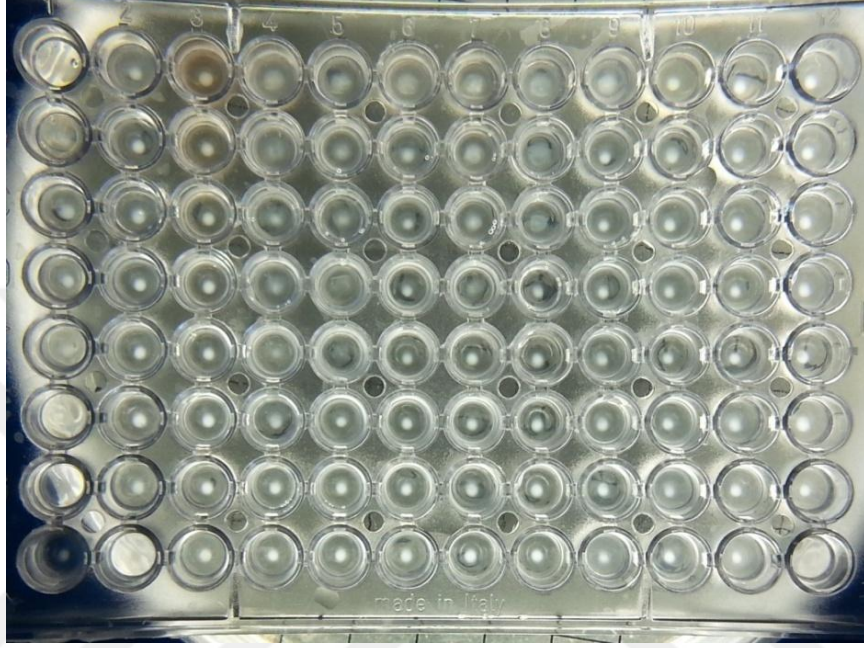


Şekil 4.8. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antijenin oluşturduğu kümelerin ışık mikroskobunda görünümü

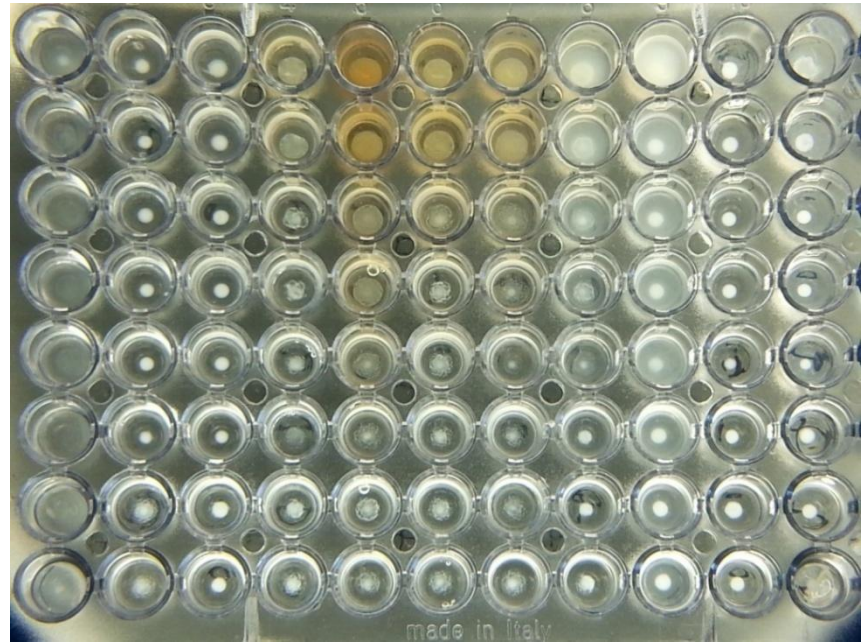


#### 4.6. Mikroaglutinasyon Testi İle İlgili Bulgular

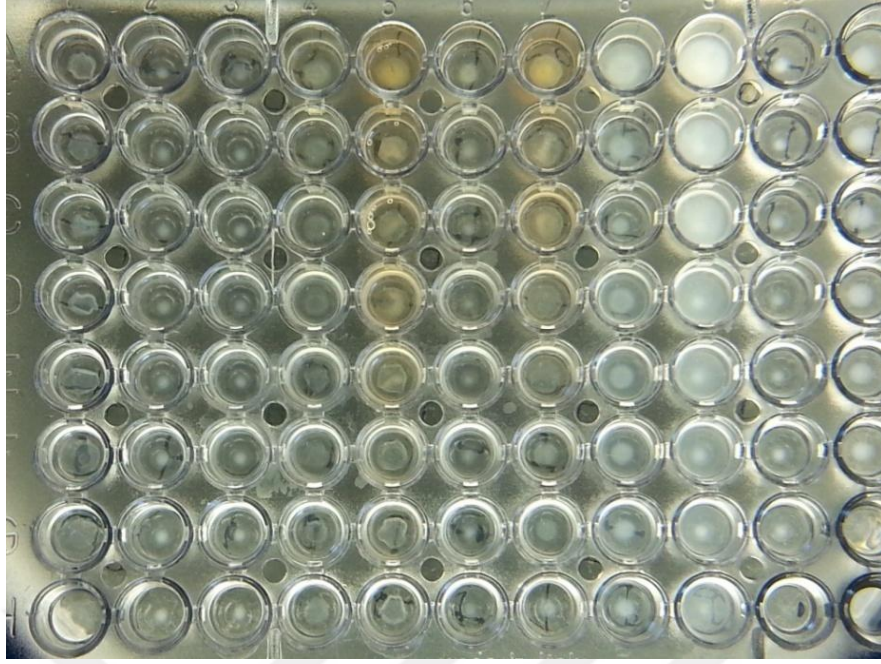
Aglutinasyon antikoru içeren test serumlarının polyester yuvarlak tabanlı mikro-well plak çukurlarında antijen ile karıştırılması sonucunda gözle görülebilen aglutinasyon çökelekleri oluşmuştur (Şekil 4.9., 4.10., 4.11.).



Şekil 4.9. İmmun test serumlarını içeren mikroplak aglutinasyon plate çukurları *Y. ruckeri*



Şekil 4.10. İmmun test serumlarını içeren mikroplak aglutinasyon plate çukurları *L. garvieae*



Şekil 4.11. İmmun test serumlarını içeren mikroplak aglutinasyon plate çukurları *V. anguillarum*

*Y. ruckeri*, *L. garvieae* ve *V.anguillarum* bakterini ile farklı metotlarla immunize edilen balıklarda 30, 90, 120 ve 270. günlerde elde edilen serumlardan hazırlanan mikroaglutinasyon testine ait antikor titre sonuçları Çizelge (4.10, 4.11, 4.12) ve Şekil (4.12, 4.13, 4.14)'te verilmiştir.

Çizelge 4.10. *Y. ruckeri*'e karşı immunize edilen balıkların immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri ve aglutinin titreleri ( $\text{Log}_2$ )

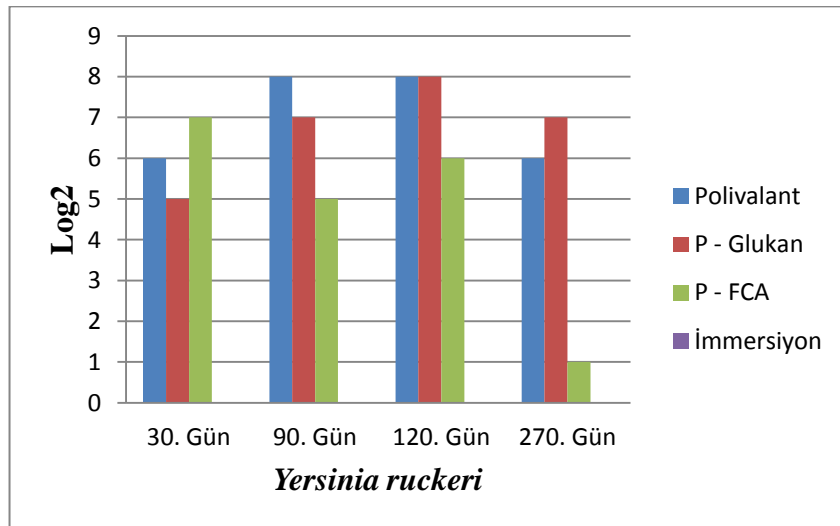
<i>Y. ruckeri</i>	Polivalan+ rapel		P - Glukan		P - FCA		immersiyon	
		Log 2		Log 2		Log 2		Log 2
<b>30. Gün</b>	1/64	6	1/32	5	1/128	7	0	0
<b>90. Gün</b>	1/256	8	1/128	7	1/32	5	0	0
<b>120. Gün</b>	1/256	8	1/256	8	1/64	6	0	0
<b>270. Gün</b>	1/64	6	1/128	7	1/2	1	0	0

Çizelge 4.11. *L. garvieae* karşı immunize edilen balıkların immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri ve aglutinin titreleri ( $\text{Log}_2$ )

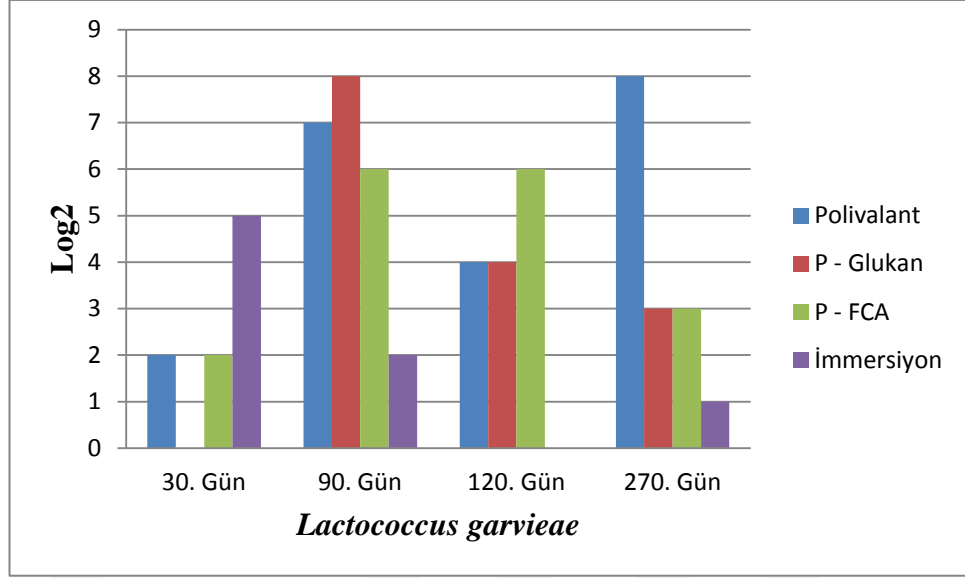
<i>L. garvieae</i>	polivalan		P - Glukan		P - FCA		immersiyon	
	Log 2		Log 2		Log 2		Log 2	
30. Gün	1/4	2	0	0	1/4	2	1/32	5
90. Gün	1/128	7	1/256	8	1/64	6	1/4	2
120. Gün	1/16	4	1/16	4	1/64	6	0	0
270. Gün	1/256	8	1/8	3	1/8	3	1/2	1

Çizelge 4.12. *V. anguillarum* karşı immunize edilen balıkların immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri ve aglutinin titreleri ( $\text{Log}_2$ )

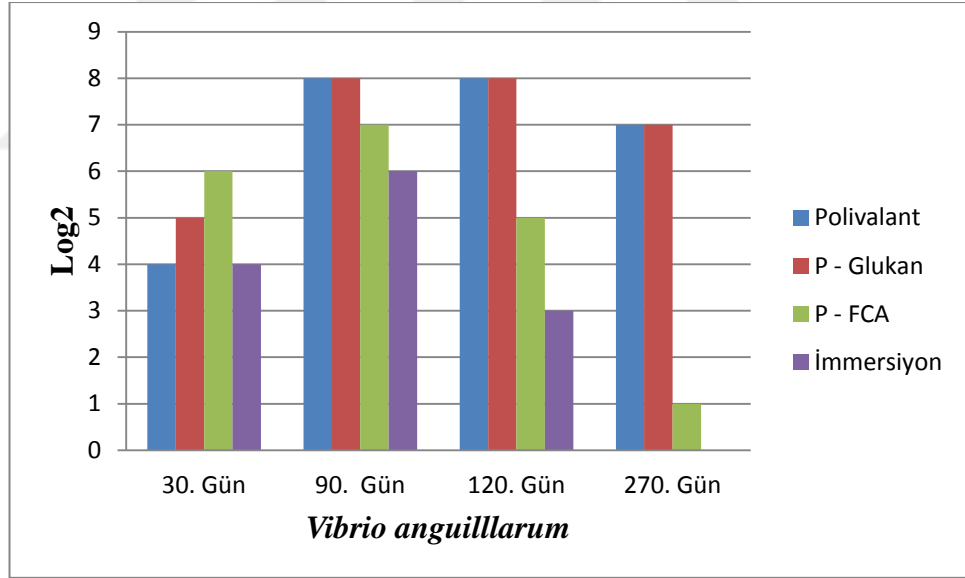
<i>V. anguillarum</i>	polivalan		P - Glukan		P - FCA		immersiyon	
	Log 2		Log 2		Log 2		Log 2	
30. Gün	1/16	4	1/32	5	1/64	6	1/16	4
90. Gün	1/256	8	1/256	8	1/128	7	1/64	6
120. Gün	1/256	8	1/256	8	1/32	5	1/8	3
270. Gün	1/128	7	1/128	7	1/2	1	0	0



Şekil 4.12. *Y. ruckeri*'e karşı immunize edilen balıkların kan serumunda oluşan aglutinin titreleri ( $\text{Log}_2$ )



Şekil 4.13. *L. garvieae* karşı immunize edilen balıkların kan serumunda oluşan aglutinin titreleri (Log<sub>2</sub>)



Şekil 4.14. *V. anguillarum* karşı immunize edilen balıkların kan serumunda oluşan aglutinin titreleri (Log<sub>2</sub>)

## 5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliği ülkemizde 1970'li yıllarda başlayarak, hızla gelişim göstermiş ve tatlı su balıkları yetiştiriciliğinde büyük bir potansiyele ulaşmıştır. Gökkuşığı alabalıklarının intensif yetiştiriciliğine bağlı olarak, özellikle de balıkların yoğun bir şekilde stoklanması, stres ve su kalitesindeki olumsuz değişiklikler nedeniyle hastalık sorunları ortaya çıkmıştır.

Günümüzde akuakültürde özellikle infeksiyöz bakteriyel hastalıklara karşı aşılama ile önemli koruma sağlanmaktadır (Schnick vd.,1997). Yetiştiricilik açısından önemli olan çoğu bakteriyel hastalıklara karşı ticari aşılar, balık çiftliklerinde başarılı bir şekilde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Ancak mevcut aşuların uzun süreli ve daha etkin koruma oluşturmaları için araştırmalar devam etmektedir (Sommerset vd., 2005).

Ülkemizde gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliğinde en önemli sorunların başında, entansif yetiştiricilikle birlikte ortaya çıkan hastalık sorunları yer almaktadır. Hızlı üretim artışının sürdürülebilir olmasında en önemli sorunlardan biriside; gökkuşığı alabalığı işletmelerinde *Y. ruckeri*, *L. garvieae* ve *V.anguillarum*' un etken olduğu enfeksiyonların yayılımının önlenememesi ve işletmelerde kontrol altına alınamamasıdır. Hastalıklarla mücadelede en etkin yol hastalık ortaya çıkmadan önce aşı uygulamalarının yapılmasıdır. Ülkemizde sıklıkla görülen yersiniozis, lactococcozis ve vibriozisenfeksiyonları gökkuşığı alabalığı işletmelerinde son yıllarda ciddi seviyede ölümlere yol açmaktadır.

Yersiniozis, lactococcozis ve vibriozisenfeksiyonlarına karşı ticari aşılar mevcut olup bu aşuların çoğunun tek patojenleri hedef aldığı, bu enfeksiyonlara karşı aynı anda koruyucu olan aşılar üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile İnaktif *Y. ruckeri*, *L. garvieae* ve *V.anguillarum*antijenlerinden hazırlanan polivalanaşı geliştirmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae* ve *Vibrio anguillarum*' patojenleri Freund's complete adjuvant ve glukan ile birlikte trivalent aşılar 20gr lık gökkuşağı alabalıklarına i.p. olark enjeksiyon ile uygulanmıştır. Ayrıca bu polivalan aşı yavru balıklara immersiyon yöntemi ile de uygulanmıştır. Yapılan araştırma sonucunda çoklu antijen kullanımının uzun süreli ve iyi bir koruma sağladığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçlarında olduğu gibi polivalan aşılarn iyi koruma sağladığını göstermiştir.

Bu çalışmada kullanılan polivalan hazırlanan aşılarn rapel uygulamaları ile *Lactococcus garvieae* karşı oluşturduğu koruma, RPS; 30 ve 90. günlerde %100, 120. günde 93,54 ve 270. günde %96,66 olarak tespit edilmiştir. Adjuvantsız olarak uygulanan aşının iyi bir koruma oluşturduğu tespit edilmiş ve 9 aya kadar korumanın devam ettiği görülmüştür.

Prieta vd. (1993) İspanyol balık çiftliklerinde izole edilen *L. garvieae* ile hazırlanan aşılarn balıklarda %1,7 lik ölüm oranı ile koruyuculuk sağladığını tespit etmişlerdir. İsrail' de intraperitoneal olarak *L. garvieae* ile aşılanan balıklarda % 80-90 koruma yüzdeleri elde edilmiştir (Bercovier, 1997). Buna ek olarak, pasif bağışıklık yoluyla koruma sağlamak için antiserumlar ile aşılama yapılmış iyi bir koruma oluşmuş, ancak korunma süresinin kısa olduğu bildirilmiştir (Akhlaghi vd, 1996). *L. garvieae*'ye karşı doğal koruma sağlamak için intraperitoneal veya oral yolla uygulanan aşılarda glukanların kullanılması ile spesifik olmayan bağışıklık tepkisine bağlı olarak aşılanan grupta kontrollere kıyasla iki kat koruma seviyesi görülmüştür. (İtami vd, 1996).

Son yıllarda araştırmacılar farklı mineral yağlarla adjuvantlı aşılar geliştirmiş hem laboratuvar hemde arazi şartlarında denemeler gerçekleştirmişlerdir. Aşılanma sonrasında adjuvantsız aşılarn 4-5 hafta, yağ adjuvantlı aşılarn ise 3 hafta sonrasında koruma oluşturduğunu tespit etmişlerdir. *Lactococcus garvieae* patojenine karşı korumanın adjuvantsız aşılarn ile 3-4 ay, adjuvantlı aşılarn ile ise 4-5 ay süreyle devam ettiğini bildirmişlerdir ( Ghittino, 1999, Vendrell vd, 2004, Vendrell vd, 2006). Bu çalışmada ise adjuvantsız aşılarn ile de daha uzun süre koruma sağlanmıştır. Bunun nedeninin adjuvantsız aşılarda 30. günde aşı tekrarının yani rapelin yapılmasının etkili olduğu düşünülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan glukun ve Freund's Complete Adjuvant (FCA) ile polivalan hazırlanan aşuların *L. garviae* karşı oluşturduğu koruma, RPS; glukunlu grupta, 30 ve 90. günlerde %100, 120. günde %96,77 ve 270. günde %93,33 olarak tespit edilmiştir. FCA'lı grupta RPS; 30, 90 ve 120. günlerde % 100 ve 270. günde %93,33 olarak belirlenmiştir. 120. günde FCA'lı grupta glukuna göre daha yüksek koruma gözlemlenirken her iki grupta da 270. günde aynı seviyede koruma tespit edilmiştir. Adjuvantlı aşuların iyi bir koruma oluşturduğu tespit edilmiş ve 9 aya kadar korumanın devam ettiği görülmüştür.

Ravelo vd, 2005, Lactococcosis aşularına farklı adjuvantlar eklenmesinin etkisini değerlendiren çalışmalarında, gökkuşuğu alabalığı aşuları için mineral olmayan bir yağ adjuvantının (Aquamun) eklenmesinin, aşılama dört hafta sonra iyi bir koruma sağladığını ve aşılama 8 ay sonra (RPS % 83.3) koruma devam ettiği belirtilmiştir. Bu araştırma yaptığımız çalışmayı desteklemektedir.

Oral aşılamanın, geleneksel yöntemlerden intraperitoneal yolla alternatif olarak değerlendirilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır ve aljinat mikropartiküllerine sahip kapsüllü aşularla yüksek düzeyde koruma sağladığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, primer aşılama için bu yöntemin kullanılması, tam bir korumayı garanti etmediği, ancak lactococcosise karşı güçlendirici aşılama stratejisi olarak iyi sonuçlar alınacağı bildirilmiştir (Romalde, 2004). Sonuç olarak, yağ-adjuvantlı aşularla intraperitoneal aşılama, lactococcosisi kontrol etmek için en etkin yöntemdir.

Bivalan aşı ile *A. hydrophila* ve *L. garviae* karşı adjuvantsız ve yağ bazlı olmayan adjuvant (Montanide ISA 763 AVG) formülasyonları aşılama gökkuşuğu alabalığının aşı sonrası immün yanıtı ve koruması incelenmiştir. Koruma seviyesi özellikle adjuvantsız ile aşılama balıklarda 90. günde *A. hydrophila* % 85.1 ve *L. garviae* karşı % 76.2 olarak belirlemiştir. Gökkuşuğu alabalığına uygulanan *L. garviae* ve *A. hydrophila* bivalan aşularının monovalan aşılardan daha iyi koruma sağladığı rapor edilmiştir. Adjuvantlı aşılama sonra 90. güne kadar *A. hydrophila* ve *L. garviae* karşı yüksek koruma seviyesinin RPS değerinin sırasıyla % 95 ve % 90 olduğu belirtilmiştir (Bastardo vd, 2012). Bu sonuçlar, mineral yağ bazlı olmayan adjuvantlı

maddelerin birlikte kullanılması ile enjekte edildiğinde diğer araştırmacıların bulguları ve bizim çalışmamız ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Adjuvantlar; depo etkisi antijenin yavaş bir şekilde doku veya kana salınmasına sağlar ayrıca humoral tepkiyi uzatır ve kuvvetlendirmektedir (Bailone, 2010, Ooyama, 2002). Nikoskelainen (2007)' e göre bir polivalan aşının başarısı genellikle antijen ile çapraz reaktivite ve farklı antijenler arasındaki rekabetle düzenlenmektedir. Bastardo vd, (2012) *L. garvieae* ve *A. hydrophila* karşı antikor bağışıklık tepkisinin kinetiğini ve biri Gram-pozitif diğeri Gram-negatif bakteri olan bu iki patojenin arasında antijenik kompetisyon (antijenik yariş –rekabet) olmadığını göstermişlerdir. Yapılan bu araştırmada da iki farklı Gram negatif ve bir Gram pozitif bakteri ile hazırlanan aşının antijenik kompetisyon göstermeksizin başarılı bir koruma oluşturduğu görülmüştür. Diğer alışmalarda, Atlantik somon (*Salmo salar*) ve gökkuşağı alabalıklarının polivalan aşılarla aşılandıktan sonra bağışıklık sisteminin daha gclendiğini destekler niteliktedir (Hoel, 1997 ve Nikoskelainen, 2007). Benzer şekilde bizim sonuçlarımızda da koruma seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir..

Yersiniozis, dünya çapında salmonid ve salmonid olmayan türleri etkileyen ekonomik açıdan önemli bir bakteriyel hastalıktır. Ticari aşılar mevcut olmakla birlikte, yaygın yayılım gösteren taşıyıcıların varlığı nedeniyle hastalık ortaya çıkmaktadır (Tobback vd, 2007, Tobback vd.,2009).

ERM hastalığına karşı ilk başarılı deneysel aşi alışmaları 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).

*Y. ruckeri* biyotip 1 ticari hale gelen ilk balık aşısıdır ve salmonid kültüründe sağlık yönetiminin ayrılmaz bir parçasıdır (Amend, 1981; Deshmukh vd, 2012; Tinsley vd, 2011). Yapılan ilk çalışmalar immersiyon aşılamasının *Y. ruckeri*'nin biyotip 1 aşılanmış balıklara önemli koruma sağladığını göstermiştir. Daha sonrasıda *Y.*



*ruckeri* biyotipi 2 hareketsiz formlarının enfeksiyon oluşturması ile (Chettri vd. 2013), son zamanlarda, biyotip 1 ve 2'yi içeren yeni bir ticari daldırma aşısının enfeksiyonlarına karşı üstün bir koruma sağladığı gösterilmiştir (Tinsley vd., 2011; Deshmukh vd., 2012)

Bu çalışmada, aşı uygulamasının iyileştirilmesine yönelik daha üstün ve uzun süreli bir koruma sağlamak amacıyla polivalan hazırlanan aşıların *Yersinia ruckeri*' yekarşı oluşturduğu koruma, RPS; 30 ve 90. günlerde %100, 120. günde 67,74 ve 270. günde %96,77 olarak tespit edilmiştir. Adjuvantsız olarak uygulanan aşının 120. gündeki dşuşe rağmen iyi bir koruma oluşturduğu tespit edilmiş ve 9 aya kadar korumanın devam ettiği grlmştir.

Gökkuşağı alabalıklarının yersiniozise karşı korunmasının geliştirilmesi ve koruma süresinin uzatılması üzerine çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda aşılamada rapel doz veya adjuvant kullanımının aşının hem etkililiğine hem de koruma süresini iyileştirmeye yönelik araştırmalar yapılmıştır (Raida vd 2011, Chettri vd 2012).

Soltani vd (2014) *Y. ruckeri* karşı Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant kullanmışlar, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yapılan çalışmaların sonucunda inaktive bakterin içinde formüle edilmiş sulu montanid kullanımının, gökkuşağı alabalıklarının yersiniozis'e karşı koruma seviyesini belirgin bir şekilde artırabildiğini bildirmişlerdir.

Jaafar vd (2015) yaptıkları bir çalışmada *Y. ruckeri* bakterinine (hem biyolojik tip 1 hem de 2 serotipi O1 ihtiva eden) yağ adjuvantı Montanide™ ISA 763 AVG ilave ederek etkilerini araştırmışlardır. Ortalama ağırlığı 19 g olan alabalıkları kontrol, ticari aşı (AquaVac® Relera™), deneysel aşı, adjuvantlı deneysel aşı ve sadece adjuvantlı olarak beş farklı gruba ayırmışlar challenge sonrası mortaliteleri kontrol gurubunda %100, ticari aşı ve sadece adjuvant enjekte edilen gruplarda % 60, deneysel aşıda %13, adjuvantlı deneysel aşıda ise %2,5 olarak tespit etmişlerdir. Bu zel yağ adjuvantının gökkuşağı alabalıklarında bağışıklık tepkileri için güçlü bir uyarıcı olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada kullanılan gluklan ve Freund's Complete Adjuvant (FCA) ile polivalan hazırlanan aşuların *Yersinia ruckeri*' yekarşı oluşturduğu koruma, RPS; gluklanlı grupta, 30. günde %96,77 90. günde %100, 120. günde %83,87 ve 270. günde %93,54 olarak tespit edilmiştir. FCA'lı grupta RPS; 30. günde %100, 90 ve 120. günde % 96,77 ve 270. günde %100 olarak belirlenmiştir. FCA içeren adjuvanthlı aşuların iyi bir koruma oluşturduğu tespit edilmiş ve 9 aya kadar korumanın devam ettiği görülmüştür. Bu sonuçlar diğer araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir.

Vibriozise karşı ilk aşı uygulaması 1970'li yıllarda hiperozmatik infiltrasyon yöntemi ile uygulanmıştır. Balıkların maruz kaldığı strese subklinik enfeksiyonlara neden olduğundan direk immersiyon yönteminin daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır (Evelyn, 1984; ağırgan, 2004;Sommerset vd.,2005; Ekici, 2010). Vibriozise karşı yüksek düzeyde bağışıklık elde edilmesi için en uygun yöntemin enjeksiyon (i.p.) olduğu saptanmıştır. Bu yöntemi sırasıyla banyo ve oral yöntem izlemektedir (Ellis,1988). Günümüzde ticari vibriozis aşuların çoğu enjeksiyon ve immersiyonla son yıllarda da oral yolla verilecek şekilde formüle edilmiştir (Ellis, 1988; Midtlyng, 1997).

Pisi balıklarında polivalan aşular üzerine yapılan bir çalışmada, *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae*, *V. anguillarum* ve *V. harveyi* patojenleri monovalan, divalan (*E. tarda* + *V. anguillarum*), polivalan (*E. tarda* + *V. Anguillarum* + *S. iniae*) ve polivalan (*E. tarda* + *V. Anguillarum* + *S. iniae* + *V. harveyi*) aşular 1:1 oranında Freund's incomplete adjuvant eklenerek uygulanmış, bu çalışmada monovalan aşuların enfeksiyonlara karşı korumada etkisiz olduğu, divalent aşının nispeten daha etkili olduğu belirlenmiştir. Su rnleri yetiştiriciliğinde *E. tarda* ve *V. anguillarum* ile ilgili hastalıkların kontrolünde bivalan aşuların yararlı olabileceği bildirilmiştir (Sun vd, 2011).

Ekici (2010), gökkuşağı alabalıklarında (*Onchorhynchus mykiss*) *V. anguillarum*'a karşı farklı aşılama yöntemlerinin etkinliği araştırmış,deneysel enfeksiyon uygulamaları sonucunda en iyi korumanın 120. güne kadar % 100 RPS değerı ile intraperitoneal enjeksiyon uygulanan grupta olduğu bildirmiştir. İmmersiyon (% 30 RPS) ve oral yolla aşılamanın (% 57 RPS) sadece 30 gün boyunca koruma

sağladığını immersiyon+oral aşı uygulamasının ise korumayı 60. güne (% 30.5 RPS) kadar uzattığı saptamıştır.

Tayvan'da yapılan bir çalışmada ticari olarak üretilen sıcak su balıkları olan Cobia (*Rachycentron canadum*), balıklarında hastalıklara en sık sebep olan patojenler olan *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* ve *Photobacterium damsela subsp. piscicida* formalinle inaktive edilerek yağ bazlı bir adjuvantla birlikte i.p. olarak enjekte edilmiştir. Akvaryum ortamında yapılan challenge uygulamasında *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* ve *P. damsela subsp. piscicida* karşı RPS oranları sırasıyla % 93.8, % 91.1 ve % 84.7 olarak tespit edilmiştir. Cobia balıklarında hem laboratuvar hem de saha denemesinde polivalan olarak uygulanan tek doz aşının spesifik antikorların oluşumu için yeterli olduğunu bildirmişlerdir (Lin vd, 2006).

Bu çalışmada, polivalan hazırlanan aşılarda *V. anguillarum*' a karşı oluşturduğu koruma, RPS; 30. gün %96,77, 90, 120 ve 270. günlerde %100 olarak tespit edilmiştir. Adjuvantsız olarak uygulanan aşı 9 aya kadar çok iyi bir koruma sağladığı görülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan glukoz ve Freund's Complete Adjuvant (FCA) ile polivalan hazırlanan aşılarda *V. anguillarum*' a karşı oluşturduğu koruma, RPS; glukozlu grupta, 30. günde %90,32, 90. günde %93,54, 120. günde %90,32 ve 270. günde %96,77 olarak tespit edilmiştir. FCA'lı grupta RPS; 30. günde %87,09, 90. günde %100 ve 120. günde % 93,54 ve 270. günde %87,09 olarak belirlenmiştir. Adjuvantsız aşılarda 9 ay boyunca iyi bir koruma oluşturmasına rağmen en iyi sonuç adjuvantsız rapel uygulanan grupta tespit edilmiştir.

Günümüzde immersiyon yöntemi ile vibriosis ve yesinosis karşı immunizasyonda oldukça başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen, diğer bakteriyel balık hastalıkları için yeterli seviyede koruma sağlanamamaktadır (Ellis, 1988, Lillehaug, 1989).

İmmersiyon aşılması, mukozal yüzeylerin temas ettikleri patojenleri tanıma yeteneği üzerinde çalışır. Balıklar seyreltilmiş aşı içeren su içine batırıldığında, aşısındaki askıdaki antijenler deri ve solungaçlar tarafından adsorbe edilir. Daha sonra, deri ve solungaç epitelinde bulunan özelleşmiş hücreler aktif hale gelerek balıklar

daha sonra canlı patojenlere maruz kaldıklarında balıkları korumaktadır. İmmersiyon aşılamanın sınırlamaları, bağışıklık süresinin çok uzun olmadığı ve hastalığın daha uzun süreler boyunca hakim olduğu durumlarda bir güçlendirici aşıya ihtiyaç duyulmasıdır. Ayrıca, yöntem, maliyet etkinliği ve aşılama yoluyla indüklenen streslerden ötürü daha büyük boyutlu balıklar için pratik değildir (Komar vd, 2004; Mohamed ve Soliman, 2013)

Raida ve Buchmann (2007) yaptıkları bir araştırmada, su bazlı *Y. ruckeri* bakterinin gökkuşağı alabalıklarına ip olarak enjekte edilmiş hem doğal hem de spesifik adaptif bağışıklık yanıt genlerinin ekspresyonunun sıcaklığa bağlı olduğunu göstermişlerdir. Araştırmalarında suboptimal sıcaklık (5 °C), fizyolojik optimumsıcaklık (15 °C) ve alabalığa göre çok yüksek olduğu düşünülen sıcaklık (25 °C) seviyeleri değerlendirilmiş, aşılama balıklarda bağışıklık ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerine yoğunlaşmış ancak koruma değerlendirilememiştir. Bununla birlikte, hem sitokin tepkisinin hem de antikorların gelişmesinin en yüksek 25 °C' de olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmaları ile düşük su sıcaklığının ERM'ye karşı aşılamaadaki yetersizliğinin nedeni olabileceğini vurgulamışlar ve gökkuşağı alabalığındaki *Y. ruckeri*'ye karşı koruyucu bağışıklığın sıcaklığa bağlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada, polivalan hazırlanan aşılar 3 gramlık alabalıklara 1:10 oranında sulandırılarak 60 sn süreyle immersiyon yöntemiyle uygulanmış ve ilk aşılama 1 ay sonra aşı tekrarı yapılmıştır. Aşılama 90, 120 ve 270. günlerde aşı ve kontrol gruplarına LD<sub>60</sub> dozunda patojenler intraperitoneal enjeksiyon ile verilerek epruvasyon yapılmıştır. *V. anguillarum*' karşı oluşturduğu koruma, RPS; 90. günde %96,77; 120. günde %46,66; 270. günde %25,8 olarak tespit edilmiştir. *Y. ruckeri* karşı oluşturduğu koruma, RPS; 90. günde %32,25; 120. günde %22,58; 270. günde %9,67 olarak tespit edilmiştir. *L. garvieae* karşı oluşturduğu koruma, RPS; 90. günde %74,19; 120 ve 270. günlerde %100 olarak tespit edilmiştir.

Gökkuşağı alabalıklarında PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile 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 bakterilerin serumlarında daha yüksek türeli bir antikor seviyesinin olduğu 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 olduğu serolojik testlerle tespit edilmiştir. İmmun balıklara patojen bakteri verildiğinde (challenge) koruyucu immunitenin çok iyi geliştiği görülmüş; kontrol grubu balıklarda % 85 oranında ölüm görülürken, immun balıklarda hayatta kalma oranının % 100 olduğu tespit edilmiştir (Kubilay,1997).

Evenhuis vd. (2005) yaptıkları bir çalışmada formalin ile inaktive edilen *Y.ruckeri* ile aşılamanın ardından gökkuşağı alabalıklarında hücresel ve humoral bağışıklık tepkilerinin koruyucu özelliklerini kıyaslamışlardır. Bu çalışmada 3 farklı aşılama protokolü oluşturmuşlar (daldırma aşılması; enjeksiyon aşılması; daldırma aşılması ve ardından bir enjeksiyon yöntemiyle rapel) ve adaptif immün yanıtın dolaşımdaki humoral ve hücresel bileşenlerini test etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda koruyucu komponentin hemen hemen sadece humoral cevap ile bulunduğu ve bu korumanın yüksek moleküler ağırlıklı IgM ile örtüştüğünü göstermişlerdir.

Antikor titresi aşının etkinliğinin tespiti için kullanılan bir diğer parametredir. Li vd. (2005), pisi balıklarının formalin ile inaktive edilen *V. anguillarum*'a karşı i.p. olarak aşılması ile antikor titresinin aşılama sonrası 10-30 gün aralıklarla arttığını ve hatta 50 gün sonrasına kadar devam ettiğini kanıtlamıştır.

Sonuç olarak, laktokokkosis, yersiniozis ve vibriosis enfeksiyonlarına karşı hazırlanan adjuvantlı ve rapel uygulaması yapılan polivalan aşılamanın gökkuşağı alabalıklarında yüksek koruma düzeyleri sağladığı ve bu korumanın 9 ay devam ettiği görülmüştür. Sahada bu enfeksiyon salgınlarına karşı polivalan aşının kullanılması üç hastalığa karşı koruma sağlayacaktır. Bu hastalıklara karşı yapılan polivalan immersiyon aşılarda lactococcosise karşı iyi bir koruma oluşmuştur. İmmersiyon aşılama uygulamalarının tekrarlanması uygun olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- Aakre, R., Wergeland, H. I., Aasjord, P. M., Endresen, C., 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) to *Aeromonassalmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing B-1, 3-M- glucan as aduvant. Fish and Shellfish Immunology,4, 47-61.
- Acton RT, Weinheimer PF, Hall SJ, Niedermeier W, Shelton E, Bennett JC, 1971. Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 68, 107–111.
- Akaylı, T. 2001. Kültür Çipura balıklarında (*Sparus aurata*, L.1758) Vibriozis'in Elisa ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi. İstanbul Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, 77s. İstanbul.
- Akhlaghi M, Munday BL, Whittington RJ.1996. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). Journal of Fish Diseases, 19,251–8.
- Alpbaz, A., 2005. Su Ürünleri Yetiştiriciliği. Alp Yayınları, 576s, İzmir.
- Altinok, I., Capkin, E. Karsi, A., 2015. Succinate dehydrogenase mutant of *Listonella anguillarum* protects rainbow trout against vibriosis. Vaccine, 33(42), 5572-5577.
- Altun, S., Diler, O., Adiloglu, A.K., 2004. Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16S rDNA sequencing.Bulletin of the European Association of Fish Pathologists,24(2), 119-125pp.
- Altun, S.,2001. *Yersinia ruckeri* suşlarının bazı antijenik ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Su ürünleri yetiştiriciliği ABD. Doktora Tezi,105s. Isparta.
- Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. Developments in biological standardization. 49,447–454.
- 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., Dixon, O. W., 1984. Fish biologics: antisera for fish disease diagnosis. Symposia Biologica Hungarica, 23, 251-260.
- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Diker, K.S.,1994. İmmunoloji. Medisan Yayınevi,394s. Ankara.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyüpoğlu, M., 2002. Balık Hastalıkları. Medisan Yayınevi, ISBN 75-7774-53-7, Ankara.

- Arda, M.,1998. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayinevi,490s. Ankara.
- Arkoosh MR, Kaattari SL., 1991. Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Developmental and Comparative Immunology* 15, 279–293.
- Arkoosh, M.R., Kaattari, S.L., 1993. Quantitaion of Fish Antibody to a Specific Antigen by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303, 15-24p. USA.
- Austin, B., Austin, D.A., 1999. *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*, Third (Revised) Edition, Praxis Publishing Ltd, Chichester, 1-85233-120-8.
- Austin, B., Lee, J.V., 1992. *Aeromonodaceae and Vibrionaceae.*( Board, R.G., Jones, D. And Skinner, F.A. Eds.) In: *Identification in Applied and Environmental Microbiology*. Blackwell, London. Society for Applied Bacteriology Series. 29, 163–182.
- Austin, B., Austin, D.A.,2007. *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish* 4th edition. Springer-Praxis publishing, Chichester, 594p.UK.
- Austin, B.,Van Pouce,A.,1993.A Gram-positive lactic-acid bacterium causing steady mortalities in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, in the UK.*Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 13,114-118.
- Bailone RL, Martins ML, Mouriño JLP, Vieira FN, Pedrotti FS, Nunes GC, 2010. Haematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42:221e7.
- Barnes, A. C., Guyot, C., Hansen, B. G., Mackenzie, K., Horne, M. T., Ellis, A. E. 2002. Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Fish and shellfish immunology*, 12(2), 155-168.
- Bastardo, A., Ravelo, C., Castro, N., Calheiros, J., Romalde, J. L. 2012. Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish and shellfish immunology*, 32(5), 756-761.
- Bercovier H, Ghittino C, Eldar A. 1997. Immunization with bacterial antigens: infection with streptococci and related organisms. *Developments in biological standardization*, 90, 153–60.
- Boes M., 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecular Immunology* 37, 1141–1149.

- Boesen, H. T., Larsen, J.L., Ellis, A.E., 1999. Bactericidal activity by sub-agglutinating levels of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) antiserum to *Vibrio anguillarum* serogroup O1. *Fish and Shellfish Immunology*, 9, 633–636.
- Bøgwald, J., Dalmo, R. A., 2012. Developments in adjuvants for fish vaccines. In *Infectious Disease in Aquaculture* (pp. 244-274). Woodhead Publishing.
- Bohn, J. A., BeMiller, J. N., 1995. (1-3)- $\beta$ -D-Glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 3–14.
- Bowden TJ., 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 373–383.
- Bowden TJ, Cook P, Rombout JHWM., 2005. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 413–427.
- Brudeseth, B. E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B. N., Lindmo, K., Løkling, K. E., Bordevik, M., Gravningen, K. 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish and shellfish immunology*, 35(6), 1759-1768.
- Bursch, R.A., 1982. Enteric Redmouth Disease. Symposium International de Talloires, 10-12 May 1982, Les Antigenes des Poissons. Collection Fondation Mercei Merieux, 201-224.
- Busch, R. A., 1996. Polyvalent vaccines in fish: the interactive effects of multiple antigens. *Developments in biological standardization*, 90, 245-256.
- Çağırğan, H., Rogers, C., Basurco, B. 2009. The use of veterinary drugs and vaccines in Turkey. *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires Méditerranéens*, (86), 29-34.
- Castillo A, Sanchez C, Dominguez J, Kaattari SL, Villena AJ., 1993. Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology* 17, 419–424.
- Ceschia G., Giorgetti E., Mazzolini E., Danielis L., A. Passera, 1998. Vaccination against streptococcosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, 14, 185-187.
- Chen, S.C., Lin, Y.D., Liaw, L.L., Wang, P.C. 2001. *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms*. 45, 45-52.
- Chettri, J. K., Deshmukh, S., Holten-Andersen, L., Jafaar, R. M., Dalsgaard, I., Buchmann, K. 2013. Comparative evaluation of administration methods for a vaccine protecting rainbow trout against *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 infections. *Veterinary immunology and immunopathology*, 154(1), 42-47.



- Collins, C.H., Lyne, P.M.,1976. Microbiological Methods.Butterworths, 521p. London-Boston.
- Çağiltay, F.,2011. İç Su Balıkları Yetiştiriciliği. Nobel Yayınları, 290s, 2. Baskı, Ankara.
- Çağırğan, H., 1993. Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*,L) ve levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma. Ege Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı Doktora Tezi,117s, İzmir.
- Çağırğan, H., 2004. Levrek Yavrularında (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) Vibriozise Karşı Aşı Geliştirilmesi. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 21(3-4), 271– 274.
- Çağırğan, H., Yürekli Türk, 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, 131s. Book of Abstract.
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., Joshi, S. K., 2017. Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens: global status and current trends. Reviews in Fisheries Science and Aquaculture, 25(3), 184-217.
- Danneving BH, Lauve A, McPress LC, Landsverk T., 1994. Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. Fish and Shellfish Immunology 4, 3–18.
- Davis JM, Clay H, Lewis JL, Ghori N, Herbomel P, Ramakrishnan L.,2002. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. Immunity 17, 693–702.
- Deshmukh, S., Raida, M.K., Dalsgaard, I., Chettri, J.K., Kania, P.W., Buchmann, K., 2012. Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Immunology and Immunopathology.. 145, 379–385.
- Diler O., Altun S., Adiloglu A.K., Kubilay A., B.I. Isikli, 2002. First occurrence of streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists.22, 21-26.
- Duff, D. 1942. Article usage statistics center the oral immunization of trout against bacterium salmonicida. The Journal of Immunology., 87–94.
- Ebanks, R.O., Dacancy, A., Goguen, M., Pinto, D.M., Ross, N.V., 2004. Differential Proteomic analysis of *Aeromonas hydrophila* outer membrane proteins in response to low iron and in vivo growth conditions. Proteomics 4. 1074-1085.
- Eccles, R., 2005. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. The Lancet Infectious Diseases, 5(11), 718–725.

- Ekici, S., Diler, Ö., Altun, S., 2005. Kültürü yapılan balıklarda görülen Vibriosis enfeksiyonları. XIII Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 01-04 Eylül 2005, Çanakkale.
- Ekici, S., 2010. Gökkuşığı Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Vibriosis'e Karşı Aşı Uygulamasının Bağışıklık Sistemine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 117s, Isparta
- Elcombe BM, Chang RJ, Taves CJ, Winkelhake JL., 1985. Evolution of antibody structure and effector functions: comparative hemolytic activities of monomeric and tetrameric IgM from rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. Comparative Biochemistry and Physiology 80, 697–706.
- Eldar A. and C. Ghittino, 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): similar, but different diseases. Diseases of Aquatic Organisms., 36, 227-231.
- Eldar, A. Horovitz, A., Bercovier, H. 1997. Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology. 56, 175-183.
- Ellis, A.E., 1988a. General Principles of Fish Vaccination. In: Fish Vaccination, (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press Ltd. 1-19p. London
- 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., 1997. Vaccination Against Bacteria. Fish Vaccination Training Course. 14– 17 April, Netherland.
- 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.
- Ellis, A.E., 1999. Immunity to Bacteria in Fish. Fish and Shellfish Immunology, 9, 291–308.
- Emre Y., Kürüm V., 2007. "Havuz Ve Ağ Kafeslerde Alabalık Yetiştiriciliği", Posta Basım, İstanbul.
- Evelyn, T.P.T., 1984. Immunisation against pathogenic Vibriosis. In Symposium on Fish Vaccination. In: Symposium on fish vaccination. Theoretical Background and Practical Results on Immunization Against Infectious Diseases. O.I.E., 20-22 February, 121-150p. Paris.
- Evenhuis, J. P., Wiens, G. D., Wheeler, P., Welch, T. J., LaPatra, S. E., & Thorgaard, G. H. 2014. Transfer of serum and cells from *Yersinia ruckeri* vaccinated doubled-haploid hot creek rainbow trout into outcross F1 progeny elucidates mechanisms of vaccine-induced protection. Developmental and Comparative Immunology, 44(1), 145-151.

- Eyngor M., Zlotkin A., Chittino C., Prearo M., Douet G., Chilmonczyk S., A. Eldar, 2004. Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5132-5137.
- Ferguson HW., 1989. *Systemic Pathology of Fish. A text and atlas comparative tissue response in diseases of teleost*. Iowa state University Press. Ames. Iowa, USA. 5–103.
- Ghittino C. 1999 La estreptococosis en los peces. *Rev Aquatic*;6.
- Gudding, R., Van Muiswinkel, W. B., 2013. A history of fish vaccination: Science-based disease prevention in aquaculture. *Fish Shellfish Immunology*, 35, 1683–1688.
- Hayran, M., Özdamar, O., 1995. Bilgisayar istatistik ve Tıp. HYB Medikal Yayın Birimi (MEBAR). 427-450s. Ankara.
- Hayward CJ, Bott NJ, Nowak BF., 2009. Seasonal epizootics of sea lice, *Caligus* spp., on southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau), in a long-term farming trial. *Journal of Fish Disease* 32, 101–106.
- Hoel K, Saloni K, Lillehaug A. 1997. Vibrio antigens of polyvalent vaccines enhance the humoral immune response to *Aeromonas salmonicida* antigens in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 7, 71e80.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, 485-487p.
- Itami T, Kondo M, Sukanuma A, Abe T, Nakagawa A, Suzuki N, 1996. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 19, 185–7.
- Iwama, G., Nakanishi, T. 1996. “The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment.” Academic Press, San Diego, CA.
- J. Li, D.M. Gao, Q. Wang, J.Y. Wang, Q.Y. Wang, 2005. Efficacy of Vibrio anguillarum antigen administered by intraperitoneal injection route in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel), *Aquaculture Research*, 36, 1104e1111.
- Jaafar, R. M., Chettri, J. K., Dalsgaard, I., Al-Jubury, A., Kania, P. W., Skov, J., & Buchmann, K. 2015. Effects of adjuvant Montanide™ ISA 763 A VG in rainbow trout injection vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish and shellfish immunology*, 47(2), 797-806.
- Kav, K., Erganiş, O. 2008. Balıklarda Bağışıklık Sistemi. *Veteriner Bilimleri Dergisi*. 24, 1, 97-106

- Komar, C., Enright, W. J., Grisez, L., Tan, Z., 2004. Understanding fish vaccination. *Aqua Culture Asia Pacific Magazine*, 27-9.
- Korun, J., Timur, G., 2008. Marine vibriosis associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Journal of Fisheries Sciences.com* (online), 2(1),66-76.
- Kubilay A., Altun,S. Ulukoy,G., Ekici,S., Diler,O. 2008. Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Lactococcus garvieae* using vaccine mixtures. *Israeli Journal of Aquaculture,December Bamidgeh* 60(4), 265-270.
- Kubilay, A., Timur, G., 2001. *Yersinia ruckeri* Bakterini ile İmmunize Edilen Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Antikor Üretimini IFAT ve ELISA Teknikleri ile Saptanması."Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.25,437-445.
- Kubilay, A.,1997. Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) patojen bakteri *Yersinia ruckeri*'ye Karşı Antikor Üretimi ve Tespiti Üzerinde Bir Araştırma. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.117s. Isparta
- Kusuda R., F. Salati, 1999. *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. pp. 303- 317. In: P.T.K. Woo, D.W. Bruno (eds.). *Fish Diseases and Disorders Viral, Bacterial and Fungal Infections*, vol. 3. CABI Publ.
- Lam, K. L., Cheung, P. C. K.,2013. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*, 2(1), 45-64.
- Langevin, C., Aleksejeva, E., Passoni, G., Palha, N., Levraud, J. P., Boudinot, P. 2013. The antiviral innate immune response Reviews In *Fisheries Science & Aquaculture* 211 in fish: evolution and conservation of the IFN system. *The Journal of Molecular Biology*, 425(24), 4904–4920.
- Li, A., Yang, W., Hu, J., Wang, W., Cai, T., Wang, J., 2006. Optimization by orthogonal array design and humoral immunity of the bivalent vaccine against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio fluvialis* infection in crucian carp (*Carassius auratus* L.). *Aquaculture Research*, 37(8), 813-820.
- Lillehaug, A., 1989. Oral immunisation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, againsts vibriosis with vaccines protected againsts digressive degraation. *Journal of Fish Diseases*.12, 6, 579-584.
- Lin, J. H. Y., Chen, T. Y., Chen, M. S., Chen, H. E., Chou, R. L., Chen, T. I., Yang, H. L. 2006. Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protectiveimmunity. *Aquaculture*, 255(1-4), 125-132.
- Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bogwald J, Dalmo RA., 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 429–439.

- Meeusen, E. N., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P.-P., Jungersen, G., 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 20, 489–510.
- Midtlyng, P.J., 1997. Novel vaccines and New vaccination Strategies for Fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 17 (6), 239–243.
- Mohamed, L. A., Soliman, W. S. E., 2013. Development and efficacy of fish vaccine used against some bacterial diseases in farmed Tilapia. *Natural Science*, 11, 120-128.
- Morrison RN, Nowak B., 2002. The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 11, 46–54.
- Muktar, Y., Tesfaye, S., Tesfaye, B. 2016. Present status and future prospects of fish vaccination: A review. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 7, 2.
- Muzquiz, J. L., Royo, F.M., Otega, C., Blas, I., Ruiz, I., Allonso, J. L., 1999. Pathogenicity of Streptococcosis in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Dependence on age of diseased fish *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 19(3), 114-119.
- Nieto, J.M., Devesa, S., Quiroga, I., Toranzo, A.E. 1995. Pathology of Enterococcus sp. Infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L., *Journal of fish diseases*. 18(2), 21-30
- Nikoskelainen S, Verho S, Jarvinen S, Madetoja J, Wiklund T, Lilius E. 2007. Multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of specific responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunology*, 22, 206e17.
- Ooyama T, Hirokawa Y, Minami T, Yasuda H, Nakai T, Endo M., 2002. Cell surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 51, 169e77.
- Peng, B., Ye, J. Z., Han, Y., Zeng, L., Zhang, J. Y., Li, H. 2016. Identification of polyvalent protective immunogens from outer membrane proteins in *Vibrio parahaemolyticus* to protect fish against bacterial infection. *Fish and shellfish immunology*, 54, 204-210.
- Press CM, Dannevig BH, Landsverk T., 1994. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 4, 79–93.
- Prieta J, Dome'nech AM, Ferna' ndez-Garaiza' bal JF, Collins MD, Rodri' gues UM, Jones D, 1993. Lactococcosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Medicine*, 10, 367–73.
- Rahman, M.H., Kawai, K., 2000. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish. *Fish and Shellfish Immunology*, 10, 379-382.

- Raida MK, Nylen J, Andersen L, Buchmann K. 2011. Association between plasma antibody response and protection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. Public Library of Science, 6(6), 1e7.
- Raida, M.K., Buchmann, K., 2007. Bath Vaccination of Rainbow Trout Against Yersiniosis- When And How Does It Work .The European Association of Fish Pathologists, 13<sup>th</sup> International Conference of Fish and Shellfish Diseases, 17-22 september, Grado Italy. (Book of Abstracts)
- Ravelo C, Magarin, os B, Herrero MC, Costa L, Toranzo AE, Romalde JL. 2005. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 251:153–8.
- 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. Journal of Fish Biology, 36, 159-173.
- Robertsen B., 2006. The interferon system of teleost fish. Fish and Shellfish Immunology 20, 172–191.
- Romalde J.L., Luzardo-Alvarez A., Ravelo C., Toranzo A.E. and J. Blanco-Mendez, 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. Aquaculture, 236:119-129.
- Romalde JL, Luzardo-Alvarez A, Ravelo C, Toranzo AE, Blanco-Me´ndez J. 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. Aquaculture;236:119–29.
- Rombout JH, Huttenhuis HBT, Picchiatti S, Scapigliati S. 2005. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. Fish and Shellfish Immunology 19, 441–455.
- Ross, A. J., Rucker, R. R., Ewing, W. H. 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian journal of microbiology, 12(4), 763-770.
- Salati F., Angelucci G., Viale I., R. Kusuda, 2005. Immune response of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to *Lactococcus garvieae* antigens. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists., 25(1):40-48.
- Salati, F., Tassi, P., Bronzi, P., 1996. Isolation of an Enterococcus-like bacterium from diseased Adriatic sturgeon, *Acipenser naccarii*, farmed in Italy. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 16(3), 96-100.
- Sanchez C, Alvarez A, Castillo A, Zapata A, Villena A, Dominguez J., 1995. Two different subpopulations of Ig-bearing cells in lymphoid organs of rainbow trout. Developmental and Comparative Immunology 19, 79–86.
- Schnick, R.A., Alderman, D.J., Armstrong, R., Le Gouvello, R., Ishihara, S, Lacierda, E.C., Percival, S., Roth, M., 1997. World wide aquaculture drug

and vaccine registration progress, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 17: 251–260.

- Schroder MB, Villena AJ, Jorgensen TO., 1998. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Developmental and Comparative Immunology 22, 507–517.
- Soltani, M., Shafiei, S., Yosefi, P., Mosavi, S., Mokhtari, A., 2014. Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and shellfish immunology, 37(1), 60-65.
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., Frost, P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. Expert review of vaccines, 4(1), 89-101.
- Sorensen, U.B., Larsen, J.L., 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology, 593-597.
- Strand, J.A., Fujihara, M.P., Burdett, R.D., Poston, T.M., 1977. Suppression of the primary response in rainbow trout, *Salmo gairneri*, sublethally exposed to tritiated water during embryogenesis. Journal of Fisheries Research Board of Canada. 34, 1293-1304.
- Sun, Y., Liu, C. S., & Sun, L., 2011. A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. Fish and shellfish immunology, 31(4), 595-599.
- Sveinbjornsson B, Olsen R, Paulsen S., 1996. Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Disease 19, 349–355.
- Tafalla C, Figueras A, Novoa B., 2001. Viral hemorrhagic septicemia virus alters turbot *Scophthalmus maximus* macrophage nitric oxide production. Disease of Aquatic Organism 47, 101–107.
- Tafalla, C., Bøgwald, J., Dalmo, R. A. 2013. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. Fish and Shellfish Immunology, 35(6), 1740-1750.
- Tanrikul, T., 2007. Vibriosis as an Epizootik Disease of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(10), 1733-1737.
- Thompson, K.D., Adams, A., 2004. Current Trends in Immunotherapy and Vaccine Development for Bacterial Diseases of Fish. In: Molecular Aspects of Fish and Marine Biology (Vol-3): Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases (Ed. by Leung K.Y.), World Scientific Publishing Co., 313-362.
- Thuvander, A., Hongolo, I., Jansson, E., Sundquist, B., 1987. Duration of protective immunity and antibody titres measured by ELÝSA after vaccination of

- rainbow trout, *Salmo gairneri richardson*, against vibriosis. Journal of Fish Diseases, 10, 479-486.
- Timur, G., Timur, M., 1991. An outbreak of enteric redmouth disease in farmed rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) in Turkey. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 11(5), 182-183.
- Timur, G., Korun, J., 2004. First outbreak of vibriosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. İstanbul University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 18,1-9.
- Tinsley, J.W., Lyndon, A.R., Austin, B., 2011. Antigenic and cross-protection studies of biotype 1 and biotype 2 isolates of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). The Journal of Applied Microbiology. 111, 8–16.
- Tippets, W.E., Moyle, P.B., 1978. Epibenthic feeding by rainbow trout in the McCloud River. Journal of Animal Ecology, 47, 549-559.
- Tobback E, Decostere A, Ermans K, Haesebrouck FH, Chiers K., 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. Journal of Fish Diseases, 30(5), 257e68.
- Tobback E, Decostere A, Hermans K, Ryckaert J, Duchateau L, Haesebrouck F, 2009. Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms, 84, 219e28.
- Toranzo, A. E., Devesa, S., Heinen, P. Ríaza, A., Nunez, S., Barja, J.I. 1994. Streptococcosis in Cultured Turbot Caused by Enterococcus-like bacterium. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists., 14(1),19-23.
- Toranzo, A.E., Magarinos, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture, 246, 37-61.
- Tort, L., Balasch, J. C., & Mackenzie, S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. Immunología, 22(3), 277-286.
- Türk, N., Yabanli, M., Baba, E., Ontas, C., & Aydin, M. A. 2013. Detection Of Bacterial Diseases And Determination Of Antibacterial Susceptibilities Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) In Turkey. Journal of FisheriesSciences. com, 7(4), 351.
- Türkiye istatistik kurumu, 2018. Su ürünleri istatistikleri. (Erişim tarihi:04.2019). [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1005](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005)
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., & Moran, G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Veterinarni Medicina, 56(10), 486-503.
- Vendrell D, Balca'zar JL, Ruiz-Zarzuola I, De Blas I, Girone's O, Muzquiz JL., 2004. Evaluation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of Ichtiovac-Lg, a vaccine against *Lactococcus garvieae*. In: Proceedings of the sixth



international symposium on fish immunology, Nordic Society for Fish Immunology, Turku, Finland.

Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J. L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 29(4), 177-198.

Watts M, Munday BL, Burke CM., 2001. Immune responses of teleost fish. Australian Veterinary Journal 79, 570–574.

Yılmaz, E., Yılmaz, A., Bilgin, B., 2011. Alabalık yetiştiriciliği. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 4 (2), 37-39, 2011

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutierrez-de Frias, C., Cortes, A. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. Fish and shellfish immunology, 20(2), 126-136.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Pınar YILDIRIM  
Doğum Yeri ve Yılı : İzmir,1987  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : yildirimpinar06@gmail.com

### Eğitim Durumu

Lise : Bakırköy Gürlek Nakipoğlu Lisesi  
Lisans : SDÜ, Eğirdir Su Ürünleri Fak., Su Ürünleri Mühendisliği

### Yayımları

- Yıldırım, P., Kubilay, A., Güney, Ş., (2013).*Lactococcus garvieae* ve *Vibrio anguillarum* Balık Patojenlerine Karşı Bazı Bitkisel Yağların *in vitro* Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi, Yunus Araştırma Bülteni (3): 33-37.
- Didinen, B. I., Yardımcı, B., Onuk, E. E., Metin, S., &Yıldırım, P. (2014). Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): new histopathological observations, phenotypic and molecular identification. *Revue de Medecine Veterinaire*, 165, 12-19.
- Kubilay, A., Ciftci, S., Yıldırım, P., Didinen, B., Metin, S., Demirkan, T., Ozen, M.R., Oidtmann, B., (2014). First Observation of Red Mark Syndrome (RMS) in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) in Turkey., *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 34(3) 2014, 95.
- S. Metin, A. Kubilay, E.E. Onuk2, B.I. Didinen and P. Yıldırım, (2014). First Isolation of *Staphylococcus warneri* from Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Broodstocks in Turkey. *Bull.Eur.Ass. Fish.Pathol.*34(5),165
- Uluköy, G., Metin, S., Kubilay, A., Güney, Ş., Yıldırım, P., Güzel-Seydim, Z., Gümüş, E., (2016).The Effect of Kefir as a Dietary Supplement on Nonspecific Immune Response and Disease Resistance in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). *Journal of the World Aquaculture Society*,
- Metin, S., Didinen, B. I., Kubilay, A., Bülent, B. A. Ş., Yıldırım, P., Wiklund, T., (2019). First Report of *Candida* sp. from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Fry in Turkey. *Acta Aquatica Turcica*, 15(1), 55-59.
- Ekici, S., Yıldırım, P., Kubilay, A., Diler, Ö., Levrek Balıklarından İzole Edilen *V.alginolyticus* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi,

XVI. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Sözlü Bildiri, Antalya, 25-27 Ekim 2011.

Yıldırım, P., Kubilay, A., Güney Ş., *Lactococcus garvieae* ve *Vibrio anguillarum* Balık Patojenlerine Karşı Bazı Bitkisel Yağların In Vitro Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi, Balıkçılık ve Akuatik Bilimler Sempozyumu (FABA), Sözlü Bildiri ve Poster, Erzurum, 2013.

Güney, Ş., Metin, S., Uluköy, G., Kubilay, A., Gümüş, E., Güzel-Seydim, Z., Kök-Taş, T., Diler, Ö., Yıldırım, P., Kefir İlaveli Yemle Beslenen Gökkuşığı Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Spesifik Olmayan İmmun Sistem Parametreleri, 17. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Sözlü Bildiri, İstanbul, 3-6 Eylül 2013.

Yıldırım, P., Sütçü, E., Arslantaş, G., Kubilay, A., Bazı Probiyotik Bakterilerin *Aeromonas hydrophila* Suşlarına Karşı in vitro Olarak Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi, 17. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Poster, İstanbul, 3-6 Eylül 2013.

Sütçü, E., Arslantaş, G., Yıldırım, P., Kubilay, A., Yıldız, E.B., Balık Patojeni *Aeromonas hydrophila* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi, 17. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Poster, İstanbul, 3-6 Eylül 2013.

Ayşegül Kubilay, Sercan Çiftçi, Pınar Yıldırım, Behire Işıl Didinen, Secil Ekici, Tamer Demirkan, Birgit Oidtmann, First Observation of Red Mark Syndrome (RMS) in Cultured Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*( Walbaum, 1792) in Turkey 1 st International Symposium on Aquatic Sciences and Technology.15-17 May 2014 Cyprus.

Pınar YILDIRIM, Ayşegül KUBİLAY, Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* Patojenlerine Karşı Polivalan Aşının Etkinliğinin Belirlenmesi, 18. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Poster, İzmir, 3-6 Eylül 2015.

Ayşegül Kubilay, Sercan Çiftçi, Pınar Yıldırım, Erkan Gümüş. Assessment of Vaccine Strain Compared to The Virulence of Different Isolates of *Aeromonas hydrophila* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish (EADP 2015), the Auditorio Alfredo Kraus, Las Palmas de Gran Canaria, Spain from September 7th to 11st, 2015.

Ayşegül Kubilay, Seçil Metin, Pınar Yıldırım, Havva Nilgün Budak, Gülşen Uluköy, Erkan Gümüş, Zeynep Banu Güzel-Seydim, 2015. In vitro Antibacterial Activities of Pomegranate (*Punica granatum* L.) and Grape (*Vitis vinifera*) vinegar Against Bacterial Fish Pathogen. 17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish (EADP 2015), the Auditorio Alfredo Kraus, Las Palmas de Gran Canaria, Spain from September 7th to 11st, 2015.

KUBILAY, Aysegul; YILDIRIM, Pınar; Development and Efficacy a Trivalent Vaccine Against Bacterial Pathogens in Rainbow Trout, *Oncorhynchus*

*mykiss*. "2nd International Conference of Fish and Shellfish Immunology 2016" Maine, USA. from june 26th to 30th, 2016.

Ulukoy, Gulsen; Yıldırım, Pınar; Kubılay, Aysegul. Present Status of Bacterial Diseases of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Turkey. 2016. "2nd International Conference of Fish and Shellfish Immunology 2016" Maine, USA. from june 26th to 30th, 2016.

Kubılay, Aysegul; Yıldırım, Pınar; Duru, Ahmet; Ulukoy, Gulsen; Wiklund, Tom; Antibiotic Susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. "2nd International Conference of Fish and Shellfish Immunology 2016" Maine, USA. from june 26th to 30th, 2016.

