

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*)
VİBRİOSİS'E KARŞI AŞI UYGULANMASININ BAĞIŞIKLIK
SİSTEMİNE ETKİSİ**

Seçil EKİCİ

Danışman: Prof. Dr. Öznur DİLER

**DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA-2010**

TEZ ONAYI

Seçil EKİCİ tarafından hazırlanan “Gökkuşuğu Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Vibriosis’e Karşı Aşı Uygulanmasının Bağışıklık Sistemine Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Süleyman Demirel Üniversitesi SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Öznur DİLER

SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

(İmza)

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ö. Osman ERTAN

SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
Su Ürünleri Temel Bilimleri Anabilim Dalı

(İmza)

Prof. Dr. Murtaza ÖLMEZ

SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

(İmza)

Doç. Dr. Soner ALTUN

Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

(İmza)

Doç. Dr. Ayşegül KUBİLAY

SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

(İmza)

Prof. Dr. Mustafa KUŞÇU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. <i>Vibrio anguillarum</i> 'un Özellikleri.....	3
2.1.1. Klasifikasyonu.....	3
2.1.2. Morfolojik ve kültürel özellikleri.....	3
2.1.3. Fenotipik özellikleri.....	4
2.1.4. Patojenite ve virülens.....	7
2.1.5. Antijenik özellikleri.....	10
2.1.6. İmmunite ve immunizasyon.....	11
2.1.6.1. Balığın büyüklüğü.....	22
2.1.6.2. Su sıcaklığı.....	25
2.1.6.3. Aşının sulandırma oranı (Dilusyonu).....	26
2.1.6.4. Aşı suşu ve serotipinin önemi.....	26
2.1.6.5. Destek aşuların kullanımı.....	27
2.1.6.6. Adjuvantlar ve immunostimulantlar.....	29
2.1.6.7. Antijenik rekabet.....	30
2.1.6.8. İmmun yanıtı baskılayan faktörler.....	30
2.1.7. <i>V.anguillarum</i> üzerine yapılan immunizasyon çalışmaları.....	30
2.2. Vibriosis.....	40
2.2.1. Hastalığın tarihçesi.....	40
2.2.2. Epizootiyolojisi.....	42
2.2.3. Hastalığın belirtileri.....	45
2.2.4. Prognoz ve mortalite.....	47
2.2.5. Hastalığın teşhisi.....	47

2.2.6. Kontrol.....	48
2.2.6.1. Tedavi.....	49
2.2.6.2. Aşılar.....	49
2.3. Balıklarda Bağışıklık.....	50
2.3.1. Doğal bağışıklık (Spesifik olmayan savunma).....	50
2.3.2. Kazanılmış bağışıklık (Spesifik savunma).....	50
2.3.2.1. Humoral bağışıklık.....	51
2.3.2.2. Selüler bağışıklık (Cell mediated immunity, CMI).....	51
2.3.3. İmmunoglobulinler (Antikorlar).....	52
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	53
3.1. Materyal.....	53
3.1.1. Araştırmada kullanılan <i>Vibrio anguillarum</i> suşları.....	53
3.1.2. Araştırmada kullanılan balık kaynağı ve uygulama yeri.....	53
3.1.3. Araştırmada kullanılan su kaynağı ve suyun kalitesi.....	54
3.1.4. Araştırmada kullanılan yem.....	54
3.1.5. Epruvasyon ve immunizasyon uygulama yeri.....	54
3.1.6. <i>V. anguillarum</i> aşılarının hazırlandığı kuruluşlar.....	55
3.1.7. Oral aşıda kullanılan mikrokapsülasyon.....	55
3.1.8. ELISA testinin yapıldığı kuruluşlar ve laboratuvarlar.....	55
3.1.9. ELISA testinde kullanılan antiserum ve konjugatlar.....	55
3.2. Yöntem.....	56
3.2.1. <i>Vibrio anguillarum</i> suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi.....	56
3.2.1.1. Geleneksel bakteriyolojik testlerin kullanımı.....	56
3.2.1.2. API 20 E testi.....	56
3.2.2. Deneysel aşının hazırlanması.....	56
3.2.3. Aşı suşunun seçimi.....	57
3.2.4. Deneysel aşının üretimi.....	57
3.2.4.1. Oral aşının hazırlanması.....	58
3.2.4.1.1. Polimer ve çözücünün seçilmesi.....	58
3.2.4.1.2. PLGA mikropartüküllerin in vitro hazırlanması.....	58
3.2.4.1.3. Mikrokürelerin şekli ve büyüklüğü.....	59
3.2.5. Sterilite testi ve toksisite denemeleri.....	60

3.2.6. Aşı etkinliğinin değerlendirilmesi.....	61
3.2.7. Eprüvasyon uygulamaları.....	61
3.2.8. Aşıların uygulanması.....	62
3.2.9. Bağışıklığın değerlendirilmesi.....	62
3.2.10. Aşılı balıkların serumlarında antikör tespiti için kullanılan serolojik yöntemler.....	63
3.2.10.1. Serum elde edilmesi.....	63
3.2.11. Aglutinasyon testi.....	63
3.2.11.1. Antijen hazırlanması.....	63
3.2.11.2. Lam aglutinasyon testinin uygulanması.....	64
3.2.11.3. Mikropleyt (Mikroplak) aglutinasyon testinin uygulanması.....	64
3.2.12. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) testi.....	65
3.2.12.1. Pozitif kontrol serumunun hazırlanması.....	65
3.2.12.2. ELISA tekniği için antijen hazırlama.....	65
3.2.12.3. ELISA testi için antijen kaplı plakların hazırlanması.....	65
3.2.12.4. ELISA testinin uygulanması.....	66
3.2.12.5. Antijen, antiserum, konjugat titrasyonunun belirlenmesi.....	67
3.2.13. İstatistikî hesaplamalar.....	68
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	69
4.1. <i>Vibrio anguillarum</i> Suşlarının Fenotipik Özelliklerine Ait Bulgular.....	69
4.2. Aşı Suşunun Seçimi Amacıyla Yapılan Virülens Çalışmalarına Ait Bulgular.....	73
4.3. LD ₇₀ Dozunun Belirlenmesinde Kullanılan Testlerin Sonuçlarıyla İlgili Bulgular.....	75
4.4. Hazırlanan Aşının Toksisitesinin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan Denemelerin Sonuçları İle İlgili Bulgular.....	75
4.5. Deneysel Aşıların Sağladığı Bağışıklık Seviyesinin Sonuçlarıyla İlgili Bulgular.....	76
4.6. Antikör Tespitinde Kullanılan Serolojik Yöntemlerle İlgili Bulgular....	79
4.6.1. Lam aglutinasyon testi ile ilgili bulgular.....	79
4.6.2. Mikroaglutinasyon testi ile ilgili bulgular.....	80

4.6.3. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) testi ile ilgili bulgular.....	82
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	84
6. KAYNAKLAR.....	97
ÖZGEÇMİŞ.....	109

ÖZET

Doktora Tezi

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*) VİBRİOSİS'E KARŞI AŞI UYGULANMASININ BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNE ETKİSİ

Seçil EKİCİ

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Öznur DİLER

Halofilik Gram negatif bakteri olan *Vibrio anguillarum*' un neden olduğu vibriosis deniz balıkları ve son yıllarda da gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğinde yüksek oranda ölümlere yol açan en önemli bakteriyel hastalıklardan birisidir.

Bu çalışma ile ülkemizde ilk kez gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) vibriosis'e karşı deneysel aşı hazırlanmıştır. Akdeniz bölgesinde yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında görülen vibriosis salgınlarından izole edilen *Vibrio anguillarum* M1 suşundan hazırlanan deneysel aşı ile 4 farklı aşılama yönteminin (enjeksiyon, kısa süreli banyo (k.b.), oral, k.b.+oral) etkinliği karşılaştırılmıştır.

Aşılamadan sonraki 30, 60, 90 ve 120. günlerde aşılı ve kontrol gruplarına LD₇₀ dozunda (10² kob/ml) *V. anguillarum* intraperitoneal enjeksiyon ile verilerek epruvasyon yapılmıştır. Ölümler temel alınarak hesaplanan Oransal Yaşama Oranı (RPS)'nin, enjeksiyon aşı uygulanan grupta daha iyi olduğu belirlenmiştir. 30. günde yapılan epruvasyonda oral, kısa süreli banyo ve enjeksiyon gruplarından elde edilen RPS değeri sırasıyla % 57,11, % 31,42 ve % 100 olarak tespit edilmiştir.

Denemenin 30. gününde kısa süreli banyo grubundaki balıklara oral yöntemle destek aşı uygulanmıştır. Balıklar Polylactide-co-glycolide (PLG) polimerleri kullanılarak mikrokapsüllenmiş aşı ile 10 gün boyunca canlı ağırlıklarının % 2'si oranında beslenmiştir. 60. günde yapılan deneysel enfeksiyonda kısa süreli banyo ve k.b.+oral aşılanan balıklardan elde edilen RPS değeri sırasıyla % 19,44 ve % 30,55 olarak bulunmuştur. 120. günde yapılan epruvasyonda i.p. enjeksiyon ile aşılanan balıklarda hala % 100 oranında RPS değerinin olduğu ve diğer gruplardan önemli derecede yüksek koruma sağladığı tespit edilmiştir.

Böylece enjeksiyon aşı uygulaması ile yüksek oranda koruma sağlanmıştır. Mikrokapsüle edilen oral aşının *V.anguillarum* karşı immunitenin geliştirilmesinde destek aşı olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir.

Gökuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’da *V.anguillarum* ile immunizasyonu takiben 21, 28, 45, 60, 90 ve 120 günlerde yapılan ELISA ve mikroaglutinasyon testlerinde tüm gruplarda çok düşük miktarda antikor titresini belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Vibrio anguillarum*, Vibriosis, immunizasyon, aşı yöntemleri, antikor, ELISA, mikroaglutinasyon testi, gökuşığı alabalığı, *Oncorhynchus mykiss*.

2010, 112 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE EFFECT OF VACCINATION AGAINST VIBRIOSIS IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) IMMUNE SYSTEM

Seçil EKİCİ

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr.Öznur DİLER

Vibriosis, caused by the halophilic Gram negative bacterium *Vibrio anguillarum*, is one of the most important bacterial diseases causing high mortality losses in marine fish and recently rainbow trout farming.

In this study, an experimental vaccine was prepared for rainbow trout against vibriosis. This is first experimental vaccine study for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The M1 strain of *Vibrio anguillarum*, isolated from an outbreak of rainbow trout farm in Mediterranean region, Turkey in this study was used a trial comparing four immunization methods: injections, immersion, oral, immersion+oral applications and control (phosphate buffered saline,PBS).

Each vaccinated and unvaccinated group of fish were challenged by intraperitoneal injection of LD₇₀ doses (10² cfu per ml) of *V. anguillarum* in 30, 60, 90 and 120 days. Relative percentage of survival values calculated based on mortalities, it has been determined that, injections methods provided more protection compared to other methods: immersions, oral and immersion+oral vaccines.

In fish exposed to the bacteria 30 days after injection RPS value was calculated for oral, immersion and injection methods 57.11 %, 31.42 % and 100 % respectively.

The immersion groups were boosted for oral methods when 30 days. Oral vaccine was microencapsulated using polylactide-co-glycolide (PLG) and mixed in to the food. The fish have been fed with a diet containing the oral vaccine for 10 days at 2 % of body weight per day.

In fish exposed to the bacteria 60 days after injection RPS value was calculated for injection, immersion, oral, im+oral vaccinated and control groups. 19.44 % and 30.55 % RPS were observed in immersion and im+oral vaccinated groups respectively. However oral vaccinated groups were observed protections for 1 month. Immunity remained high in injections method, as the RPS value was 100

% in 120 days, significantly higher than in all other groups. Thus, good protection was achieved in vaccination by injection methods and it was also demonstrated that microencapsulated oral vaccine will be used boosted methods for increase immun protection againts *Vibrio anguillarum*.

In all groups, low antibody titres were determinated following 21, 28, 45, 60, 90 and 120 days after immunization using ELISA and micro-agglutination tests.

Key Words: *Vibrio anguillarum*, vibriosis, immunization, vaccine methods, circulating antibody,ELISA, microagglutination assay, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.

2010, 112 pages

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Ülkemizde kültür balıkçılığı son yıllarda hızlı bir gelişim göstermiştir. Tatlı sularda alabalık, denizlerde ise çipura ve levrek üretimi yapan işletmelerin sayısı hızla çoğalmıştır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde bu hızlı gelişimle birlikte hastalık sorunları da artmıştır. İşletmelerde uygun önlemler alınmadığı zaman büyük ekonomik kayıplarla karşı karşıya kalınabilir.

Ülkemizde son yıllarda görülmeye başlayan ve balıkların önemli bakteriyel patojenlerinden biri olan *Vibrio anguillarum*'un sebep olduğu vibriozis, gökkuşağı alabalıklarında hemorajik septisemiler sonucu büyük kayıplara neden olmaktadır. Balık hastalıklarıyla mücadelede en etkili çözüm, profilaktik önlemler alınarak infeksiyonların ortaya çıkışını engellenmesidir. Bu amaçla immunizasyon çalışmalarına önem verilmeli ve sağlıklı balıkların aşılarda korunması amaçlanmalıdır.

Bu araştırmada ülkemize ait *Vibrio anguillarum* suşlarının fenotipik özellikleri incelenerek, deneysel aşı hazırlanmış ve farklı yöntemlerle uygulanan aşının gökkuşağı alabalıkları üzerine etkinliği; yapılan deneysel enfeksiyon denemeleri ve kanda oluşan antikor miktarının ELISA yöntemiyle belirlenmesiyle tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması sırasında bana destek verip yol gösteren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Öznur DİLER'e, çalışmalarımı yakından takip edip yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Ayşegül KUBİLAY ve Doç. Dr. Soner ALTUN'a, PLG polimerleri kullanılarak mikrokapsül aşı hazırlanmasında yardımcı olan Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Zelihagül DEĞİM ve çalışma arkadaşlarına, eriyik antijenin protein değerlerinin saptanmasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mehmet AKDOĞAN'a ve ayrıca çalışmam sırasında yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşlarım Yrd.Doç.Dr. Behire Işıl Didinen, Yrd. Doç.Dr.Seval Bahadır KOCA Öğr.Üyesi Halit BAYRAK'a en içten teşekkürlerimi arz ederim.

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

1386-D-06 No'lu Proje ile tezimi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Seçil EKİCİ

ISPARTA, 2010

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Denemede kullanılan sirküler fiber tanklar.....	54
Şekil 3.2. PLGA mikropartikülleri.....	59
Şekil 3.3. Suda yeniden şekillendirilen PLGA mikropartikülleri.....	60
Şekil 4.1. <i>Vibrio anguillarum</i> reizolatının %1 NaCl içeren T-TSA'da krem renkli saf kültür kolonileri.....	69
Şekil 4.2. TCBS agarda <i>Vibrio anguillarum</i> 'un sarı renkli kolonilerinin görünümü.....	70
Şekil 4.3. Gram boyama sonucunda düz yada hafif kıvrık şekilli <i>Vibrio anguillarum</i> bakterisinin görünümü.....	71
Şekil 4.4. Farklı aşılama yöntemleri ile aşılanan gökkuşağı alabalıklarında antijenlerin koruyuculuk değerlerinin (RPS) karşılaştırılması.....	79
Şekil 4.5. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antijenin oluşturduğu kümelerin ışık mikroskopunda görünümü.....	80
Şekil 4.6. İmmun test serumlarını içeren mikroaglutinasyon plakları.....	81
Şekil 4.7. Farklı aşılama yöntemleri uygulanarak aşılanan alabalıkların kan serumunda oluşan antikor titrelerinin (Log ₂) günlük dağılımı.....	82
Şekil 4.8. ELİSA testine ait antijen protein değeri, antiserum ve konjugat dilüsyonlarının tespit edildiği micropleyt (çok zayıf yeşil renk reaksiyonu).....	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Vibrio anguillarum</i> 'un fenotipik özellikleri.....	6
Çizelge 2.2. Sockeye Salmonlarının (3.3 g) vibrio bakterin ile kısa süreli banyo yöntemi ile aşılmasının takiben bağışıklığın başlangıç süresi üzerine su sıcaklığının etkisi.....	26
Çizelge 2.3. Gökkuşuğu alabalıklarının (4.1 ve 6.3 g) vibrio bakterin ile banyo yöntemi ile tek ya da iki kez aşılmasının karşılaştırılması.....	28
Çizelge 2.4. <i>V.anguillarum</i> 'a karşı kısa süreli banyo yöntemiyle aşılamanın etkileri.....	28
Çizelge 2.5. Levrek balıklarında oral ve enjeksiyon yöntemiyle aşılama sonrası aşının etkinliğinin karşılaştırılması.....	32
Çizelge 2.6. Türkiye'de Levrek balıklarında <i>V.anguillarum</i> Serotip 1'den hazırlanan aşının etkinliğine ait sonuçlar.....	33
Çizelge 2.7. Atlantik halibutları (40 g) üzerinde kısa süreli banyo, enjeksiyon, oral intübasyon ve anal intübasyon yöntemleriyle <i>Vibrio anguillarum</i> (Serotip 02α) bakterinin aşılama sonucu immunizasyon etkilerinin karşılaştırılması.....	33
Çizelge 2.8. Japon yassı balıklarında <i>V.anguillarum</i> 'un farklı enjeksiyon uygulamaları ile etkinliğinin belirlenmesi.....	35
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>Vibrio anguillarum</i> suşları.....	53
Çizelge 4.1. <i>Vibrio anguillarum</i> suşlarının fenotipik özellikleri ile ilgili bulgular.....	72
Çizelge 4.2. <i>V.anguillarum</i> suşlarının virülens durumlarının belirlenmesi.....	73
Çizelge 4.3. <i>V.anguillarum</i> suşlarının virülens durumlarının kontrol edilmesi.....	74
Çizelge 4.4. Aşı suşu olarak kullanılan <i>V.anguillarum</i> suşunun virülens durumunun kontrol edilmesi.....	74
Çizelge 4.5. LD ₇₀ oranının tespitinde eprüvasyon sonuçları.....	75
Çizelge 4.6. Hazırlanan antijenlerin toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçları.....	76

Çizelge 4.7. Gökkuşığı alabalıklarında farklı aşılama yöntemleri ile uygulanan deneysel aşının koruyuculuğunun karşılaştırılması.....	77
Çizelge 4.8. I.p. enjeksiyon yöntemiyle aşılanan 20 g ağırlığındaki gökkuşığı alabalıklarında 30, 60, 90 ve 120. günlerde yapılan eprüvasyon (LD ₇₀) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	77
Çizelge 4.9. Kısa süreli banyo yöntemiyle aşılanan 10 g ağırlığındaki gökkuşığı alabalıklarında 30, 60, 90 ve 120. günlerde yapılan eprüvasyon (LD ₇₀) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	77
Çizelge 4.10. Oral yöntemle aşılanan 10 g ağırlığındaki gökkuşığı alabalıklarında 30, 60, 90 ve 120. günlerde yapılan eprüvasyon (LD ₇₀) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	79
Çizelge 4.11. Kısa süreli banyo yoluyla aşılamaı takiben destek olarak oral yolla aşılanan 10 g ağırlığındaki gökkuşığı alabalıklarında 30, 60, 90 ve 120. günlerde yapılan eprüvasyon (LD ₇₀) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	78
Çizelge 4.12. Farklı aşılama yöntemleri uygulanarak aşılanan balıkların immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri.....	82

1. GİRİŞ

Dünyadaki nüfus artışı ve sanayileşme birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Bu sorunların başında doğanın tahrip edilmesi ve dolayısıyla da doğal stokların giderek azalması gelmektedir. Bu nedenle kültür balıkçılığı, insanoğlu tarafından doğal stoklara alternatif olarak geliştirilmiştir. Son yıllarda dünyada ve ülkemizde akuakültür alanında yetiştiricilik faaliyetlerinde önemli artışlar kaydedilmektedir. Ülkemizde tatlı su kültür balıkçılığı alanında kurulan işletmelerin büyük çoğunluğunu gökkuşağı alabalığı çiftlikleri oluşturmaktadır.

Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) ülkemizde 1970'li yıllarda yetiştiriciliğine başlanan ve günümüzde tatlı su balıkları üretiminde en önemli değere sahip bir balık türüdür. Ülkemizde 2007 yılında gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretimi 58.433 ton iken 2008 yılında bu rakam 65.928 tona ulaşmıştır. Bu artışa paralel olarak işletmelerde ortaya çıkan bakteriyel balık hastalıkları en önemli ekonomik kayıp nedenidir (Baran vd., 1980; Ergüven ve Soylu 1988; Timur ve Timur 1991; Çağırğan ve Yüreklitürk 1991; Diler ve Kubilay 1996; Timur vd., 1996 a,b; Ekici vd., 2005; Timur ve Korun, 2004; Tanrıkul, 2007). Bu bakteriyel hastalıklar arasında görülen vibriosis alabalık (*Oncorhynchus mykiss* W.,1792), yılan balığı (*Anguilla anguilla* L.,1758), çipura (*Sparus aurata* L.1758) ve levrek (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) gibi kültürü yapılan birçok deniz ve tatlı su balığı türünde yaygın epizootiler oluşturmaktadır (Çağırğan,1993; Bruno et al.,1997; Akaylı, 2001).

Vibriosisin etkeni olan *V. anguillarum*'un teşhisi, bakterinin morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik, serolojik ve moleküler özelliklerinin incelenmesiyle yapılmaktadır (Austin and Austin, 2007). *V.anguillarum*'un fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde genellikle geleneksel mikrobiyolojik testler kullanılmaktadır. Bu testler ile bakterinin izolasyonu ve identifikasyonu zor ve zaman alıcıdır. Son yıllarda kullanım alanları gittikçe artan serolojik yöntemler ile bakteriyel hastalıkların daha hızlı teşhisi yapılabilmektedir. Balıkların bakteriyel hastalıklarının hızlı teşhisi için hasta balıkların kan serumunda oluşan antikor varlığının ve miktarının tespiti amacıyla günümüzde aglütinasyon, presipitasyon, IFA

(immunofloresan antikor testi) ve ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) gibi serolojik testler kullanılmaktadır. Bu testlerden ELISA çok geniş kullanım alanı bulan bir serolojik testtir.

Hastalık, antibiyotik ve sulfonamitlerle tedavi edilebilirse de, tanı konulup tedaviye başlayana kadar geçen sürede ölümler devam etmektedir. Enfeksiyonun bir üretim periyodunda birden çok tekrarlaması, sık sık kemoterapotik kullanımına, dolayısıyla tedavi maliyetlerinin artmasına yol açarken, kemoterapotik madde kalıntıları tüketici sağlığını ve akuatik çevreyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle tüm dünyada vibriosisin sağaltımından çok, korunmaya yönelinmiş ve banyo, enjeksiyon veya oral yolla uygulanabilen aşilar geliştirilmiştir (Çağırğan, 1993).

Vibriosis'e karşı aşı uygulaması ilk defa 1970'li yıllarda Kuzey Amerika kıyılarında görülen *V.anguillarum* ve *V.ordalii* enfeksiyonlarından korunmaya yönelik olarak uygulanmıştır. Günümüzde Vibriosis'e karşı geliştirilmiş olan ticari aşiların büyük çoğunluğu inaktif aşilardır. Bu inaktif aşilarda, sahada ağır hastalık tablosu oluşturan (patojenitesi yüksek olan) suşlar kullanılmıştır (Toranzo et al., 2005).

Ülkemizde deniz balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerde ve son zamanlarda da gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği yapan işletmelerde ciddi kayıplara neden olan vibriosis genellikle su sıcaklığı arttığında, özellikle stoklamanın yoğun olduğu ve boylama, taşıma gibi stres şartlarında kayıplara neden olmaktadır (Noga, 2000). İşletmelerde, hastalıklardan korunmada en geçerli yol hijyenik tedbirlerin alınması, nakillerle hasta ve taşıyıcı balıkların işletmeye sokulmaması ve o bölgeye özgü hastalıklara karşı balıkların aşılması ile bağışıklığın etkinleştirilmesidir.

Bu çalışma ile Akdeniz bölgesinde yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalıklarında meydana gelen salgınlardan izole edilen *Vibrio anguillarum* suşu ile deneysel aşı hazırlanarak ve ülkemizde ilk kez gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde kısa süreli banyo, enjeksiyon ve oral yöntemler ile aşılama yapılması amaçlanmıştır. Aşının etkinliği Oransal Yaşama Oranı (RPS)'nin belirlenmesi ve immunize edilen balıkların ELISA ve mikroaglutinasyon yöntemleri kullanarak serumlarında antikor varlığının tespiti ile değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Vibrio anguillarum*'un Özellikleri

Vibrionaceae familyasında yer alan *V. anguillarum* Gram negatif, virgül şeklinde çubuk bakteridir. Halofilik özellik gösteren bu bakteri doğal ve kültürü yapılan deniz balıkları, tatlı su balıkları ve diğer akuatik hayvanlarda vibriosis veya hemarojik septisemiye neden olmaktadır (Rodkhuma et al., 2005). Vibriosis kültürü yapılan balıklarda stres şartları altında özellikle stoklamanın yoğun ve kötü su kalitesinin bir arada bulunduğu durumlarda ciddi ekonomik kayıplar oluşturmaktadır (Noga, 2000; Peggy and Francus- Floyd, 2002).

2.1.1. Klasifikasyonu

Vibriosis'e neden olan *Vibrio anguillarum* ilk kez 1983 yılında Canestri'ni tarafından *Bacillus anguillarum* olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 1907 yılında, Bergman tarafından İsveç'teki yılan (*Anguilla anguilla*) balıklarında meydana gelen salgınlardan bu bakteri izole edilmiş ve *Vibrio anguillarum* olarak isimlendirilmiştir (Austin and Austin, 1999). Literatürlerde *Beneckea anguillarum* biotype 1 olarak da adı geçmektedir (Baumann et al.,1978). McDowell ve Colwell (1985)'in yapmış olduğu rRNA filogenetik çalışmalar sonucunda bakterinin *Vibrio* genusundan çıkarılarak *Listonella* genusuna alınmasının daha doğru olduğu bildirilmiş olmasına rağmen, bazı araştırmacılar kavram kargaşasına yol açmamak için *Vibrio anguillarum*'u kullanmayı tercih etmektedirler (Actis et al., 1999; Austin and Austin,1999).

2.1.2. Morfolojik ve kültürel özellikleri

Balıklar da vibriosise neden olan bakteriler Vibrionaceae familyasına aittir. *Vibrio* cinsi Gram (-) 0,5-1,5 µm büyüklüğünde düz veya hafif kıvrık virgül şeklinde çubukları içermektedir (Plumb, 1999; Austin and Austin, 2007). Bunlar spor ve kapsül oluşturmazlar. Aerobik veya fakültatif anaerobik özelliğe sahiptir. Tek polar flagellumları ile hareket ederler (Austin and Austin, 1999). Asit-fast değildirler. Sitokram oksidaz pozitif, fermantatif, Novobiosin ve Vibriostat 0/129 testine (2,4-

diamino 6,7 disopropil pteridin fosfat) duyarlı halofilik bir bakteridir. Karbonhidratları fermente edebilir fakat gaz üretmezler. Kanlı agarda hemolitiklerdir. (Akaylı,2001; Austin and Austin, 2007).

Vibrio türleri hasta balıkların iç organlarından özellikle böbrek veya lezyonlardan, % 0,5-3,5 tuz ilave edilmiş Brain Heart Infusiyon Agar (BHIA), Nutrient agar veya Trypticase Soy Agar (TSA) gibi genel besiyerlerinde ve Tiyosülfat-Sitrat-Bile-Sukroz Agar (TCBS) gibi seçici besiyeri kullanılarak izole edilmektedir. *V.anguillarum* Trypticase Soy Agar (TSA)'da 22 °C'de 24-48 saatlik inkübasyondan sonra kabarık sarımsı, kahverengi, 3-4 mm çapında yuvarlak ve mat koloniler oluşturur (Austin and Austin, 1999; Balebona et al., 1998; Plumb, 1999; Noga, 2000; Akaylı, 2001; Timur ve Timur, 2003). *Vibrioların* izolasyonunda kullanılan TCBS agar üzerinde ise sarı renkli koloniler oluşturmaktadır (Austin and Austin, 1999).

Vibrio spp. büyümesi için gerekli olan optimum şartlar; 20-22 °C'de 2-7 günlük inkübasyon süresidir. Bu bakteri 5 °C'de büyüebilirken, 37 °C'de nadiren büyümektedir (Austin and Austin, 1999).

Vibrio spp. ilk izolasyonunda besiyerlerine % 1-3 konsantrasyonunda tuz veya deniz suyu katılması tavsiye edilmektedir. Türlerin tuz toleranslarında farklılık olması identifikasyonda yol göstericidir (Austin and Austin, 1999; Plumb, 1999). *V. anguillarum* optimum tuz isteği % 1,5-3,5'tur. Bakterinin bir çok suşu % 7'lik tuz konsantrasyonuna dayanabilirken, % 10'da yaşayamazlar. Bazı suşları ise % 0,5 tuz ilaveli ortamlarda güçlükle büyümektedir (Austin and Austin,1999; Buller, 2004).

Vibrio türlerinin çoğunun organik büyüme faktörlerine ihtiyaç duymadığı belirtilmektedir. Ancak uzun stoklama koşullarından sonra bu gruptaki bazı bakterilerin tekrar üreyebilmek için amino asitlere ihtiyaç duyduğu ifade edilmektedir. *Vibrio* türleri orta derecedeki alkalın koşullara toleranslıdır (Akaylı, 2001).

2.1.3. Fenotipik özellikleri

Vibrio spp. sitokram oksidaz pozitif, oksidatif fermentatif (O/F) glikoz testine

fermantatif, 2,4 diamino 6,7-diisopropil pteridine fosfat (Vibriostat,O/129) testine ve Novabiocine hassastır (Bullock and Sniesko, 1971; Çağırğan,1993; Austin and Austin,1999; Woo and Bruno,1999; Plumb,1999; Noga, 2000; Akaylı, 2001; Arda vd., 2002; Timur ve Timur, 2003; Ekici vd., 2005).

V. anguillarum'un biyokimyasal özellikleri suşlara göre değişiklik gösterdiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Bu bakteri ile yapılan biyokimyasal çalışmalarda Voges proskouer (+), Arjinin dihidrolaz (+), Simon sitrat besiyerinde üreme (+)'dir. Nişasta ve sorbitol kullanımı ve lipaz aktiviteleri vardır. Bunlar dışındaki diğer biyokimyasal testler türlere göre farklılıklar gösterse de hepsi D-glukoz, D-fruktoz, maltoz ve gliserolü kullanır (Çizelge 2.1.) (Austin and Austin, 2007).

Çizelge 2.1. *Vibrio anguillarum*'un fenotipik özellikleri (Balebona et al.,1998; Austin and Austin, 2007)

Biyokimyasal ve Morfolojik Testler	
TCBS Agar	Sarı
Gram boyama	-, Çubuk eğri
Hareket	+
Sitokrom oksidaz	+
Katalaz	+
Oksidasyon/ Fermentasyon	F
O/129 (10µg)	Duyarlı
O/129 (150µg)	Duyarlı
β galaktosidaz (ONPG)	+
Lizin dekarboksilaz	-
Arginin dihidrolaz	+
Ornitrin dekarboksilaz	-
İndol	+
Fenilalnin deaminaz	-
Esculin	-
Kitin	+
Lipaz	+
Nişasta	+
Nitrat Redüksiyonu	+
Üre	-
Jelatin Hidrolizi	+
H ₂ S	-
Metil Red	-
Voges Proskouer	+
Sitrat Kullanımı	+
%0 NaCl'de üreme	-
%7 NaCl'de üreme	-
4 °C'de üreme	+
37°C'de üreme	+
Hemoliz	+
Malonat kullanımı	+
Glukoz	+
Arabinoz	+
İnositol	-
Sakaroz	+
Laktoz	-
Mannitol	+
Maltoz	+
Mannoz	▪
Galaktoz	+
Fruktoz	+
Gliserol	+
Salisin	-

+: pozitif - : negatif ▪ : tanımlanmamış reaksiyon

2.1.4. Patojenite ve virülens

V. anguillarum akuakültürde birçok balık türünde görülen başlıca bakteriyel patojenlerden birisidir. Kültürü yapılan balıklarda vibriosisten kaynaklanan ölümler erken larval dönemde oldukça yaygındır ve aniden meydana gelmektedir. Bazen de popülasyonun tamamının ölümüne neden olmaktadır.

V.anguillarum'un sebep olduğu hastalığın patojenitesini anlamak için, öncelikle çeşitli virülens faktörleri hakkında bilgiye ihtiyaç vardır. Elde edilen bu bilgiler ışığında hastalığa karşı yeni aşılama stratejileri geliştirilecektir. *V. anguillarum* çeşitli toksinler ve virülens faktörleri üreterek balığın savunma mekanizmasını çökertmektedir. Bu toksinler hemolizin, proteaz, metalloproteaz, sitotoksin, dermatoksin, hemaglutinin, amilaz, kazeinaz, jelatinaz, elastaz, lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, tripsin ve ekstrasellüler toksinlerdir. Virülens faktörleri ise hareketi sağlayan flagella, hücre yapıştıran faktörler, yüzey antijeni, pJM1 plazmidi, siderofor (anguibaktin) ve demiri tutan hücre zarı reseptörüdür (Austin and Austin, 1999; Mazoy et al., 2003; Rodkhuma et al., 2005; Ercan, 2009).

V. anguillarum üretmiş olduğu hemolitik ve proteaz gibi ekstrasellüler ürünler yoluyla balığa zarar vermektedir. Ayrıca tek polar flagellası yapmış olduğu kemotaksik hareket de virülens için önemlidir (Spanggaard et al., 2000).

Balıkta enfeksiyonun oluş şekli 3 temel adımda gerçekleşmektedir.

1. Bakteri kemotaksik hareketlilik yoluyla konakçı dokusuna girer.
2. Konakçı dokusu içinde demiri ayırıcı sistem olarak yayılır. Örneğin sideroforlar konakçıdan demir çalmaktadır.
3. Bakteri daha sonra balıkta hemolizinler ve proteazlar gibi ekstrasellüler ürünler yoluyla zarara neden olur.

Grisez vd., (1945), kalkan (*Scophthalmus maximus* L.) larvalarında *V. anguillarum*' un, kan dolaşımına katılarak farklı organlara dağıldığını ve sonunda balıkta ölüme yol açtığını göstermişlerdir. Çok yakın geçmişte ise Ringo vd., Alp alabalığı (*Salvelinus alpinus*) yetişkinlerinin orta bağırsak ve pilorik kör keselerinde

bakteriyel endositosisi tespit etmişlerdir. Böylelikle balığın tüm mide bağırsak kanalının enfeksiyon ile karşı karşıya kalabileceğini belirtmişlerdir (Thompson et al., 2004).

Farklı balık türlerinden izole edilen *V. anguillarum*'un patojenitesinin de farklı olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Eguidius ve Anderson, Norveçteki alabalıklardan izole ettikleri *V.anguillarum*'un *Gadus virens*'lerde patojen olmadığını, sadece aynı bölgedeki alabalıklarda patojenite gözlendiğini belirtmişlerdir. Buna karşın Strout vd., (1978), yassı balıklardan izole edilen *V. anguillarum*'un Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smoltlarında da patojen olduğunu bildirmiştir (Çağırğan,1993).

Pazos vd. (1993), yapmış oldukları çalışmada hasta balık ve kabuklu su ürünleri ile çevreden izole ettikleri 46 adet *V. anguillarum* suşunun virülens özelliklerini incelemiştir. Gökkuşuğu alabalığında yapılan virülens çalışmalarında test edilen 24 suştan 9'unun hastalık yapıcı etkiye sahip olduğu ve bu suşların LD₅₀ dozunun 10²-10⁶ kob/ml arasında değiştiği tespit edilmiştir (Pazos et al., 1993).

Mikkelsen vd. (2007), hasta cod (*Gadus morhua* L.) balıklarından izole ettikleri 6 adet *V. anguillarum* O2 izolatlarının virülensini banyo yoluyla yapılan epruvasyon ile karşılaştırmışlardır. *V. anguillarum* izolatlarının 5 tanesinin oldukça yüksek virülense sahip olduğu belirlenmiştir. 4299 nolu serotip O2b izolatının 1,8x10² kob/ ml dozunun % 92 oranında ölüme neden olması ile çok yüksek virülense sahip olduğu görülmüştür. Diğer 4 izolatın ise yaklaşık 10⁴ kob/ml dozunda % 62-100 arasında ve aynı dozdaki 5022 nolu izolatın ise sadece % 8 oranında ölüm yaptığı belirlenmiştir (Mikkelsen et al., 2007).

Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ile yapılan enfeksiyon çalışmalarında *V.anguillarum*'un deri ve solungaçlardan izole edildiği belirtilmiştir. *V. anguillarum*'un ağız yoluyla alınmasından sonra bakterinin düşük pH'da güçlü bir şekilde inhibe olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte balık larvalarında enfeksiyonun az da olsa geliştiği ve pH'ın *V. anguillarum*'u inaktif hale getirecek kadar düşük olmadığı vurgulanmıştır. Böylece larval safhada enfeksiyon sindirim sisteminde gelişirken, bu safhadan sonra bağırsakta meydana gelen enfeksiyonun şiddeti henüz

açıklığa kavuşmamıştır. *V. anguillarum* ile yapılan invitro çalışmalarda bağırsak salgılarının bakteriyi 30 dakika içinde parçaladığı tespit edilmiştir (Spanggaard et al., 2000).

Horne ve Baxendole (1983) ve Olson vd. (1996)'da gökkuşağı alabalığı ve kalkan balıklarında *V.anguillarum*'un başlıca bağırsaklarda enfeksiyon oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Bağırsakların kalkan larvaları için de enfeksiyonun başlangıç bölgesi olduğu bildirilmiştir (Spanggaard et al., 2000).

Spanggaard vd. (2000), yapmış oldukları bir çalışmada gökkuşağı alabalıklarını 10^6 kob/ml dozunda ki *V.anguillarum* ile 1 saat boyunca maruz bırakmışlardır. İnfeksiyonun oluşmasından 48 saat sonra ölümlerin başladığı, 96 saat sonra ise % 100' e ulaştığı bildirilmiştir. Ayu balıkları ile yapılan çalışmaya benzer olarak bu çalışmada gökkuşağı alabalığında *V.anguillarum*'un ilk tutunduğu bölgenin deri olduğu belirlenmiştir. Atlantik salmonlarında ise vibriosisten kaynaklanan ölümlerin balıkta mukus tabakasının uzaklaştırılması ile arttığı tespit edilmiştir. Ölümlerdeki artış bakterinin balığa girişinin kolaylaştırılması sonucu gerçekleşmiştir (Spanggaard et al., 2000).

Sudaki ağır metallerin özellikle bakırın bulunması vibriosisin çıkışını hızlandırmaktadır. 30-60 µg bakır/ml ağır problem oluşturmaktadır. Çünkü ortamdaki bakır gibi bir ağır metalin bulunması balıkta strese neden olarak endo ve ekzotoksinlerin üretimini arttırmaktadır. Bu toksik etki sonucunda balıkta aneminin geliştiği ve patojen bakteriye karşı balıkta oluşan fagositik aktivitelerin baskılandığı bildirilmektedir (Akaylı, 2001).

Alabalık (*Onchorynchus mykiss*) ve yılan balıkları (*Anguilla anguilla*) ile deneysel olarak yapılan çalışmalarda sublethal düzeydeki bakırın vibriosisin patlak vermesine sebep olduğu ancak klorinin böyle bir etkisinin olmadığı ifade edilmiştir. Bakırın bu olumsuz etkisinin solungaçlar üzerindeki mukusun ağır metallerin etkisi ile koagülasyonu ve O₂ taşınmasındaki inhibisyon etkisi sebebiyle solunum stresine bağlanmıştır (Çağırğan,1993; Noga, 2000; Peggy and Francus- Floyd, 2002).

V.anguillarum deniz ortamında doğal olarak var olan bir bakteridir ve yaz ayları

boyunca sağlıklı balığın mukus, solungaç ve bağırsağından olduğu kadar sudan, sedimentten ve planktondan da bol miktarda izole edilebilmektedir. Bununla beraber çevresel izolatların çoğunlukla balık için patojen olduğu ve denizde 50 aydan daha uzun süre hayatta kalabildiği bildirilmiştir (Actis et al., 1999; Pedersen et al., 1999a, Noga, 2000, Ercan, 2009).

2.1.5. Antijenik özellikleri

V. anguillarum hem fenotipik hem de serolojik karakterleri bakımından oldukça çeşitlilik göstermektedir (Bryant, 1986). Başlangıçta farklı coğrafik bölgelerdeki (Avrupa ve Amerika) salmonid balıklarından 3 serotip izole edilmiştir. Bu sayı Japonya’da yılan balıkları, ayu ve salmonidlerden 3 serotip daha elde edilmesiyle arttırılmıştır. Kitao vd., ısıya dayanıklı “O” somatik antijenleri ile yaptıkları çapraz aglütinasyon ve çapraz absorpsiyon testleri ile A, B, C, D, E ve F serotiplerini belirlemişlerdir (Austin and Austin,1999; Akaylı, 2001).

Toranzo vd. (1987), *V. anguillarum*’un 10 serotipinin bulunduğunu bildirmiştir. Toronza ve Barja (1990), salmonid balıklarında serotip O1 ve O2, levreklerde O1 ve diğer deniz balıklarında serotip O1 ve O2’nin enfeksiyonlara neden olduğunu ve diğer serotiplerin ise deniz ortamında yaygın olarak bulunduğunu tespit etmişlerdir. Grisez ve Ollevier (1995), *V. anguillarum*’un 16 serotipinin bulunduğu bildirmekle beraber Pedersen vd. (1999), 7 tane daha serotipin varlığını tespit etmesiyle serotip sayısı 23’e çıkmıştır (Grisez and Ollevier,1995; Pedersen et al., 1999b, Tanrıkul vd., 2004).

Vibriosis dünyada salmonidler ve bir çok deniz balıklarında çok ciddi hastalığa sebep olmaktadır. *V. anguillarum* enfeksiyonlarının teşhisi ve kontrolü balık yetiştiriciliğinde çok büyük bir öneme sahiptir. *V. anguillarum* enfeksiyonlarının ilk olarak tanımlanmasından bu yana, birçok çalışmada immünolojik özellikleri ve patojenitesi çalışılmıştır. Bu çalışmaların temelini Outer Membran (OM) kompozisyonu ve fonksiyonları oluşturmaktadır. Birçok çalışmada farklı serotiplerin OM proteinlerinin kompozisyonu analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Simon vd. (1996)’nin yapmış oldukları çalışmada test ettikleri tüm suşlarda yaklaşık 30-40 kDa

moleküler büyüklüğünde olan çoğunlukla bir ana OM proteinin (MOMP) varlığını tanımlamışlardır (Simon et al., 1996).

Vibrio anguillarum, balıklar için çok patojeniktir. Etkende, patojenitede rol alan plazmidlerin varlığı bildirilmiştir. Etkenin termolabil ve protein özelliğinde bir ekzotoksinin ve ayrıca hücre duvarından elde edilen protein ve lipopolisakkarit (LPS) karakterindeki substansların antijenik özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir. Bakterinin biri somatik O-antijeni, diğeri de flagellaya ait flagella H-antijenik bileşenleri vardır. Mikroorganizma, somatik O-antijenine göre 6 serogruba ve ayrıca 3 biyotipe (A, B, C) ayrılmaktadır (Bogwald et al., 1992; Austin and Austin,1999; Tanrıkul vd., 2004).

2.1.6. İmmunite ve immunizasyon

Aşılar; hastalık etkeni mikroorganizmalar ve onların antijen unsurlarından hazırlanmış olan, bir hayvana verildiği zaman hastalık meydana getirmeden bağışıklık kazandıran maddelerdir (Ellis, 1988; Arda vd., 1994; Altun, 2001).

Aşılanmanın ana amacı belirli bir hastalığa karşı spesifik ve uzun süreli koruma oluşturmaktır. Omurgalı bir hayvan enfeksiyona maruz kaldığında hayatta kalanlar, daha sonra aynı patojenle karşılaştığında o patojene karşı direnç göstermektedir. Spesifik bağışıklık olarak adlandırılan bu direnç patojene özgüdür ve uzun süreli koruma sağlamaktadır (Ellis, 1988).

Özgüllük ve hafıza, aşılama yoluyla kazanılmış bağışıklık oluşumunu sağlayan iki anahtar elemandır. Bu sayede antijenle ikinci kez karşılaşıldığında daha kuvvetli ve daha hızlı immun cevap (bağışıklık) oluşumunun sağlandığı gösterilmiştir (Ellis, 1988; Watts et al., 2001).

Bilimsel olarak etkili bir aşı geliştirilmesinde 3 temel aşamanın öneme sahip olduğu bildirilmiştir.

1 – İnfeksiyon etkenlerinin virülens faktörleri ve patojenite mekanizmalarının bilinmesidir. Bu sayede patojenin varlığını sürdürebilmesi için gerekli olan önemli moleküllerin / epitoplarn seçimine olanak sağlanır ve aşıya ilave edilmelidir.

2 – Konak bağımsızlık sisteminin bilinmesidir. Bağımsızlığın işleyiş mekanizması bilinerek, aşılama için en iyi zamanın ve aşılama yönteminin seçilmesine olanak verir.

3 –Deneysel olarak *in vivo* ve *in vitro* epruvasyonlar boyunca koruma oluşumu incelenerek aşının etkinliğinin saptanmasıdır (Dos Santos, 2000).

Su ürünlerinde kullanılan aşuların çoğu salmonidler, özellikle de gökkuşuğu alabalığı ve Atlantik salmonlar için geliştirilmiştir. Son yıllarda çipura, levrek, kalkan, morina, yayın gibi farklı balık türlerinin de yetiştiriciliği yapılmasıyla birlikte aşuların kullanımında da artışa yol açmıştır. Ayrıca yetiştiriliciliği yapılmaya başlanan alternatif türlerde de hastalığın kontrolü için yeni aşuların kullanımına gereksinim duyulmaktadır (Magarinos et al., 1999).

Balıklar için ilk aşılama çalışmaları 1930’larda Kuzey Amerika’ daki Salmonid kuluçkahanelerinde furunkulozis’e karşı yapılmıştır. Bilimsel anlamda balıklarda bakteriyel hastalıklara karşı ilk yapılan aşılama 1942 yılında Duff tarafından gerçekleştirilmiştir (Ellis, 1988; Joosten et al., 1997). Daha sonra 1950’ lerde antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasıyla balık aşılmasına olan ilgi azalmıştır. 1960’ larda salmon yetiştiriciliği büyük ölçeklerde yapılmaya başladığında ortaya çıkan vibriosis, furunkulozis ve yersiniozis gibi temel balık hastalıkları antibiyotiklerle kolayca kontrol altına alınabilmiştir. Bununla birlikte Salmon sanayii 1970’ lerde hızlı bir şekilde gelişerek 1980’ lerin başında bu bakteriyel patojenler, birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiştir (Ellis, 1988; Klein et al., 1996). Buna ilaveten kimyasal etkenlerle tedavi güçleşmiş ve daha pahalı bir yöntem haline gelmiştir. Antibiyotiğe karşı oluşan bu direnç sonucu hastalıkların kontrolü amacıyla aşı uygulaması tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (Bakopoulos, 1995; Thyssen and Ollevier, 2001).

Vibriosis karşı aşı uygulaması ilk defa 1970’li yıllarda Kuzey Amerika kıyılarında görülen *V.anguillarum* ve *V.ordalii* enfeksiyonlarından korumaya yönelik olarak uygulanmış, Pasifik salmonlarını aşılamanın ilaçlarla sağaltımdan daha başarılı ve ekonomik olduğu anlaşılmıştır. Daldırma yöntemi ile ilgili ilk aşılama çalışmalarında Hiperosmatik infiltrasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde balık, ilk aşamada

% 3-5 NaCl solüsyonunda 30-60 sn süreyle banyo yaptırılmaktadır. Ancak bu yöntem aşılama salmonid balıklarında stres nedeniyle subklinik enfeksiyonları arttırdığından direkt daldırma yöntemi denenmiş ve bu yöntemin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Çağırğan, 2004; Sommerset et al., 2005).

Günümüzde vibriosis, soğuk su vibriosisi ve ERM'ye karşı etkili aşılar geliştirilmiştir. *Vibrio salmonicida*, *Vibrio anguillarum* ve *Yersinia ruckeri* gibi bakterilerden formalinle inaktive edilerek hazırlanan aşının balıklara verilmesi ile hastalıklara karşı etkili bir şekilde koruma sağlanmaktadır. Bununla birlikte karmaşık olan koruma mekanizmaları hakkında hala yeterli bilgi mevcut değildir (Bogwald et al., 1992).

Balıklar çeşitli faktörlerden dolayı değişik aşılama yöntemleriyle (yem içerisinde (oral), enjeksiyon (intraperitoneal ve intramuscular), banyo (kısa süreli ve uzun süreli), püskürtme, hiperozmotik infiltrasyon ve anal intubasyon) aşılanmaktadır. Bu faktörler arasında ortam şartları, balık türleri, balık büyüklükleri ve farklı hastalıklara karşı aşılama sayılabilir. Balıklara aşının verilme yolu kazanılan bağışıklık üzerinde etkilidir. Balıklarda en iyi bağışıklık kazandıran yöntem aşının enjeksiyon yöntemiyle verilmesidir. Bu yöntemi sırasıyla banyo ve oral yöntem izlemektedir (Ellis, 1988; Vigneulle and Baudin Laurencin, 1991; Altun, 2001). Günümüzde ticari aşılama çoğu enjeksiyon ve kısa süreli banyo (immersiyon), son yıllarda da oral yolla verilecek şekilde formüle edilmiştir (Ellis, 1988; Joosten et al., 1995; Joosten et al., 1997; Midtlyng, 1997). Vibriosis ve yersiniozis aşıları kısa süreli banyo ve enjeksiyonla etkili bir şekilde verilebilmektedir. Bununla birlikte soğuk su vibriosisi ve furunkulozis gibi bazı aşılarda optimal etkiyi elde etmek için enjeksiyon içinde adjuvantında bulundurulması gerekmektedir (Ellis, 1988).

Aşı uygulamalarında bugün, enjeksiyonla aşılama yöntemi ile daha verimli sonuçlar alındığı belirtilmektedir. Enjeksiyonla aşılama, adjuvant kullanımına imkan sağlaması, ekonomik olması ve koruma parametreleri gözönüne alındığında çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Bununla birlikte yoğun iş gücü gerektirmesi, aşılama işleminin uzun süre alması ve balıklarda aşılama esnasında strese yol açması dezavantajları olarak gösterilmektedir. Ayrıca enjeksiyonla aşılama 10 g ve altındaki

balıklarda uygulanamadığından larval dönemde meydana gelen hastalıklara karşı balığı savunmasız bırakmaktadır (Ellis, 1988; Lillehaug, 1989).

Balıklarda furunkuloz aşılarının gelişimiyle beraber daha iyi koruma sağlamak amacıyla adjuvantlı aşuların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Salmonidlerde alüminyumlu adjuvantların tek enjeksiyonu kısa süreli etki gösterse de iyi bir koruma sağlamıştır. Furunkuloza karşı yağ bazlı adjuvantların, alüminyum ve glukandan daha uzun süre koruma sağladığı bildirilmiştir. Yağ bazlı adjuvantlar günümüzde ticari aşılarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bu adjuvantların genellikle enjeksiyon bölgesinde hafiften şiddetliye kadar değişebilen lokal reaksiyonlara, granülomlara neden olduğu bildirilmiştir. Özellikle yağ bazlı adjuvantların çok şiddetli reaksiyonlara neden olduğu ve büyüme oranı ve son ürünün kalitesini etkilediği bildirilmiştir (Gudding et al., 1999; Tıravoğlu Demirtaş, 2006).

Banyo yolu ile aşılamanın kısa süreli (immersiyon) ve uzun süreli (banyo) olmak üzere iki uygulaması bulunmaktadır. Kısa süreli aşılamaya büyük balıklar için ekonomik olmamasına rağmen küçük balıkların aşılanmasına imkan sağlayan bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Midtlyng, 1997; Moore et al., 1998; Nakanishi et al., 2002; Sommerset et al., 2005).

Günümüzde vibriozis ve yesiniozis karşı kısa süreli banyo yöntemi ile aşılamada oldukça başarılı sonuçlar alınmasına rağmen, diğer bakteriyel balık hastalıkları için yeterli seviyede koruma sağlanamamıştır (Ellis, 1988; Altun, 2001).

Kısa süreli banyo yöntemi, daha az iş gücü ve aynı boydaki balıkların yoğun bir şekilde aşılanmasına olanak sağladığı için tercih edilmektedir. Fakat aşılamaya sırasında balıklarda strese neden olması ve büyük boydaki balıklarda kullanılmasının ekonomik olmaması ise dezavantajdır (Ellis, 1988; Lillehaug, 1989; Sommerset et al., 2005).

Son yıllarda kısa süreli banyo ve enjeksiyonla aşılamada karşılaşılan olumsuzluklar dikkati oral aşıya yöneltmiştir (Çağırğan,1993; Spanggaard et al., 2000; Peggy and Francus-Floyd, 2002; Bonaldo et al., 2003). Potansiyel olarak en kolay aşılama yöntemi olarak kabul edilmektedir. Zira stressiz bir yöntem olduğu gibi, ekstra iş

gerektirmez ve her büyüklükte balığa uygulanabilmektedir. Bununla birlikte oral aşı uygulamalarında bağışıklığı sağlayan antijenlerin balıkların mide ve bağırsağın ön kısmında sindirim sıvılarının etkisiyle bozulması ve buna bağlı olarak bağışıklığın sağlanamaması nedeniyle başarılı sonuçlar elde edilememiştir (Joosten et al., 1995; Lavelle et al., 1997; Joosten et al., 1997; Austin and Austin, 1999; Woo and Bruno, 1999; Russel-Jones, 2000; Sommerset et al., 2005). Ayrıca balıkların bireysel olarak farklı oranda yem tüketmesi popülasyonda bağışıklık düzeyinde çok büyük farklılıklar görülmesine neden olmaktadır. Oral aşuların ticari olarak kullanımı, daha çok destekleyici uygulamalar için önerilmektedir (Ellis, 1988; Larsen and Pedersen, 1997; Gravningen et al., 1998).

Ellis (1988), oral aşı etkinliğinin diğer yöntemlere göre düşük olmasına rağmen destek aşı olarak kullanılabileceğini belirtmiştir. Antijenlerin anal intubasyonu oral uygulamadan daha yüksek seviyede koruma sağlamıştır (Johnson and Amend, 1983). Bu da antijenlerin barsaklarda yıkımlandığını ve bu bölgeden geçişleri sırasında korunabilmeleri durumunda etkinliğinin artacağını göstermektedir (Ellis, 1988; Tıravoğlu Demirtaş, 2006).

Stroband ve Van der Veen (1981) genel olarak balıkların midesini üç kısma ayırmışlardır. Birinci kısım yağların ve proteinlerin sindirim ve absorpsiyonuyla ilgili olduğunu, sonraki kısmın pinositotik aktiviteli epitel hücreleri içerdiğini, son kısmın da osmoregülasyonda rol aldığını öne sürmüşlerdir (Yazıcı, 2004). Rombout (1989), yaptığı bir çalışmada midenin ikinci kısmının antijenin taşınmasında ve makrofajlar tarafından antijenin işlenmesinde önemli olduğunu göstermiştir (Joosten et al., 1995; Joosten et al., 1997; Rombout and Joosten, 1997). Bu kısımda ayrıca mukozal cevapta rol oynadığı düşünülen birçok lenfoid hücre bulunmaktadır (Rombout and Joosten, 1997).

Lillehaug (1989), yapmış olduğu çalışmada 50 g'lık gökkuşağı alabalıklarında vibriosise karşı enjeksiyon, kısa süreli banyo ve oral (2 farklı yöntemle kaplanan ve kaplanmayan) aşı uygulamalarının etkinliğini incelemiştir. Bu çalışmada formalinle öldürülmüş *V. anguillarum* serotip 1 ve 2'den oluşan ticari vibriosis aşısı kullanılmıştır. Kaplanmış oral aşı; liyofilize edilen ticari aşının aside dirençli film

(EC pelet) ve yavaş sindirilen prill ile kaplanmasıyla hazırlanmıştır. Yapılan epruvasyon denemeleri sonucunda kaplanmış aşılarda etkinliği (Oral prill ve Oral EC peletlerde sırasıyla % 45.7 ve % 40.1 RPS), standart aşılama yöntemleri (k.b. ve ip. sırasıyla % 94.6, % 98.2) ve oral olarak verilen korunmamış aşılardan (82.7 RPS) daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeni vibriosis aşılarda önemli antijenik unsur olan lipopolisakkaritlerin mide sindirimden az miktarda etkilenmesi olarak ifade edilmiştir. Aşının kaplanması veya yavaş sindirilen pelet ile birleştirilmesi sadece antijenlerin absorpsiyonunu azaltmıştır. Sonuç olarak sindirime karşı aside dirençli film veya yavaş sindirilen peletle kaplanarak oral yolla verilen aşılamadan sonra bağışıklıkta istenen artış sağlanamamıştır (Lillehaug, 1989).

Vigneulle ve Baudin Laurencin (1991)'in yapmış oldukları çalışmada gökkuşağı alabalığı, levrek ve kalkan balıklarında oral ve anal intübasyon olmak üzere 2 farklı yolla verilen *V. anguillarum* antijeninin bağırsaktan alımını çalışmışlardır. Antijen uygulamasından sonra belirli aralıklarla (1-21. gün arasında) balıklardan histolojik kesitler alınmıştır. Antijenin böbrek, dalak ve bağırsakta lokalizasyonu indirekt floresans antikor tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçta antijen alımının sadece aşı balıklarının son bağırsağında olduğu, ön böbrek ve dalak kesitlerinde ise antijene rastlanmadığı tespit edilmiştir. *V. anguillarum* aşı uygulanmasından sonra 21. güne kadar lamina epitellerinde belirlenmiştir. Balık türleri dikkate alınmaksızın anal intübasyondan sonra elde edilen floresan, oral uygulamaya göre daha güçlü bulunmuştur. Balık türlerine bağlı olarak antijen alımında bazı farklılıklar meydana gelmiştir (Vigneulle and Baudin Laurencin, 1991).

Vervarcke vd. (2005)'in ortalama ağırlıkları 188 g olan Afrika yayın balıklarında (*Clarias gariepinus*) yapmış oldukları çalışmada *Vibrio anguillarum* O2 bakterini ile mukozal aşılamının etkinliğini incelemişlerdir. Bu amaçla balıklara farklı aşılama yöntemleri ile (anal intübasyon, oral uygulama, ip. enjeksiyon ve kısa süreli banyo yolu) antijen uygulanmış ve bağışıklığın gelişimi karşılaştırılmıştır. Balıklarda antijenin alımı competitive ELISA ve antikor cevabı indirekt ELISA ile tespit edilmiştir. Antikor düzeylerindeki artış anal intübasyondan sonra mukus ve safrada görülürken, i.p. enjeksiyondan sonra tespit edilememiştir. Anal intübasyon ve kısa süreli banyo uygulamalarında bağırsakla ilişkili limfoit dokunun stimülasyonu

sonucu mukozal antikor cevabın geliştiği belirlenmiştir. Bu nedenle antikor düzeyeleri, mukozal bağışıklığın göstergesi olarak bilinen mukus ve safra örneklerinde tespit edilmiştir (Verwarcke et al., 2005).

Serum örneklerinde oral aşı uygulamasında balıkların ikinci bağırsak segmentine yeterli miktarlarda antijenin ulaştığı kaydedilmiştir. Anal intübasyon ve i.p. enjeksiyon uygulamasından sonra ise yüksek oranlarda antijen düzeyleri görülmüştür. Elde edilen bu düzeyler, antijen alımı hemen hemen aynı olan oral ve kısa süreli banyo grubundan oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aşı uygulanmasından 14 gün sonra serum örneklerinde en yüksek antikor titresi i.p. enjeksiyon yapılan grupta görülürken, bunu sırasıyla anal intübasyon, oral, kısa süreli banyo ve kontrol grubu takip etmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlardan mukozal bağışıklığın güçlü bir şekilde geliştiği görülmüştür (Verwarcke et al., 2005).

Mikkelsen vd. (2007), cod balıklarında ticari *Vibrio* aşısının (ALPHA MARINE™) etkinliğini, aşılı cod balıklarında görülen vibriosis salgınlarından izole *V.anguillarum* suşları ile yapılan eprüvasyon sonucuna göre değerlendirmiş ve *V.anguillarum* serotip O2a ve O2b'ye karşı güçlü bir koruma (RPS>80) elde edilmiştir (Mikkelsen et al., 2007).

Schröder vd. (2006), 1-20 g ağırlığındaki Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juvenilleri ile yapmış oldukları çalışmada ticari vibriosis aşısının (ALPHA MARINE™ *Vibrio*, PHARMAQ AS) etkinliğini, *Vibrio anguillarum* serotip O2b ile banyo yoluyla yapılan eprüvasyon sonucu değerlendirmişlerdir. 1 g'lık juveniller banyo yolu ile aşılamadan 6 hafta sonra RPS < % 47 değeri ile zayıf bir koruma sağlanırken, aşılamadan 14 hafta sonra ise RPS < % 36 değeri elde edilmiştir. Schröder et al., cod juvenillerinde iyi bir korumanın sağlanması amacıyla aşılama zamanında balıkların belli bir büyüklükte olmaları gerektiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada daldırma aşılamadan 7 hafta sonra 2,2 g'lık (RPS>75) juvenillerde 1,7 g'lıklara (RPS<54) göre önemli derecede yüksek koruma sağlanmıştır. 5 g'lık juvenillere uygulanan daldırma aşı ile aşılamadan en az 28 hafta (RPS>76) sonraya kadar devam eden güçlü bir koruma elde edilmiştir. 20 g' lıklarda ise intraperitoneal enjeksiyon veya

daldırma aşılama 17 hafta sonra (RPS>74) daha güçlü bir koruma sağlanmıştır (Schröder et al., 2006).

Deniz balıklarından levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve kalkan (*Scophthalmus maximus*) balıklarında oral uygulamayı takiben iyi sonuçlar alınmıştır. Salmonidlerde ise bu uygulama değişken sonuçlar vermiştir. Yapılan çalışmalarda Johnson ve Amend, (1983) ve Vigneulle, (1990) tarafından olumlu sonuçlar alınırken, Baudin Laurencin ve Tangtrongpiros, (1980) ve Horne vd., (1982) tarafından ise etkisiz olduğu belirlenmiştir. Bu değişken sonuçlar yeme ilave edilen antijenin midede yıkımlanmasına kısmen bağlı olabilmektedir. Bu fikir Johnson ve Amend (1983)'in yapmış olduğu çalışma ile desteklenmiştir. Bu çalışmada Sockeye salmonlarına bakterinin tek doz halinde anal intübasyonla verilmesini takiben 59. günde vibriosise karşı yüksek düzeylerde koruma elde edilmiştir. Bu durum antijenin hiçbir değişime uğramadan son bağırsağa ulaşması ile sağlanmıştır. Anal intübasyon ile sağlanan bağışıklığın, oral ve kısa süreli banyo ile aşılama sonrası bağışıklıktan daha iyi olduğu tespit edilmiştir (Vigneulle and Baudin Laurencin, 1991).

Oral aşılamanın mekanizmasını henüz tamamen anlayamamıştır. Fakat birçok araştırmacı oral yolla uygulanan aşının etkinliği ve absorpsiyonunu çalışmışlardır. Davina vd. (1982), Rosy barbunda, vibrio bakterininin son bağırsaktaki epitelyum hücreleri tarafından pinositozis yolu ile absorbe edildiğini göstermişlerdir. Absorpsiyon işlemi aşılama sonrası 6. güne kadar devam etmiştir. Aynı zamanda, bağırsakta intra epitel lökositlerin sayısının da artış gösterdiği tespit edilmiştir. Nelson vd. (1985), oral olarak aşıladıkları gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarında vibrio antijenini belirlemelerine rağmen, diğer organlarda tespit edememişlerdir. Benzer şekilde Tatner vd. (1984), gökkuşağı alabalıklarında formalinize edilen *A.salmonicida*'nın gastrik intübasyonu takiben yalnızca bağırsak bölgesinde saptandığını bildirmiştir (Vigneulle and Baudin Laurencin, 1991).

Oral aşılama en önemli problem bakterinin mide ve bağırsağın ön kısmında sindirim sıvılarının etkisiyle yıkımlanmasıdır. Bu amaçla oral aşılar iyi sonuç alınabilmesi için aşının enkapsülasyon ile mide ve bağırsakta yıkımlanmasına engel olunması gerekmektedir (Ellis, 1988). Bu nedenle oral yolla verilecek aşıların

bağırsağın birinci kısmında sindirilmesini önlemek ve bağışıklık sistemini uyaracak antijenik determinantların bozulmadan ikinci kısma geçmesini sağlamak için kapsüllenmeleri gerekmektedir (Ellis, 1988; Joosten et al., 1995; Joosten et al., 1997; Lavelle et al., 1997; Sommerset et al., 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda antijenlerin sodium alginat (Joosten et al.,1997), biyolojik antijen taşıyıcıları (Joosten et al.,1995) ve PLG (Polylactide co glycolide) gibi polimerler kullanılarak hazırlanan mikropartiküller içerisinde yemle balıklara verilmesi sonucu oral aşılama başarılı sonuçlar alınmıştır (Joosten et al., 1997; Lavelle et al., 1997). Aşılar için oral olarak veriliş yöntemlerin geliştirilmesi için polimerik kaplamaların veya kapsülasyonun dahil olduğu birkaç yaklaşım bulunmaktadır. Bu yaklaşımlar; PLG mikropartikülleri, enterik kaplayan polimerler, aljinat mikrokapsüller, tabletler, granüller, nişasta mikrokapsüller, jelatin kapsüller ve polyamino asit mikrosferlerdir (Rombout and Joosten 1997; Vila et al., 2002; Yazıcı, 2004). Bütün bu yaklaşımların amacı; antijenin mide ve bağırsakta parçalanmasını azaltarak antijen absorpsiyonunu arttırmak, bağırsakta kalış süresini arttırmak, bağırsakla bağlantılı lenfoid dokuda antijenin alınışını teşvik etmek ve yeterli seviyede bağışıklık oluşturmak için gerekli antijen dozunu azaltmaktır (Lavelle et al., 1997; Rombout and Joosten 1997; Yeh et al., 2002).

Oral aşı için yeni veriliş sistemlerinin geliştirilmesinde antijenlerin polimerle kapsülasyonu kullanılmaktadır (Lavelle et al., 1997; O'Hagan, 1998; Sing and O' Hagan, 1998). Polimerler doğal ve sentetik polimerler olarak kullanılmaktadır. Doğal polimerlerden nişasta, aljinat ve jelatinler kapsülasyon işlemlerinde kullanılmaktadır. Sentetik polimerlerden en çok tercih edilen ise polylactide-co-glycolide (PLG) polyanhidridleridir (Lavelle et al., 1997; Singh and O' Hagan, 1998; Yeh et al., 2002).

PLG'ler; biyolojik olarak çözünebilen, insanlarda kullanımındaki güvenilirliğiyle ilgili uzun bir tarihe sahip olduğu için tercih edilmektedir. Yaygın olarak kullanılan laktid / glykolid oranı 50/50' dir (Lavelle et al., 1997; O' Hagan, 1998; Singh and O' Hagan 1998; Vila et al., 2002). Bu tip polimerler; diğer alternatif PLG polimerleriyle

karşılaştırıldığında, nispeten daha hızlı çözünme oranlarına sahip olduğu belirtilmiştir (Singh and O'Hagan, 1998).

Doğal ve sentetik polimer kullanımının birbirine göre çeşitli avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Sentetik polimerler, daha kolay üretilebilirler ve istenen parçalanma oranlarına, molekül ağırlıklarına ve co-polimer kompozisyonlarına göre hazırlanabilmektedir. Bununla birlikte, sentetik polimerler, sınırlı çözünürlüğünden dolayı dezavantajlı olabilmektedir. Genelde sadece organik çözücülerde çözünürler. Ayrıca biyolojik olarak antijeninin aktif salınımı gerçekleşmeyebilir. Hem doğal hem de sentetik polimerler bol miktarda ticari olarak bulunabilmektedir (Singh and O'Hagan, 1998; Yazıcı, 2004).

Oral aşı çalışmalarında temel olarak polimerler tercih edilirken; toksisitesi, iritansı, allerjikliği ve biyolojik olarak parçalanabilirliği göz önünde bulundurulması gereken faktörler olarak belirtilmiştir. PLG, biyolojik olarak parçalanabilmesi, farmasetikal olarak onaylanmış bileşik olması ve absorpsiyonu uygun oranda sağlanmasından dolayı tercih edilmektedir (Lavelle, 1997; Singh and O'Hagan, 1998; Yeh et al., 2002).

Günümüzde kemikli balıkların bağırsaklarından mikrokürelerin absorpsiyonu ile ilgili çok az çalışma vardır. Memelilerde mikropartiküllerin oral olarak uygulanmasından sonra bağırsaktan çok az sayıda geçerek absorbe oldukları tespit edilmiştir. Taşınmanın ana yolu Peyer's patches'de M (mikrofold) hücreleri yolu ile olduğu görülmüştür. Kemikli balıklarda ise M hücrelerinin analogu bulunmamasına rağmen çeşitli türlerde antijenler 2. bağırsak bölgesinde (arka bağırsak) bulunmuştur. Hareketsiz partikül maddelerin alınmasını sağlayan fonksiyon kesin olmamakla birlikte, yapılan bir çok çalışmada kemikli balıkların bağırsaklarından bakterinlerin absorpsiyonu gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar absorbe edilen bakteriyel hücrelerinin mukozadan daha uzağa taşınmadığını rapor etmişlerdir (Lavelle et al., 1997).

Aşıların oral olarak verilmesi balık aşılması için en arzu edilen metot olarak tanımlanmıştır. Oral aşılar stres oluşturmaksızın çok sayıda balığa kolay bir şekilde uygulanabilir ve hatta genç balıkların aşılması için kullanılabilir. Oral aşılama ile

ilgili olumlu sonuçlar alınmasına rağmen, injeksiyon ya da kısa süreli banyo metotları ile karşılaştırıldığında etkisi daha azdır. Ve daha çok aşıya ihtiyaç gerektirir. Bunun nedeni enterositler tarafından alınmadan önce sindirim sisteminde aşılardan parçalanması ve bu yüzden balığın bağışıklık sistemine daha düşük miktarda antijen ulaşmasıdır. Bağırsaktaki epitel hücreleri tarafından antijen alımı, antijeni işleme sokan hücrelere nakli ve lenfositlerin uyarılması ile bağışıklığın gelişimi ve oral aşılardan sonraki hafıza oluşumunu sağlamak için gereklidir. Antijenlerin anal ve oral olarak uygulanması sistemik bağışıklığı oluşturduğu gibi mukosal bağışıklığı da oluşturabilir. Sonuç olarak antijenler oral olarak verildiğinde ve son bağırsak tarafından yeterli miktarda alındığında daha iyi bir bağışıklık oluşturulabilir. Bununla birlikte antijenin de alımdan önce uygun bir formda bağırsağa ulaşması gerekir. Taşınması esnasında antijenin parçalanmaya karşı korunmasını sağlayan mikropartiküller; bir bakterinin antijenik kısmının enkapsüle edilmesiyle oral aşılama için olanak sağlamaktadır (Joosten et al.,1995)

Lavelle vd. (1997), insan gama globulin'i (HGG) PLG (poly-lactide-co-glycolide) mikropartikülleri ile enkapsüle edilip, oral olarak gökkuşağı alabalıklarına (100-200gr) uygulamışlardır. Hazırlanan mikroküreler, yuvarlak şekilli ve ortalama çapı 10µm'dir. Western blotting tekniği kullanılarak, eriyik ve mikroenkapsüle edilmiş antijenin bağırsak boyunca geçiş dinamiklerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Mikropartikülle edilen HGG'nin, bağırsak bölgesine daha uzun sürede geçtiği ve midede antijenin tutunma süresinde artış olduğu tespit edilmiştir. HGG'nin mikroenkapsüle edilerek verilmesinden sonra antijenin parçalanmış formda bağırsak içeriğinde olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, fazla miktarlarda parçalanmamış antijenin bağırsağın son kısmı ve kan dolaşımında olduğu belirlenmiştir. Mikrokapsüle edilmiş HGG ile oral olarak aşılama sonucunda serumda spesifik antikorlar tespit edilmiştir. Bu antikorların düzeyleri, eriyik antijen uygulanmasından elde edilene göre önemli derecede bir farklılık göstermemiştir. Bununla birlikte spesifik antikorlar balığın bağırsak mukozasında da tespit edilmiştir (Lavelle et al., 1997).

Mikropartikül büyüklükleri olarak ortalama 10 µm veya daha az olanlar tercih edilmektedir. Küçük partiküller, içine aldıkları antijenleri bağırsaklarda da

koruyabilmelerine rağmen bağırsak duvarı boyunca biyoadheziv mekanizmaların etkileşimini teşvik ettiği öne sürülmektedir. Buna karşılık, 10 µm' den daha büyük olarak hazırlanmış partikül formülasyonları genellikle basit bir şekilde antijenleri mide asidine ve enzime karşı korumak için ve de antijeni bağırsakta salıvermek için dizayn edilmektedir. Çeşitli polimerlerden yapılmış mikropartiküllerin vücuda alınması ve bağırsaklardan geçirilmesi yaygın olarak literatürlerde belirtilmiştir (Sing and O' Hagan, 1998; Hilbert et al., 1999; Vila et al., 2002; Yeh et al., 2002, Ji-Yuan Tian et al., 2008).

Aşının inaktive edilme ve uygulama yöntemlerinin dışında immunizasyonda etkili olan faktörler;

1. Balığın büyüklüğü
2. Su sıcaklığı
3. Aşının sulandırılma (dilüsyon) oranı
4. Aşı suşu ve serotipinin önemi
5. Aşılarda booster (bağışıklığı arttırmak için yapılan destek aşı) uygulama
6. Antijenin yapısı
7. Antijenik rekabet
8. İmmunostimulantlar ve Adjuvantlar
9. İmmun sistemin baskılanması olarak sıralanabilir.

2.1.6.1. Balığın büyüklüğü

Balığın büyüklüğü (ağırlığı veya yaşı) bağışıklığın oluşmasında önemlidir. Vibriosis ve ERM'ye karşı bağışıklığın başladığı minimal büyüklük 1 g'dır (Ellis, 1988).

Amende ve Eshenour (1980), banyo yöntemiyle 1 g'ın altındaki balıklarda belirgin bir koruma gelişmediğini, 4 g ağırlığındaki balıklarda ise optimum bağışıklığın oluştuğu belirtmiştir (Tıravoğlu Demirtaş, 2006).

Johnson vd. (1982) çeşitli büyüklükteki alabalıkları ticari bir aşının 10 kat sulandırmasıyla 20 saniye süreyle banyo yolu ile aşılamıştır. Epruvasyon sonucunda bağışıklığın 1 gramlık balıklarda 120 gün, 2 gramlıklarda 180 gün, 4 g ve daha

büyük balıklarda 1 yıl veya daha fazla sürdüğünü tespit etmişlerdir (Tıravoğlu Demirtaş, 2006).

Tatner ve Horne (1983)'un yapmış oldukları çalışmada, 2-14 haftalık gökkuşağı alabalığı frylarında farklı aşılama metotlarının uygulanması sonucu, balıklarda *V.anguillarum*'a karşı başlangıç bağışıklığın gelişimi test edilmiştir. Çalışmada aşı suşu olarak kalkan balıklarında izole edilen *V.anguillarum* kullanılmıştır. Hazırlanan aşı 2, 4, 6, 10 ve 14 haftalık frylara direkt kısa süreli banyo, 4 haftalık frylara oral ve 10 ve 14 haftalık frylara i.p. enjeksiyon olacak şekilde uygulanmıştır. Kısa süreli banyo yolu ile yapılan aşılama balıklar 10 kat dilue edilmiş aşı içerisinde 10 dakika süre ile bekletilmiştir. İ.p. enjeksiyon ile aşılama frylara 0,05 ml formalinize aşı verilmiştir. Oral aşılama 4 haftalık frylara aşı günde bir kere olacak şekilde, 28 gün boyunca verilmiştir. Aşı yeme sprey yolu ile ilave edilmiş ve 100 g yeme 15 ml aşı spreylenecek hazırlanmıştır. Uygulanan aşuların etkinliğinin belirlenmesi amacıyla banyo yolu ile 10^7 kob/ml dozunda 30 dk süre ve i.p. olarak 2.10^6 kob/ml dozunda eprüvasyon yapılmıştır. 6-8 haftalık dönemde yavrularda banyo ile yapılan eprüvasyon sonucu hastalık oluşturulamamıştır. Ancak çok yüksek dozda bakterinin uygulanması ile düşük düzeylerde spesifik ölümler meydana gelmiştir. Frylar 0,5 g ulaştıklarında (10 haftalık) i.p. yolla aşılama % 100, kısa süreli banyo yolu ile aşılama % 50 koruma sağlanmıştır. İlk besleme döneminden itibaren yapılan oral aşılamanın bağışıklık gelişimi üzerine etkisiz olduğu belirlenmiştir (Tatner and Horne, 1983).

Tatner ve Horne (1983), 2 haftalık frylara aşılama 4 hafta sonra hem banyo hemde i.p. yolla eprüvasyon yapmıştır. Kısa süreli banyo yöntemi ile aşılanmış frylarda 1 ay sonra banyo yoluyla eprüvasyon yapılmış ve korumanın olmadığı tespit edilmiştir. Aşılı balıklarda yaşama oranı % 75 iken, kontrol grubunda % 72 olarak bulunmuştur. Kısa süreli banyo yolu ile aşılanan 4-6 haftalık frylara (0.14-0.21 g) i.p. yolla eprüvasyon yapıldığında ise % 17-30 oranında koruma sağlandığı belirlenmiştir (Tatner and Horne, 1983).

Oral aşılama, fryların ilk beslenmeye başladıkları dönemde uygulanmıştır. Aynı dönemde olan diğer bir gruba da kısa süreli banyo yolu ile aşılama uygulanmıştır.

Aşılamadan 4 hafta sonra i.p. yolla eprüvasyon yapıldığında kısa süreli banyo yolu ile aşılanan balıklarda % 17 oranında koruma sağlanırken, oral aşı verilen balıklarda korumanın olmadığı tespit edilmiştir. Frylar, yeteri kadar büyüklüğe ulaştığında (ort. 0,5 g) i.p. yolla aşılama yapılmıştır. İ.p. aşılama takiben 4 hafta sonra yapılan eprüvasyon da % 100 koruma elde edilmiştir. Aynı dönemdeki frylara yapılan kısa süreli banyo aşı ise % 50 koruma sağlanmıştır. 14 haftalık dönemde intraperitoneal enjeksiyon ve kısa süreli banyo yolu ile aşılamada sırasıyla % 60 ve % 68 oranında koruma sağlanmıştır (Tatner and Horne, 1983).

Ayrıca 16.,18. ve 20. haftalardaki frylara (4.21±2.29 g ağırlığındaki) kısa süreli banyo ve i.p. yolla aşılama yapılmıştır. Aşılamadan 4 hafta sonra intraperitoneal enjeksiyon yolu ile yapılan eprüvasyon'da kısa süreli banyo aşıda % 50-70 ve intraperitoneal enjeksiyon yollu ile aşılamada ise % 60-100 düzeylerinde koruma elde edilmiştir (Tatner and Horne, 1983).

Tatner ve Horne (1984)'un yapmış oldukları çalışmada, erken dönemde *V.anguillarum* aşısı yapılan gökkuşağı alabalığı frylarında bağışıklığın gelişimini araştırmışlardır. Denemede 3-10. haftalar arasındaki frylara kısa süreli banyo, 10-18. haftalar arasındaki frylarda hem kısa süreli banyo hem de i.p. yolla aşılama yapılmıştır. Kısa süreli banyo ve i.p. aşılanan gruplardaki frylar antijene önceden maruz bırakılıp aşılanan ve antijene önceden maruz bırakılmadan aşılanan gruplar olarak 2'ye ayrılmıştır. Antijene maruz bırakma, i.p. ve kısa süreli banyo yolu ile aşılamadan 2 hafta önce yapılmıştır (Tatner and Horne, 1984).

Deneme sonunda ortalama 0,4 gr ağırlığındaki 10 haftalık frylara kısa süreli banyo aşı uygulamasını takiben orta seviyelerde koruma (% 36-75) tespit edilmiştir. 0,5 grama ulaşan frylarda kısa süreli banyo ile yapılan aşılama % 16-100, i.p. aşılama ile % 25-100 arasında değişen seviyelerde koruma elde edilmiştir. 10 haftalık frylarda önceden antijene maruz bırakılarak kısa süreli banyo ve i.p. yolla aşılanan gruplarda aşılamayı takiben elde edilen koruma seviyeleri, önceden antijene maruz bırakılmadan aşılanan balıklara göre önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Önceden antijene maruz bırakılan gruplarda beklenildiği kadar bağışıklık gelişmemiştir. Kontrol gruplarında ise sadece % 57 oranında ölüm görülmüştür. 0.088-0.136 g

arasında bulunan balıklara kısa süreli banyo yolu ile yapılan aşılama pek çok nedenden dolayı bağışıklığın gelişmediği tespit edilmiştir. Bu boydaki balıklarda bağışıklık sisteminin tepki ve tolerans oluşturmak için yetersiz olduğu ya da balıkların lenfoit sistemlerine antijen girişinin olmaması nedeniyle gelişme sağlanamamıştır. 16 haftalık önceden antijene maruz bırakıldıktan sonra kısa süreli banyo yolu ile aşılama grubunda işaretli aşı alımı önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Balıklar 0.75 g ağırlığa ulaşana kadar kısa süreli banyo yolu ile antijen alımı sağlanamadığı ve balıklarda bağışıklığın 0.481 g'dan sonra geliştiği belirtilmiştir (Tatner and Horne, 1984).

2.1.6.2. Su sıcaklığı

Soğuk kanlı hayvanlarda olduğu gibi balıklarda vücut sıcaklığı su sıcaklığı ile uyumludur. Balık türü ve sıcaklığa bağlı olarak aşılama, patojenlere maruz kalma riskinden önce belirli olan minimum bir zaman periyodu için de gerçekleştirilmelidir. Bağışıklığın başlaması sıcak su türlerinde soğuk su türlerinden daha hızlıdır. Atlantik salmonlarında 10-12° C su sıcaklığında aşılama en az 4-6 haftaya kadar kanda antikorlar tespit edilemezken, levrek gibi ılık su türlerinde (optimal sıcaklık 22 °C) aşılama 1 hafta sonra antikorlar belirlenmiştir (Sommerset et al., 2005)

Johnson ve Amend (1983) kısa süreli banyo yöntemiyle yapılan aşılama su sıcaklığının gelişen bağışıklık üzerine etkisini araştırmışlardır. Sockeye salmonlarında bağışıklığın 18 °C su sıcaklığında 5 günde, 10 °C' de 10 günde geliştiğini ve 1 g'ın altındaki ağırlıktaki balıklarda yeterli seviyede bağışıklığın şekillenmesi için aşılama kullanılan aşı solüsyonlarındaki antijen miktarının artırılması gerektiğini bildirmişlerdir (Çizelge 2.2.) (Altun, 2001).

Çizelge 2.2. Sockeye salmonlarının (3,3 g) vibrio bakterin ile kısa süreli banyo yöntemi ile aşılmasının takiben bağışıklığın başlangıç süresi üzerine su sıcaklığının etkisi (Altun, 2001).

Epruvasyon günü (<i>V.anguillarum</i>)	10°C			18°C			Kontrol		
	N	Ö.M.	%	N	Ö.M.	%	N	Ö.M.	%
5	30	13	43	30	1	3	60	34	57
10	28	2	7	30	0	0	61	31	51
15	30	0	0	30	0	0	58	30	52
20	30	1	3	30	0	0	60	36	60
120	19	2	11	40	0	0	40	30	75

N:Balık Sayısı

Ö.M.: Özel Ölüm

% : Ölüm Yüzdesi

2.1.6.3. Aşının sulandırma oranı (Dilusyonu)

Aşı uygulamalarında önemli noktalardan biriside aşının sulandırma oranıdır. Aşının sulandırıldığı durumda aşılama süresinin uzatılması gerekmektedir (Altun, 2001).

Johnson ve Amend (1983) yaptıkları bir çalışmada 1:10 ve 1:20 oranında dilüe edilmiş aşı solüsyonlarını 20 saniye süreyle banyo ve 2-5 saniye süreyle püskürtme yoluyla uygulamış ve oluşan bağışıklığı karşılaştırmışlardır. Aşısız kontrol gruplarında mortalite % 53-66 oranında bulunurken, aşıli gruplarda % 15'i geçmemiştir. Banyo ile püskürtme yönteminin etkinliği karşılaştırıldığında, epruvasyon sonucu oluşan mortalite oranları arasında önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir (Johnson and Amend, 1983).

2.1.6.4. Aşı suşu ve serotipinin önemi

Aşılamalarda etkin bağışıklığın elde edilmesi için kullanılan aşı suşu ve serotipi çok önemlidir. Dünyada vibriosis vakalarından izole edilen *V.anguillarum*'un serolojik olarak da birbirinden farklı özelliklere sahip olduğu ve 23 O serotipinin olduğu bilinmektedir. Serotip 1,2 daha az olarak da Serotip 3 tüm dünyada kültür yapılan balıklarda ölümlere sebep olan türlerdir. Kalan diğer serotipler ortamda bulunan suşlar olarak dikkate alınmaktadır. Serotip 1 antijenik olarak homojenken, Serotip 2

ve 3 antijenik olarak heterojendir ve kendi içerisinde Serotip 2 α ve 2 β , Serotip 3 α ve 3 β olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (Balebona et al.,1998; Toranzo et al., 2005).

Serotip 2 α Salmonid olan ve olmayan balıklarda, Serotip 2 β ise güçlü olarak deniz balıklarında bulunmuştur. Serolojik ve genetik çalışmalar *V.anguillarum* enfeksiyonlarının orijinlerinin anlaşılmasını sağlayan epidemiyolojik değere sahiptir. Bu bilgilerin sağlanması uygun aşı programlarının geliştirilmesi ve antimikrobiyal tedavilerin dizaynı için yararlı olacaktır (Balebona et al.,1998; Toranzo et al., 2005).

2.1.6.5. Destek aşuların kullanımı

Balıklarda aşı uygulamalarında uzun süreli bağışıklık sağlamak amacıyla destek (booster) aşı yapılması etkili olmaktadır. Balıklarda kayıpların çoğu küçük boyda olmaktadır. Bu nedenle balıklar 2-3 g ağırlıkta iken aşılana başlanmaktadır. Küçük boydaki aşılama ile, aşı yöntemine göre değışmekle birlikte ortalama 100-180 gün arasında bir bağışıklık sağlanmaktadır. Oysa balıkların üretim periyodu boyunca hastalanma riski mevcuttur. Bunun için balıklarda bağışıklığın sağlanabilmesi için destek aşular uygulanmaktadır (Altun, 2001).

Thorburn ve Jansson (1988), yapmış olduğu çalışmada gökkuşuğı alabalıklarını *V. anguillarum*'a karşı aynı dozda aşı ile tek veya 2 kez (4,1 g ve/veya 6,3 g) banyo yolu ile aşılamaştır. Balıklara ikinci aşılamaadan 1 ay sonra banyo yolu ile epruvasyon yapılarak aşılamanın etkinlikleri karşılaştırılmıştır. 6,3 g ağırlığında tek aşılama yapılmış grup ile 6,3 g' da destek aşı uygulanan gruplar arasında elde edilen balık ölümlerinde önemli farklılıklar bulunmamıştır. Bununla birlikte 6,3 g' lık her iki grupta, sadece 4,1 g' da aşılama balıklardan daha düşük ölümler görülmüştür. Bütün gruplarda epruvasyondan önce humoral antikor düzeyleri belirlenememişken epruvasyondan sonra antikor titrelerinde artış gözlenmiştir. Sadece 4,1 g' lık aşı balıklarda enfeksiyondan sonra elde edilen titreler diğ er gruplardan önemli derecede daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 2.3.) (Thorburn and Jansson, 1988).

Çizelge 2.3. Gökkuşığı alabalıklarının (4,1 ve 6,3 g) vibrio bakterin ile banyo yöntemi ile tek ya da iki kez aşılmasının karşılaştırılması (Thorburn and Jansson,1988)

Gruplar	Aşılama		Ölüm Oranları (%)
	4,1g	6,3 g (30gün sonra)	
I	+	-	61,8
II	-	+	16,7
III	+	+	33,3
Kontrol	-	-	91,2

Antipa vd. (1980), 5 g'lık Sockey salmonlarında (*Oncorhynchus nerka*) vibriosise karşı hiperosmatik infiltrasyon ve direkt kısa süreli banyo ile destek aşılamanın etkinliğini araştırmışlardır. Balıklar aşılamaadan sonra 2 farklı konsantrasyonda banyo yolu ile eprüvasyona maruz kalmışlardır. Sonuçta destek aşı uygulanan grupta sadece tek aşı uygulanan gruplara göre 1/10 oranında daha fazla yaşama oranı elde edilmiştir (Antipa et al., 1980).

Angelidis (2005), levrek (*Dicentrarchus labrax*) yavrularında *V.anguillarum*'a karşı destek aşı uygulamasının etkinliği araştırmıştır. Bu amaçla ticari *V.anguillarum* aşısı levrek yavrularına destek aşı olarak kısa süreli banyo yolu ile uygulanmıştır (Çizelge 2.4.).

Çizelge 2.4. *V.anguillarum*'a karşı kısa süreli banyo yöntemiyle aşılamanın etkileri (Angelidis, 2005)

Aşılama Metotu	Balık Sayısı (3g)	Kısa süreli banyo (Destek aşı)	Eprüvasyon* (Gün)	%RPS
Kısa süreli banyo	30	---	90	80
Kısa süreli banyo	30	1:10 sulandırılmış	90	100
Pozitif Kontrol	30		90	
Negatif Kontrol	30		90 (FTS uyg.)	

* i.p. yoluyla 3×10^6 kob/ml dozunda yapılmıştır

Çalışmanın sonunda destek aşı uygulanan gruplarda ölümlerin olmadığı ve kontrol grubundaki balıklarında ise eprüvasyondan 3 gün sonra ölümlerin başladığı tespit edilmiştir. Levrek yavrularında destek aşılama ile güçlü bir koruma (% 100 RPS) sağlandığı tespit edilmiştir. Patojen bakterinin verilmesinden 20 gün sonra kısa süreli banyo aşılu gruplarda ölüm oranı % 10 olarak belirlenmiştir. Aşılanmamış pozitif kontrol grubunda ise % 50, bir kez aşılananlarda ise % 10 oranında ölüm tespit edilmiştir. Negatif kontrol grubunda ise ölümlerin olmadığı görülmüştür (Angelidis, 2005).

2.1.6.6. Adjuvantlar ve immunostimulantlar

Adjuvantlar spesifik olmayan savunma mekanizmasını aktive ederek spesifik bağışıklığı arttıran maddelerdir. Aşıların adjuvant ile birlikte kullanılması antijenin depo edilerek uzun sürede salınımını ve hastalıklara karşı koruma süresini artırmaktadır (Bogwald et al., 1992).

Balıklarda bağışıklık sisteminin etkinliğinin artırılmasında bir çok kimyasal ve biyolojik madde (Alüminyum tuzları, Freund komple adjuvant, Muramil dipeptit, LPS, saponin, glukoz, dekstran sülfat, Vitamin C, Vitamin E, levamisol, Echinascidia turbinata ekstraktı bileşikleri, SDS, NaCl, Kadmiyum, Germanyum) adjuvant ve immunostimulant olarak kullanılmaktadır (Bogwald et al., 1992).

Alderman (1988), Glukozun balıklarda *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* ve *Yersinia ruckeri*'ye karşı direnci arttırdığını belirtmiştir (Altun, 2001).

Freund komple adjuvant, antikor üretimini artırması ve yüksek immunostimulant etkiye sahip olması nedeniyle balıklarda kullanılmaktadır. Ancak bu adjuvantın kullanılması ile enjeksiyon bölgesinde nekrotik odakların oluşabileceği belirtilmiştir (Ellis, 1988).

Morrison vd. (2001), yapmış oldukları çalışmada Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)'larına adjuvantlı (levamisol) veya adjuvantsız *Vibrio anguillarum* aşısını i.p. enjeksiyon ve banyo yolu ile uygulamıştır. Aşıların olası yan etkilerini solungaç, deri, ön böbrek ve dalakta histolojik olarak incelemiştir. İncelenen deri, ön böbrek

ve dalağın histolojik yapısında aşılama kaynaklı herhangi bir değişiklik tespit edilememiştir. Bununla birlikte solungaçlarda hem i.p. enjeksiyon hem de banyo yoluyla adjuvanlı aşı uygulanan balıklarda patolojik olarak değişiklik gözlenmiştir. Solungaçlarda patolojik olarak klorid hücrelerinde proliferasyon, lamellalarda ödem, mukus hücrelerinde hiperplazi, inflamasyon ve nekroz tespit edilmiştir. Epitel hücrelerinde ki hiperplazi ve hipertrofi lamellalarda erime ile sonuçlanmıştır (Morrison et al., 2001).

2.1.6.7. Antijenik rekabet

Balıklarda iki farklı antijenik unsurun birlikte verilmesinin antijenik rekabete neden olabileceği belirtilmektedir (Ellis, 1989). Ancak Amend ve Johnson (1984), *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*'nin çeşitli kombinasyonlarının salmonidlerde antijenik rekabete neden olmadığını belirtmiştir (Altun, 2001).

2.1.6.8. İmmun yanıtı baskılayan faktörler

Balıklarda yetiştiricilik şartlarında meydana gelen değişiklikler stres oluşumuna neden olarak kortikosteroidlerin salgılanmasını arttırmaktadır (Ellis, 1988). Pickering (1989) tarafından akut stresin balıklarda kortikosteroid seviyesini arttırdığı bununda bağışıklığı baskıladığı belirtilmiştir. Yetiştiricilikte çevresel ya da insan kaynaklı (fotoperiyot, mevsimsel değişiklikler, tuzluluk, ağır metaller, yoğun stoklama, handling, antibiyotik kullanımı ve nakil gibi) faktörlerin neden olduğu stres, bağışıklığın baskılanması sonucu aşının etkinliğini sınırlamaktadır (Sommerset et al., 2005).

2.1.7. *V.anguillarum* üzerine yapılan immunizasyon çalışmaları

Gross ve Carson (2007)'un yapmış oldukları çalışmada 1000 adet gökkuşaağı alabalığı (*O. mykiss*) ticari Vibriosis aşısı (Anguillavac-C) ile intraperitoneal yolla aşılanmıştır. Balıklar aşılamadan sonra 3,7, 5,6, 9,0. aylarda *V.anguillarum*'un önceden belirlenen LD₆₀ dozu ile epruvasyona tabi tutulmuş ve 9. aya kadar korumada azalmanın olmadığı belirlenmiştir. Aşılı balıkların RPS oranı 3,7, 5,6 ve 9

ayda sırasıyla % 74, 74 ve 97 olarak belirlenmiştir. Böylece adjuvantsız kullanılan ticari aşı Anguillvac-C'in uzun üretim periyodu boyunca gökkuşağı alabalıklarında vibriosise karşı etkili olduğu görülmüştür (Gross and Carson, 2007).

Bonaldo vd. (2003), 20 g'lık levrek yavrularında vibriosise karşı oral ve kısa süreli banyo yolu ile aşılamanın etkinliğini kanda antikor titresinin ELISA yöntemiyle belirlenmesi ile tespit etmişlerdir. Oral aşı uygulamasında; alginatla kaplanmış vibrio aşısı yüksek ve düşük dozda olmak üzere 2 farklı şekilde betaglukan ile kombine edilerek yeme ilave edilmiştir. Balıklar oral aşıyla yem ile 5 gün süreyle beslenmişlerdir. Her deneme grubundaki balıklarda antikor titresini başlangıç düzeyiyle karşılaştırıldığında düzenli bir artış göstermiştir. En yüksek antikor titresine kısa süreli banyo yöntemiyle aşılanan balıklarda ulaşılmıştır. Düşük dozlu betaglukan ile kombine edilen oral aşı grubunda, yüksek dozda uygulanana göre daha fazla antikor titresini elde edilmiştir. Levrek yavrularında alginatla kaplanmış oral aşı ile betaglukanların kombinasyonunun başlangıç bağışıklığı ve antikor titresini düzenlediği tespit edilmiştir (Bonaldo et al., 2003).

Dec vd. (1990)'in yapmış oldukları çalışmada levrek balıklarında vibriosise karşı oral aşının etkinliğini araştırmışlardır. Fransa'dan izole edilen *V.anguillarum* 408 suşundan hazırlanan antijeni hem oral, hem de i.p. enjeksiyon yoluyla balıklara uygulanmış ve her iki yöntemin etkinliği karşılaştırılmıştır. Deniz levreklerinde i.p. aşılama için 2×10^{10} kob/ml konsantrasyonda hazırlanmış olan ticari Vibri-fa injectable aşı kullanılmıştır. Oral aşı için; 2.10^{11} kob/ml konsantrasyonunda Vibri-fa BAİN adlı aşı kullanılmıştır. 10-50 g ağırlığındaki deniz levreklerinde günlük olarak verilen 90 g yeme 3 ml aşı ilave edilerek balıklar 5 gün süreyle beslenmiştir. Levrek balıklarında aşılama 33 ve 79 gün sonra i.p. yolla sırasıyla $9,5 \times 10^6$ kob/ml ve $2,6 \times 10^7$ kob/ml patojenik *V. anguillarum* vermek suretiyle aşının koruyuculuğu test edilmiştir. Oral yolla aşılanmış balıklarda aşılama 33 ve 79 gün sonra yapılan epruvasyonda aşı grubunda sırasıyla % 11,3 ve % 71,4 ölüm belirlenirken, kontrol grubunda sırasıyla % 40,9 ve % 92,8 oranında ölüm görülmüştür. Aynı araştırmacılar on kat dilüe aşığı balıklara 0.2 ml i.p. enjeksiyon yolu ile uygulaması sonucunda 33. ve 79. günlerdeki epruvasyonda sırasıyla % 0 ve % 10,7 oranında ölüm görüldüğünü bildirmişlerdir (Çizelge 2.5.). Levrek balığına i.p. ve oral yolla aşılama sonrası

33. günde yapılan ilk epruvasyon'da oldukça önemli düzeyde koruma elde edilirken, 2. epruvasyon da (79. gün) oral aşılamanın sağladığı koruma düşük düzeylerde, fakat hala önemli olduğu tespit edilmiştir (Dec et al., 1990).

Çizelge 2.5. Levrek balıklarında oral ve injeksiyon yöntemiyle aşılama sonrası aşının etkinliğinin karşılaştırılması (Dec et al., 1990)

Aşılama Metodu	Balık Sayısı (10-50g)	Aşı Konsantrasyonu	Epruvasyon (Gün)	Ölüm Oranları (%)	RPS
Oral	150	2×10^{11} kob/ml	33	11,3	72,4
İnjeksiyon	150	2×10^{10} kob/ml	33	0	100
Kontrol	150	-	33	40,9	--
Oral	150	2×10^{11} kob/ml	79	71,4	23,1
İnjeksiyon	150	2×10^{10} kob/ml	79	10,7	88,4
Kontrol	150		79	92,8	--

Çağırğan (2004)'ın yapmış olduğu çalışmada Levrek yavrularında *V. anguillarum* Serotip 1'den hazırladığı aşının etkinliğini tespit etmiştir. Bu araştırmada levrek balıklarından bir grup sadece bir kez banyo yoluyla diğeri ise iki kez banyo yoluyla aşılanmıştır. İlk aşılama balıklar 0,5-3 g iken 2×10^9 kob/ml bakteri içeren aşı ile 30 saniye, ikinci aşılama balıklar 10-15 gramken 1 dakika süreyle daldırma yöntemiyle uygulanmıştır. Korunma 21 gün ve 240 gün sonra sırasıyla banyo ve intra peritoneal enjeksiyon yöntemiyle epruvasyon oluşturularak belirlenmiştir. Aşılı ve kontrol gruplarına $1,23 \times 10^7$ kob/ml patojenik *V. anguillarum* Serotip O1 içeren deniz suyunda 40 dakika süreyle banyo yaptırılmıştır. Aşılı ve kontrol grubunda sırasıyla % 10 ve % 59 oranında ölüm görülmüştür. Hesaplanan Oransal yaşama oranı (RPS) % 83 olarak tespit edilmiştir. İkinci epruvasyon intra peritoneal yolla 0,5 ml fosfat tuz tamponu içinde (PBS, pH 7,4) $1,75 \times 10^5$ kob/ml patojenik *V. anguillarum* Serotip O1 verilerek gerçekleştirilmiştir. Bir ve iki kez aşılı gruplarda ölüm oranları sırasıyla % 53 ve % 27,5, aşısız grupta ise % 71 olarak bulunmuştur. Sonuçta, 2 kez aşılanan grupta, aşılamadan 240 gün sonra iyi bir korunmanın olduğu ortaya konulmuştur (% 61,3 RPS) (Çizelge 2.6.) (Çağırğan, 2004).

Çizelge 2.6. Türkiye’de Levrek balıklarında *V.anguillarum* Serotip 1’den hazırlanan aşının etkinliğine ait sonuçlar (Çağırğan, 2004)

Aşılama Metodu	Balık Sayısı (0.5-3g)	Kısa süreli banyo (Destek aşısı)	Eprüvasyon (Gün)	RPS
Kısa süreli banyo	1500	----	21	83
Kısa süreli banyo	1500	1:10 sulandırılmış	240	61,3
Kontrol	1500		21	
Kontrol	1500		240	

* I. Eprüvasyon (21.günde) $1,23 \times 10^7$ kob/ml dozunda banyo yolu ile
 II.Eprüvasyon (240.günde) $1,75 \times 10^5$ kob/ml dozunda i.p. yolla balığa uygulanmıştır

Bowden vd. (2002), denizde kültürü yapılan Atlantik halibutlarında (*Hippoglossus hippoglossus*), *V. anguillarum*’a karşı kısa süreli banyo, injeksiyon, oral intübasyon ve anal intübasyon yoluyla aşılama yöntemlerinin etkinliği karşılaştırılmıştır. 5 gruba ayrılan 175 adet balık farklı aşılama yöntemleri ile aşılanmıştır. Aşılamayı takiben 12 hafta sonra 1×10^7 kob/ml dozunda *V. anguillarum* Serotip 02α ile eprüvasyona tabi tutulmuşlardır. Balıkların RPS değerleri injeksiyon ve kısa süreli banyo yönteminde % 100 olarak tespit edilmiştir. En düşük koruma oral intübasyon yönteminde sağlanmıştır (Çizelge 2.7.) (Bowdwen et al., 2002).

Çizelge 2.7. Atlantik halibutları (40 g) üzerinde kısa süreli banyo, injeksiyon, oral intübasyon ve anal intübasyon yöntemleriyle *Vibrio anguillarum* (Serotip 02α) bakterinin aşılama sonucu immunizasyon etkilerinin karşılaştırılması (Bowden et al., 2002)

Aşılama Yöntemi	Balık Sayısı	RPS oranı
İnjeksiyon	35	100
Kısa süreli banyo	35	100
Oral İntübasyon	35	50
Anal intübasyon	35	80
Kontrol	35	0

Bogwald vd. (1992)’in Atlantik salmonları ile yapmış oldukları çalışmada, balıklar *V. salmonicida* ve *V. anguillarum* serotip 01’den hazırlanan özel lipopolisakkarit

antijenleri (LPS) ile i.p. yolla aşılanmıştır. Aşılamadan sonra canlı bakteri ile yapılan epruvasyon sonucu aşının hastalığa karşı korumada etkisiz olduğu tespit edilmiştir. Ölüm oranları aşılanmamış grupta % 55'e ulaşmıştır. Antijen olmaksızın sorbal partiküllerin tek başına verildiği grupta % 65 oranında ölümler görülmüştür. Partiküllere adsorbe edilen LPS ile injekte edilen grupta enfeksiyona karşı çok az da olsa koruma sağlanmıştır (% 40 ölüm oranı). Tüm bakteriyel hücrenin injekte edildiği grupta ise ölüm oranı % 10 olarak tespit edilmiştir (Bogwald et al., 1992).

Bununla birlikte, *V. anguillarum* serotip 02' nin özel LPS preparatları ile aşılanan balıklarda yüksek koruma sağlanmıştır. Aşılanmamış salmonlarda *V. anguillarum* serotip 02 ile yapılan enfeksiyonda % 80 oranında ölüm görülmüştür. Oleik asit veya bovin serum albumin ile kaplanarak hazırlanan LPS partikülleri ile aşılama, kaplanmadan verilen aşıya göre biraz daha fazla koruma sağlamıştır. Sorbal partiküllerin tek başına verildiği grupta, hastalığa karşı spesifik olmayan bir koruma elde edilmiştir (% 55 ölüm oranı). Böylece partikül LPS preparatları ile aşılanan balıklarda % 10 ölüm oranı ile hastalığa karşı yüksek koruma sağlanmıştır. Formalinle öldürülmüş tüm hücre ile aşılanan balıklarda ise en yüksek koruma elde edilmiştir (Ölüm oranı % 8) (Bogwald et al., 1992).

Li vd. (2005), yapmış oldukları çalışmada Japon yassı balığında *V.anguillarum*'a karşı i.p. yolla aşılamaı takiben i.p. olarak destek aşı uygulamasının etkinliğini incelemişlerdir. 5×10^8 ve 2×10^9 kob/ml yoğunluğunda hazırlanan aşı 60-90 g ağırlığındaki balıklara sadece injeksiyon ve Freud Incompleyt Adjuvant ilave edilmiş injeksiyon aşı (1:1) şeklinde uygulanmıştır. Aşının etkinliği 110 gün sonra yapılan i.p. enjeksiyon yolu ile yapılan epruvasyon'la belirlenmiştir. Sonuçta en iyi korumanın $1,2 \times 10^9$ kob/ml dozda 1. ve 2. aşı uygulanmış grupta elde edilirken (% 93,8 RPS), 5×10^8 kob/ml dozda aşı uygulanan grupta % 81,3, 5×10^8 kob/ml +FIA uygulanan grupta ise % 87,5 oranında yaşama oranı elde edilmiştir (Çizelge 2.8.).

Çizelge 2.8. Japon yassı balıklarında *V.anguillarum*'un farklı injeksiyon uygulamaları ile etkinliğinin belirlenmesi (Li et al., 2005)

Aşılama Metodu	Balık Sayısı (60-90g)	Destek aşısı	Eprüvasyon (Gün)	RPS
İnjesiyon A (5x10 ⁸ kob/ml)	65	5x10 ⁸ kob/ml	110	81,3
İnjesiyon B (5x10 ⁸ kob/ml+FIA)	65	5x10 ⁸ kob/ml	110	87,5
İnjesiyon C (1,2x10 ⁹ kob/ml)	65	1,2x10 ⁹ kob/ml	110	93,8
Kontrol (0,2 ml PBS)	65	(0,2 ml PBS)	110	--

FIA: Freud Incomplete Adjuvant

Günümüzde balıklara injeksiyon ve kısa süreli banyo ile aşılama yapılmasına rağmen, yararlı aşılama stratejilerinin geliştirilmesi ile birlikte oral aşı uygulaması diğer yöntemlere alternatif olmuştur (Joosten et al., 1997).

Joosten vd. (1997), yapmış oldukları çalışmada formalinle öldürülmüş ticari *V.anguillarum* bakterinini (Biovax 1300, BIOMED Inc., Washington, U.S.A.) 15 dk süreyle santrifüjleyerek 800g supernatant elde etmişler ve bu süpernatantın balıkların sindirim kanalının ön kısmında parçalanmasını engellemek amacıyla alginat mikropartikülleri ile enkapsüle etmişlerdir. 2 farklı tipte enkapsüle edilen alginat mikropartikülleri (Tip I ve tip II), *V.anguillarum* supernatant'lı ve *V.anguillarum* supernatant'sız olacak şekilde hazırlamıştır. Tip I 2,4 mg liyofilize V.a. sup/g ve Tip II 10,6 mg liyofilize V.a. sup./g içermektedir Bu mikropartiküllerin in vitro'da karakterizasyonu optik mikroskopta belirlenmiştir. Mikrokürelerin çapları 1-20 µm arasında değişmekte ve ortalama çapı 5 µm olarak ölçülmüştür (Joosten et al., 1997).

Bu çalışmada 2 farklı tipte (tip I ve II) hazırlanan mikropartikül aşısı sazan ve gökkuşığı alabalıklarının yemine ilave edilerek verilmiştir. Sazan ve alabalıklar günlük olarak 16,67 g yem/ kg canlı ağırlık olacak şekilde beslenmiştir. 2. aşılama, ilk aşılamadan 10 hafta sonra i.m. olarak uygulanmıştır. I. (oral aşı) ve 2. aşılamadan 3 hafta sonra balıklardan kan alınarak serumda antikor titreleri tespit edilmiştir (Joosten et al., 1997).

Sazanlarda en iyi hafıza enkapsüle edilen mikropartikül Tip I ile beslemeden sonra elde edilirken, alabalıklarda Tip II mikropartikül ile beslemeden sağlanmıştır. Diğer yandan tip 2 mikropartikülleri kapsüle edilmeyen antijenle karşılaştırıldığında, enkapsüle edilen antijenle beslenmeden sonra antikor titrelerinde artış görülmediği için etkisiz olduğu tespit edilmiştir (Joosten et al., 1997).

Sazanlarda enkapsüle edilen antijen ile oral olarak aşılama sonrası gelişen mukozal plazma hücrelerinin varlığı mukus-IgM spesifik monoklonal antikor kullanılarak ELISPOT testi ile belirlenmiştir. Spesifik mukozal plazma hücreleri oral aşılama sonrası başlıca bağırsak ve solungaçlarda tespit edilmiştir. I.m. aşılama sonrası ise bu hücrelere rastlanmamıştır. Bu çalışmanın sonucunda, enkapsüle edilen antijenler ile oral aşılamaya sistemik hafızayı geliştirdiği ve mukosal bağışıklığı harekete geçirdiği belirlenmiştir. Böylelikle oral aşılamaya bakteriyel hastalıkların kontrolünde kullanılabileceği görülmüştür (Joosten et al., 1997).

Anal yolla aşılama sonrası sistemik bağışıklığın gelişimi Joosten vd. (1996), tarafından belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda oral veya anal uygulama ile birçok balık türünün deri, mukus, safra veya bağırsaklarında antijene spesifik antikorlar tespit edilmiştir (Joosten et al., 1997) Oral aşılamaya sonucu oluşan mukozal bağışıklık sisteminin varlığı umut vericidir. Çünkü balıkta patojenle ilk temas, genellikle mukozal yüzeyler boyunca meydana gelmektedir. Oral aşıların etkinliğinin geliştirilmesi aşının sindirim kanalının ön kısmında meydana gelen parçalanmaya karşı antijeni koruduğu için çok önemlidir (Joosten et al., 1997).

Dekstroz küre gibi enterik kaplı antijen mikroküreler ile kaplanan *V. anguillarum*' un aside dirençli filmi Wong vd. (1992) tarafından çalışılmıştır. Coho salmonlarda 30 gün süresince korunmuş antijen ile beslemeden sonra yaşama oranı, kaplanmamış antijenle beslenenlere göre artmamıştır. Buna rağmen negatif kontrol ve kaplanmamış antijenle beslenen balıklara göre hayatta kalan balıklarda serumda ve mukusta daha yüksek oranda antikor titresini elde edilmiştir (Joosten et al., 1997).

Quentel ve Ogier de Baulny (1995), yapmış olduğu çalışmada farklı yaş ve ağırlıklardaki kalkan balıklarında ip olarak tek ve destek aşılamaya etkinliğini test etmişlerdir. Bu çalışmada *Vibrio anguillarum* 408 suşundan hazırlanan ve formalinle

öldürülmüş 2×10^{11} kob/ml dozundaki ticari Vibriffa Bain aşısı kullanılmıştır. Denemede ortalama ağırlıkları 0.4-1.3 g arasında değişen aynı orjinli 62 (grup I), 76 (grup II), 90 (grup III) ve 104 (grup IV) günlük juvenil kalkan balıkları kullanılmıştır. Balıklar $20 \pm 1^\circ\text{C}$ su sıcaklığında tek ve destek aşı ile aşılanmışlardır. Destek aşılama ilk aşılama takiben 28 gün sonra I. ve II. gruba uygulanmıştır. Kalkan balıklarında ip.yolla yapılan tek aşılama 1 ay sonra korumanın olduğu gözlenmiştir. Oransal Yaşama Oranı (RPS) 62, 76 veya 104 günlük juvenillerde aşılama sonra benzer bulunmuştur. İlk aşı uygulamasından 2 ay sonra kalkan juvenillerinin III. ve IV. gruplarında hala korumanın devam ettiği ve RPS değerleri ilk 1 aylık aşılama sonra elde edilene göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Grup I ve II de destek aşının etkisi görülmemiştir (Quentel and Ogier de Baulny, 1995)

Boesen vd. (1997)'in yapmış olduğu çalışmada, 150-200 g'lık gökkuşağı alabalıklarında farklı antijenik preparasyonlarla (formalinle öldürülmüş bakteri, ekstrasellüler ürünleri (ECP), dış membran proteinleri (OMP) ve sitoplazmik membran proteinleri (CMP)) hazırlanan bakterinin Freund's incompleyt adjuvantla (FIA) birlikte i.p. olarak uygulanmasını takiben humoral ve selüller bağışıklığa etkisi ELISA ile ölçülmüştür *V.anguillarum*'un antijen preparasyonlarının her biri ile reaksiyona giren antikor salgılayan hücrelerin sayısı ve serumda antikor titrelerindeki değişiklik aşılama sonra ki 13 haftalık periyot boyunca çalışılmıştır (Boesen, 1997).

V. anguillarum'un tüm antijenik preparasyonları ile aşılanan balıklarda antikor üretiminin olduğu görülmüştür. Serumda antikor titreleri aşılama 2 hafta sonra yükselmeye başlamış ve kullanılan antijenik preparasyona bağlı olarak aşılama sonra 4, 6 veya 8 hafta sonra maksimuma ulaşmıştır. En yüksek antikor titresi aşılama 4 hafta sonra ECP grubunda olmuştur. OMP, CMP ve formalinle öldürülmüş bakteri verilen gruplarda aşılama 6 ile 8 hafta arasında en yüksek seviyeye ulaşmış fakat aşılama 8 hafta sonra test edilen antijen preparasyonlarının titreleri arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Aşılama 13 hafta sonra hala yüksek seviyelerde antikor titreleri elde edilmiştir. Kontrol

grubunda FIA+PBS injeksiyonu ile oluşan antikor titresi 13 haftalık deneme süresince aşılı gruplara göre düşük düzeyde bulunmuştur (Boesen, 1997).

Boesen vd. (1999)'ın yapmış olduğu çalışmada sockeye salmon, ayu ve gökkuşığı alabalığında *V. anguillarum*'a karşı oral veya kısa süreli banyo yolu ile aşı uygulaması sonucunda yapılan eprüvasyona karşı koruma sağlanmış ve bu korumanın spesifik serum antikor cevabında görülen artış ile bağlantısının olmadığı ifade edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda *V.anguillarum* antiserumu ile pasif olarak immunize edilen balıklarda antikorun bu bakteriye karşı korumaya yardımcı olduğu belirlenmiştir. Bu durum oral ve kısa süreli banyo aşılama, koruma ölçütü olan mukozal bağışıklığı harekete geçirdiği için meydana gelmiştir. Fakat *V. anguillarum*'a karşı etkili koruma için düşük yada hiç belirlenemeyen düzeylerdeki spesifik antikorlarda yeterli olabilmektedir. Harrell vd. (1976), normal serumda oldukça dilue olarak bulunan bağışık serumun, *V. anguillarum*'u büyümesini inhibe ettiği ya da tamamen durdurduğunu tespit etmişlerdir (Boesen et al., 1999).

Bu çalışmada normal serumda komplement kaynağı olarak, aglütine edilemeyen düzeyin altında bulunan bağışık serumun *V. anguillarum* serotip O1'i öldürme kapasitesi araştırılmıştır *V. anguillarum* serotip O1'e spesifik olan gökkuşığı alabalığı bağışık serumun hazırlanan farklı dilüsyonlarının bakteriyi öldürme yeteneği ve bakteriyel aglütinasyonu mikrotitre pleyt'de test edilmiştir. 5×10^8 kob/ml ile pozitif aglütinasyon veren en yüksek bağışık serum dilüsyonu 1:128 olarak tespit edilmiştir. Normal serumda komplement kaynağı olarak bu dilüsyonlarda bulunan bağışık serumun aynı miktardaki bakterinin % 90'dan fazlasını öldürmüştür. İmmun serumun 1:2048 dilüsyonu *V. anguillarum*'un % 70'ini 1:8192 dilüsyonunun ise % 30'unu etkili bir şekilde öldürebildiği belirlenmiştir (Boesen et al., 1999).

Daha önce yapılan çalışmalarda *V. anguillarum* antiserumu ile pasif olarak immunize edilen balıklarda *V.anguillarum*'a karşı korumanın sağlandığı görülmüş fakat çok az çalışmada antikorun savunma mekanizması açıklanmıştır. *V. anguillarum* serotip O1 ile yapılan önceki çalışmalarda, normal serumda komplement kaynağı olarak bulunan immun serum tarafından öldürüldüğünü ve komplementin klasik yollarla

inaktive olduğunu göstermişlerdir. *V.anguillarum* serotip O2α ile yapılan benzer çalışmada, immun seruma karşı dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Bu serotipe karşı korumada antikor yanında, onun komplement aktivasyonu, antikora bağlı sitotoksik öldürme, toksinlerin nötralizasyonu veya Fc ve komplement reseptörler yolu ile makrofajların fagositik aktivitesinin stimülasyonu da ilave edilebilir (Boesen et al., 1999).

Serotip O1 ile yapılan çalışmalarda sub aglütinasyon düzeylerde bulunan antikor normal serumda komplement kaynağı olarak bulunuyorsa, bakteriyi öldürebileceği görülmüştür. Antikorum az miktarı dahi klasik yollarla aktivasyon için yeterlidir. Spesifik antiserum tarafından *V. anguillarum*'un aglütinasyonundan ziyade serumda öldürülmesi, *V. anguillarum* serotip O1'e karşı immunizasyonda koruyucu etkinin değerlendirilmesi için çok önemlidir. (Boesen et al., 1999).

Günümüzde balık aşılamanın amacı polivalent aşılar kullanılarak aynı zamanda birçok bakteriyel patojenlere karşı koruma sağlamaktır. Bununla birlikte antijenik çapraz reaksiyon, antijenik rekabet, antijene karşı antikorum spesifikliğı ve oluşumu üzerine etkisi olabilmektedir. Antikorların biyolojik olarak oluşumu, klasik serolojik testler ile tahmin edilenden önemli derecede farklılık göstermektedir.

Nikoskelainen vd. (2007)'ın yapmış oldukları çalışmada polivalent aşılardan etkinliğı ve plazma antikor düzeyleri üzerine aşının kompozisyonu araştırmışlardır. Bu çalışmada gökkuşağı alabalıkları 2 farklı polivalent mineral yağlı adjuvant aşı ile aşılanmıştır. I. aşı *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* ve *Flavobacterium psychrophilum* Th ve Fd serotipinin her ikisi ve II. aşı *A. salmonicida*, *V. anguillarum* ve *F. psychrophilum* Fd serotipinden oluşmaktadır. Antikor ile ilişkili opsonofagositozis, test edilen bakteri antijenlerine karşı kanda oluşan granülositler ve monositlerin aktivitesinin, respiratory burst (RB) aktivitesi ile belirlenmesiyle tespit edilmiştir. Kontrol ve aşılu grupların her ikisinde de aşılamadan 3 hafta sonra tüm bakteriyel suşlara karşı RB aktivitesinde artış olduğu görülmüştür. Bununla birlikte RB aktivitesinde artış kan akışındaki granülositler ve monositlerin sayısında artıştan orjinlendiğı ve spesifik olmadığı belirlenmiştir. Diğer taraftan her iki aşılu grupta aşılamadan 6 hafta sonra spesifik antikorlar ve antikor ilişkili

opsonofagositozis tespit edilmiştir. Bununla birlikte spesifik cevabın büyüklüğü üzerine aşı kompozisyonunun belirgin bir etkisinin olduğu saptanmıştır. Fd+ Th serotiplerini kapsayan aşı, Fd serotipinden oluşan aşıdan daha az sayıda hedef spesifik opsonofagositozisi arttırmıştır. Her iki polivalent aşının başlıca kan dolaşımında olmak üzere monositlerin sayısını etkilediği görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, monositlerin antikor ile ilişkili opsonofagositoziste granülositlerden daha önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Nikoskelainen et al., 2007).

2.2. Vibriosis

Vibriosis çoğunlukla deniz ve östarin, daha seyrek olarak da tatlısu balıklarında *Vibrio* genusu bakterilerin neden olduğu sistemik bakteriyel bir enfeksiyondur (Toranzo et al., 1982; Çakır ve Mater, 1993; Schlotfeldt and Alderman, 1995; Guerin-Faubleee vd., 1995). Vibriosis 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 *V. anguillarum*'dur (Reed and Francis-Floyd, 1996; Woo and Bruno, 1999; Arda vd., 2002; Toranzo et al., 2005; Rodkhuma et al., 2005).

Vibriosis hastalığı etkeni olan *V.anguillarum* günümüzde 50'den fazla balık türünde hastalığa neden olmaktadır. Bu bakteri hastalığın dominant türü olmasına rağmen diğer *vibrio* türleri de vibriosiste rol oynamaktadır (Tanrıkul vd., 1996; Plumb, 1999).

2.2.1. Hastalığın tarihçesi

Vibriosis ilk defa 1500'lü yıllarda İtalya sahillerinde kültürü yapılan yılan balıklarında (*A. anguilla*) görüldüğü bildirilmiştir. Fakat hastalık bu balıkların göç dönemleri olan yaz ayları boyunca görülen bir epizootik olarak ilk defa 1718 yılında Bonaveri tarafından rapor edilmiştir (Bullock and Sniesko, 1971; Austin and Austin,1999). Vibriosisin etkeni 1883 yılında Canestrini tarafından *Bacillus anguillarum* olarak rapor edilmiştir. Vibriosise literatürlerde çok değişik isimler verilmiştir. Hastalık red pest, red diseases, pestis rubra anguillarum, cod pest, ülser hastalığı, bakteriyel dermatitis ve tuzlu su frunkulozisi gibi isimlerle ifade edilmiştir

(Bullock and Sniesko, 1971; Austin and Austin, 1999; Akaylı, 2001; Peggy and Francus-Floyd, 2002). Bu hastalığa 1974 yılında vibrio türü bakterilerin neden olduğu sistemik enfeksiyonları ifade etmek için ortak ve yaygın bir ad olarak vibriosis adı verilmiştir (Çağırğan, 1993; Austin and Austin, 1999; Woo and Bruno, 1999; Akaylı, 2001). Bergman'da 1907 yılında İsveç'te görülen bir epizootiden aynı etkeni izole etmiş, ancak bakterinin identifikasyonunu 1909 yılında gerçekleştirerek *V. anguillarum* adını vermiştir (Bullock and Sniesko, 1971; Akaylı, 2001).

Enfeksiyon daha sonraki tarihlerde Kuzey denizi, Baltık Denizi, Hollanda, İsveç, İtalya, Almanya ve Danimarka sahillerinde yetiştiriciliği yapılan yılan balıklarında rapor edilmiştir (Bullock and Sniesko, 1971; Boesen et al., 1997; Akaylı, 2001). 1925 ve 1927 yılları arasında Almanya'daki yılan ve turna balıklarının üreme dönemi boyunca *V. anguillarum*'un % 25' lere varan ölümler yaptığı bildirilmiştir (Bullock ve Sniesko, 1971; Austin and Austin, 1999). 1927 yılında ise sazanlarda atipik bir vibrio enfeksiyonu tespit edilmiştir (Bullock and Sniesko, 1971).

Almanya'nın sahil bölgelerindeki pisi balıklarında 1952 yılında başlangıçta vücut üzerinde kırmızı renkli inflamatoz lezyonlar ve daha sonra ise abselerin oluşumu ile karakterize edilen ciddi vibriosis epizootilere kaydedilmiştir (Bullock and Sniesko, 1971).

1954 yılında hastalık pembe salmon ve chum salmonlarda şiddetli olarak seyrederken, chinook salmon ve coho salmonlarda ise daha az şiddetle seyrettiği rapor edilmiştir. 1956 yılında Baltık denizinin batısındaki morina balıklarında ülseratif formda bir vibriosis vakası rapor edilmiştir (Bullock and Sniesko, 1971). 1977 yılında Japonya'daki alabalıklarda vibrio enfeksiyonu bildirilmiştir (Çağırğan, 1993). Daha sonraki tarihlerde akvaryumda tutulan tuzlu su balıklarında ve gökkuşağı alabalığında enfeksiyonlar rapor edilmiştir (Bullock and Sniesko, 1971; Akaylı, 2001).

Vibrio (Listonella) anguillarum Kalkan (*Scophthalmus maximus*), Pasifik salmon (*Oncorhynchus kisutch*), Atlantic salmon (*Salmo salar*), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), levrek (*Dicentrarchus labrax*), çipura (*Sparus aurata*),

çizgili levrek (*Morone saxatilis*), cod (*Gadus morhua*), Japon ve Avrupa yılan balığı (*Anguilla japonica* ve *A. anguilla*), sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*) ve ayu (*Plecoglossus altivelis*) balığı da olmak üzere hem ılık su hem de soğuk su balık türlerinde görülen hemorojik septisemiye neden olan bir etkidir (Toranzo et al., 2005; Rodkhuma et al., 2005).

Ülkemizde ise deniz balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerde özellikle levrek ve son zamanlarda gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliği yapan işletmelerde ciddi kayıplara neden olan bakteriyel bir hastalıktır (Çağırğan, 1993; Akaylı, 2001; Timur ve Korun, 2004; Ekici vd., 2005; Tanrıkul, 2007).

2.2.2. Epizootiyolojisi

Vibriosis dünyadaki östarin ve özellikle de deniz balıklarında hemorajik septisemiye yol açan vibrio türü bakterinin oluşturduğu sistemik bir bakteriyel enfeksiyondur (Guerin-Fauble et al., 1995; Schlotfeldt and Alderman, 1995). Balıklarda vibriosis; çevre, patojen ve balık arasındaki dengenin bozulması durumunda ortaya çıkar. Vibriolar, gerek kültürü yapılan gerekse doğada yaşayan deniz balıkları strese maruz kaldıklarında özellikle de su sıcaklığının yükseldiği ve çözülmüş oksijen düzeyinin minimuma indiği yaz periyodunda hastalık oluştururlar. Yüksek populasyon yoğunluğu ya da zayıf hijyen epizootilerinin oluşumuna katkıda bulunur (Plumb,1999).

Vibriosis'e sebep olan esas tür *V.anguillarum*'dur (Guerin-Fauble et al., 1995). Bu bakteri bir deniz organizması olup, sağlıklı balığın mukus, solungaç ve bağırsağından olduğu kadar sudan, sedimentten ve planktondan da bol miktarda izole edilmiştir. (Guerin-Fauble et al., 1995; Plumb, 1999, Noga, 2000, Austin and Austin, 2007). Herhangi bir stres koşulu altında balığın bağırsağındaki patojenlerin invazyonu söz konusudur. Ayrıca balıklarda deri ve solungaçlardaki eksternal yaralanmaların sonucunda mikroorganizmalar balığa girebilir. Bakterinin balığa bulaşmasından sonra geçen inkübasyon süresi 3 gün kadar kısa olabilir. İnkübasyon süresi patojenin virülensi ve balığın duyarlılığına göre değişir. Patojenin virülensi de balıkta bulunan vibrio suşuna göre değişmektedir. Larsen (1983), yaptığı bir çalışmada doğadan izole edilen *V.anguillarum* suşlarının balıktan izole edilen suşlara göre daha az patojenik

olduğunu göstermiştir (Plumb, 1999). Bununla birlikte çevresel izolatların denizde 50 aydan daha uzun süre hayatta kalabildiği ve çoğalabildiği bildirilmiştir (Plumb, 1999; Noga, 2000; Austin and Austin, 2007). İnvazyondan sonra bakteriler kan yoluyla yayılır ve böbrek, karaciğer ve diğer organlarda görülebilir. Bakteriler bu dönemde feçesle suya karışabilir (Diler, 1999).

Vibriolar daha çok durgun ve yüksek miktarda organik atık maddelerden oluşan yumuşak bentik sediment tabakasını içeren suda bulunur ve bu alanda yetiştiriciliği yapılan kültür balıkları arasında yaygın bir hastalığa neden olur. Su sıcaklığında ani yükselmeler, stok yoğunluğunun fazlalığı gibi kötü şartlar altında birkaç balığın enfekte olması ile çevre hızla kontamine olur. Su, çamur ve özellikle filtreler vibriolar bakımından çok zengin kaynaklar haline gelir. Enfekte balıklar canlı enfeksiyon yapıcı bakterileri dışkılarıyla suya bırakırlar (Austin, and Austin,1999; Bruno et al., 1997; Benediktsdottir et al., 1998).

Vibriosis epizootileri suyun sıcaklığı 10°C'nin üzerine çıktığı sıcak yaz aylarında ve suyun oksijen miktarının azaldığı durumlarda balık stres altındaysa ortaya çıkar. Tatlı sularda ise 1-4°C gibi düşük sıcaklıklarda da görülebilmektedir. (Diler, 1999; Akaylı, 2001; Timur ve Timur 2003; Timur ve Korun 2004; Austin and Austin, 2007).

Salmonidler ve diğer türlerde vibriosis için en fazla risk oluşturan faktör yüksek sıcaklıktır. Su sıcaklığının *V.anguillarum* ile enfekte olmuş salmonidlerde ölüm oranlarında artışa sebep olduğu bildirilmiştir. Coho salmonları ile yapılan bir çalışmada su sıcaklığı 18-20 °C olduğunda % 58-60 oranında ölüm görülürken, 15 °C' de % 40, 12 °C' de % 28 ve 6 °C' de ise sadece % 4 oranında ölüm yaptığı tespit edilmiştir (Plumb,1999; Noga, 2000). Norveç'te *V.anguillarum* ile enfekte Atlantik salmonlarında smolt aşamasında denize taşınan balıklarda daha yüksek oranda ölümler olduğu bildirilmiştir. Aynı balıkta *V.anguillarum* ile oluşturulan epruvasyonda ise balıklarda % 100'e ulaşan oranlarda ölümler görüldüğü rapor edilmiştir (Plumb,1999).

V.anguillarum halofil özellikte olmasına rağmen tatlı sularda da epizootilere yol açmaktadır. Gökkuşluğu alabalığı juvenilerinde yüksek oranda ölümlerle sonuçlanan akut vibriosis ve daha büyük balıklarda ise kronik vibriosise yol açmaktadır (Toranzo

et al., 1982).

Thornborn (1987), İsveç'teki çeşitli gökkuşuğu alabalığı çiftliklerinde *V.anguillarum*'un % 0' dan % 17' ye değişen oranlarda ölümler yaptığını bildirmiştir. Danimarka'da ki yılan balığı popülasyonları arasında *V.anguillarum*'un toplam % 30 kayıplara yol açtığı bildirilmiştir (Plumb,1999).

Japonya'da juvenil ayu balıkları da *V.anguillarum*'a karşı duyarlıdır. Japonya'da acı sularda kültürü yapılan yılan balıklarında görülen hastalık problemi tatlı su havuzlarında görülenden daha büyüktür. *V.anguillarum*, denizde tutulup tatlı suya transfer edilen enfekte balık yolu ile tatlı sulara girmiştir (Plumb,1999).

Hastalığın kaynağı sular ve canlı yemlerdir. Vibriosisin ortaya çıkmasında kontamine atık deniz balıklarıyla yapılan beslenmenin epizootilere neden olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Colorni vd. (1977), çipura (*S. aurata*)' ların kontamine balık ürünleriyle beslenmesinden sonra vibriosisin patlak verdiğini bildirmiştir. Conroy (1984)'de *Trichinotus sp.* balıklarının hamsi ile beslenmesinden sonra vibriosisin patlak verdiğini belirtmiştir (Çağırğan,1993).

Ülkemizde *V. anguillarum* uzun süredir deniz balıkları yetiştiriciliğinde hastalığa neden olmaktadır. Gökkuşuğu alabalığı yetiştiriciliğinde ise henüz çok ciddi salgınlar kaydedilmemiştir. Fakat enfeksiyon gökkuşuğu alabalığı çiftliklerinde hızla yayılarak salgınlara yol açabilir (Tanrıkuş, 2007).

Candan (2000), 1991 ve 1992 yıllarında Karadenizde yetiştiriciliği yapılan salmon (*Salmo salar* L.) balıklarında yaz aylarında su sıcaklığının artmasına paralel olarak yüksek oranda ölümlerin görüldüğünü rapor etmiştir. Bu yıllarda 7 ayrı işletmeden alınan toplam 12 balığın bakteriyolojik ve histopatolojik incelemeleri yapılmış ve sonuçta etken olarak izole edilen 12 suşun *Vibrio anguillarum* olduğu belirlenmiştir. Histopatolojik tanının da desteklediği bakteriyolojik tanı sonucunda enfeksiyon vibriosis olarak bildirilmiştir (Candan, 2000).

Timur ve Korun (2004), 2001 Haziran ayında ticari bir işletmede kültürü yapılan yavru gökkuşuğu alabalıklarında (5-10 g) ortaya çıkan vibriosis salgınını

incelemişlerdir. İzole ettikleri bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yönden incelenmesi sonucunda *Vibrio (Listonella) anguillarum* suşları olduğu tespit edilmiştir. Bu suşların Gram negatif, kısa kıvrık çomaklar olup sitokram oksidaz pozitif ve O/129 vibriostat ajanına duyarlı olduğu belirlenmiştir. İzole edilen *V.anguillarum* suşlarına ait yapılan antibiyogram testi sonucunda suşların kloramfenikol, furunance, nitrofurazone, oksolinik asit, oksitetrasiklin ve sülfamerazine duyarlı oldukları tespit edilmiştir (Timur ve Korun, 2004).

Tanrıkul (2007), 2001-2004 yıllarında Türkiye'nin Güney Ege bölgesindeki 8 farklı gökkuşağı alabalığı işletmelerinde ağırlıkları 20-300 g arasında değişen yavru ve ergin balıkları vibriosis yönünden incelemiştir. Yapılan ekimler sonucu üreyen izolatlar biyokimyasal ve serolojik testlerden geçirilerek tanımlanmıştır. İç organların mikrobiyolojik analizlerinde hareketli, Gram negatif, fermantatif, oksidaz ve katalaz pozitif, ADH +, LDC ve ODC -, jelatin hidrolizi +, O/129'a duyarlı olarak bulunmuştur. Bu karakteristikler *V.anguillarum*'un muhtemel identifikasyonunu sağlamıştır. Anti *V.anguillarum* O1 (ATCC 43305) serumu ile yapılan lam aglütinasyon testinde tüm suşlar pozitif özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Tanrıkul, 2007).

Korun ve Gökoğlu (2007), yapmış oldukları çalışmada Bodrum bölgesinde yetiştiriciliği yapılan *Pagrus pagrus*'larda *V. anguillarum*'u ilk defa izole etmişlerdir. Hasta balıklarda letharji, anoreksia, yüzgeç erezyonu ve abdominal şişkinlik karakterizedir. Hemorojiler operkulum, yüzgeç ve vücut yüzeyinde görülmüştür. İnternal olarak balıklarda, karaciğer ve böbrekte solgunluk, dalakta genişleme ve abdominal boşlukta asites tespit edilmiştir. Etkilenmiş balıklardan izole edilen bakteriyel suşların identifikasyonu morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle (API 20E) ile yapılmıştır. Mono-Va aglütinasyon kiti kullanılarak izole edilen bakterilerin serolojik olarak teyiti yapılmıştır (Korun ve Gökoğlu, 2007).

2.2.3. Hastalığın belirtileri

Hastalığın inkubasyon süresi doğal koşullar altında 7-10 gün olup klinik belirtileri balıklardaki diğer pek çok bakteriyel hastalığa benzerlik gösterebilmektedir. Hastalık genellikle letarji, iştah kaybı, suyun yüzeyine yakın bulunma veya yüzeysel yüzme

ile başlar, hemorojiler ve şişkin karaciğer dokusunun geliştiği, ilerlediğinde deride matlık, kırmızı ve ölü (nekrotik) alanların şekillendiği, oluşan lekelerin yüzgeç ve ağız çevresinde yaygınlık gösterdiği dikkati çeker. Hastalık sistemik seyrettiğinde ekzoftalmusun geliştiği, bağırsak ve rektumun kanlandığı ve sıvıyla dolduğu görülür (Reed and Francis-Floyd 1996; Arda vd., 2002).

Klinik bulgular hastalığın formuna bağlıdır. Hastalık perakut seyrettiğinde (özellikle genç balıklarda) iştahsızlık ve deri renginin koyulaşması dışında başka klinik bulgu göstermeden yüksek oranda ölümler ile sonuçlanır (Bullock and Sniesko, 1971; Diler,1999; Woo and Bruno,1999; Peggy and Francus- Floyd, 2002; Timur ve Timur, 2003).

Akut form konjestif ve hemorojiktir. Anüs etrafında ve yüzgeç tabanında kırmızı kanlı lezyonlar, bazen de deri ve kasta şişkinlikler ve ülserleşme görülür. İnternal olarak iç organlarda konjesyon, hemoroji ve ödem görülür (Bullock and Sniesko, 1971; Diler,1999; Woo and Bruno,1999; Plumb,1999; Noga, 2000; Peggy and Francus- Floyd, 2002; Timur ve Timur, 2003).

Kronik olarak enfekte balıklar kaslara kadar inen geniş nekrotik lezyonlar gösterirler. Solungaçlarda ağır bir aneminin göstergesi olarak solgunluk ve peritonda fibrinöz yapışmalar görülür. Ağızda ve deri yüzeyinde, kaslarda, göz ve yüzgeç diplerinde oluşan fokal nekrotik lezyonlar sub epidermal olduğu zaman deri üzerinde siyah renkli bölgeler görülür. Eğer bu lezyonlar ülserleşirse sığ fakat geniş dermal kollojenden kaynaklanan beyaz kenarlı ve siyah pigmentli bir halka ile çevrili hemorojik ülserler gelişir (Austin and Austin,1999; Woo and Bruno,1999; Timur ve Timur, 2003). Bu formda oluşan klinik belirtiler daha belirgindir. Pektoral ve pelvik yüzgeçlerde kanamalar, operkulumda, ventral ve yanlarda, ağızın içinde ve etrafında ve anüs civarında kızarıklıklar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca ekzoftalmus, vücudun çeşitli bölgelerinde kabarcıklar, apseler, ülserler ve lezyonlara rastlanabilir. Otopside, iç organlarda yaygın hiperemi, lezyonlar, dalak, böbrek ve karaciğerde şişkinlik, hemorajiler, karın boşluğunda kanlı bir sıvı birikmesi, kaslarda nekrotik odaklar ve hava kesesinde kızarıklıklar gözlenebilecek semptomlar arasındadır. Vücutta oluşan

yaygın kanamalar ve eritemler nedeniyle balıklar kızıl bir renk alırlar ve bunun için de hastalığa Kızıl hastalık (Red pest) adı verilmiştir (Arda vd., 2002).

2.2.4. Prognoz ve mortalite

Vibriosis'te ölüm oranları genellikle yüksektir. Özellikle hastalığın çok hızlı seyrettiği vakalarda % 80'e varan ölümler görülmüştür. Hatta balıklara tedavi uygulansa bile % 10-20 oranında kayıp görülmektedir (Diler,1999). Ölüm oranı çoğunlukla stok yoğunluğu fazla olduğunda daha yüksektir (Bruno et al.,1997). Genç balıklarda hastalık çıktığında ölüm oranı % 50 veya daha yüksektir. Büyük balıklarda kayıplar daha düşük olabilir (Akaylı 2001; Timur ve Timur, 2003).

2.2.5. Hastalığın teşhisi

Vibriosisin teşhisi, patojen bakterinin izolasyonu, identifikasyonu ve histopatolojik bulgular ile yapılır. Böbrek, dalak, karaciğer, nekrotik kas dokusu ve diğer bazı organlardan hazırlanan ezme preparatlar bakteriyi ortaya çıkarır. Genellikle organizma düz veya hafif kıvrık virgül şeklinde çomakları içerir. Uygun kültür ortamlarında 22°C' de 24-48 saat içinde koloniler gelişir. 2,4-diamino-6,7,diisopropyl pteridine phosphate (O/129) Vibriostat testine duyarlıdırlar (Bullock and Sniesko, 1971; Austin and Austin,1999; Çağırğan,1993; Woo and Bruno,1999; Noga, 2000; Timur ve Timur, 2003).

Hastalığa neden olan *Vibrio* suşlarının izolasyonu enfekte balığın karaciğer, dalak ve böbreğinden, vücut yüzeyindeki ülserlerden ekimler yapılarak gerçekleştirilir. Bu ekimler Tryptik Soy Agar (TSA), Thiosulphate-Citrate-Bile Salt-Sucrose Agar (TCBS), Nutrient Agar (NA), Kanlı Agar, Alkali Pepton Water (APW) ve Brain Heart Infusion Agar (BHIA) kullanılarak yapılır. Vibrioların izolasyonu için TCBS agar selektif bir ortam olarak tanımlanmıştır Patojen, enfekte olmuş organlardan TCBS agarda saf kültürü yapılarak izole edilir. Laboratuar şartlarında büyüme, 22 °C' de 24-36 saat arasında gerçekleşmektedir. *V.anguillarum* TSA üzerinde 22 °C'de 1-2 günlük inkübasyondan sonra kabarık, sarımsı-kahverengi, 3-4 mm çapında yuvarlak ve mat koloniler oluşturur. Vibrioların izolasyonunda kullanılan TCBS agar üzerinde *V.anguillarum* sarı renkli koloniler oluşturmaktadır (Balebona

et al., 1998; Noga, 2000; Austin and Austin, 2007).

V.anguillarum'un identifikasyonunda özel olarak tasarlanmış yüksek oranda NaCl, ampicillin, sorbitol ve safra tuzları içeren *Vibrio anguillarum* Medium (VAM) kullanılmaktadır. *V.anguillarum* VAM üzerinde etrafı sarı renkli haleli parlak sarı renkli koloniler oluşturmaktadır (Austin and Austin, 2007).

Besiyeri üzerinde bakterilerin üremesinden sonra yapılan biyokimyasal testler ve seroaglutinasyon çalışmaları vibrio türlerinin identifikasyonunu sağlamaktadır (Bruno et al., 1997). Günümüzde API 20 E ve BIONOR Mono aglutinasyon hızlı teşhis kitleri de yaygın olarak kullanılmaktadır (Akaylı, 2001; Tanrıkul, 2004; Austin and Austin, 2007). Diğer infeksiyöz hastalıkların teşhisinde olduğu gibi vibriosisin teşhisinde ELISA en fazla kullanılan serolojik testtir (Akaylı, 2001).

Vibriosisin etkeni olan *V.anguillarum*'un enfekte balık dokularından doğru olarak tespiti için PCR bazlı metotlar geliştirilmiştir Bu teknikler moleküler olarak 16sRNA problemleri ile hibridizasyon ve spesifik genlerin çoğaltımı (PCR, RT-PCR, situ hibridizasyon) ile yapılmaktadır. Son zamanlarda da hedef gen *rpoN* geninin çalışıldığı yeni bir moleküler yöntem ile doğru tespitler saptanmıştır. (Actis et al., 1999; Demircan ve Candan, 2006; Austin and Austin, 2007). Moleküler teşhislerin kullanımı ile *V.anguillarum*'un 24 saat içinde identifikasyonu yapılabilmektedir (Austin and Austin, 2007).

2.2.6. Kontrol

Vibriosisin kontrolü diğer bakteriyel septisemilerde olduğu gibi kaliteli suyun kullanılması, iyi beslenme ve düşük stok yoğunluğu ile sağlanabilir. Bunun mümkün olmadığı hallerde ortaya çıkan vibriosis salgınlarının sağaltımı ve kontrolünde antibakteriyel, antiseptik ve dezenfektan kullanımı gerektirmektedir. Ancak antibakteriyel seçimi ve kullanımının invitro duyarlılık testlerinin sonuçlarına dayanarak yapılması tavsiye edilmektedir (Reed and Francis-Floyd, 1996; Bruno et al., 1997; Akaylı, 2001; Peggy and Francus-Floyd, 2002).

2.2.6.1. Tedavi

Balıklarda tedavi amacıyla kullanılan antimikrobiyal maddeler dezenfektanlar ve kemotöropatikler olarak gruplandırılabilir. Uygun bir dezenfektanla banyo yaptırmak derideki mikroorganizmaların ortadan kaldırılması sonucu yaraların daha hızlı iyileşmesinin ve sudaki mikroorganizma yükünün azaltılmasına da sebep olur. Ancak dezenfektanlar ve banyo tarzında uygulanan kemotöropatikler çoğunlukla hastalık sistemik hale geçtiğinde etkisizdirler. Bu nedenle hastalıkların tedavisinde oral olarak antibiyotik tedavisi tercih edilmektedir. Tedavi amacıyla oksitetrasiklin, oksolinik asit, florfenikol, furanance, sulfamerazin, nitrofurazon başarı ile kullanılmaktadır (Candan, 1991; Çağırğan,1993; Woo and Bruno,1999; Diler,1999; Noga, 2000; Peggy and Francus- Floyd, 2002; Timur ve Timur, 2003).

Sülfanomid ve antibiyotiklerin tedavisi kültür balıklarında vibriosisin epizootikleri sırasında ölümlerin kontrolünde çok etkilidir (Diler,1999; Akaylı, 2001). Bazı nitrofuran bileşikleri de vibriosisin kontrolünde yararlıdır. Araştırmacılar vibriosisin tedavisi için en etkili kemotöropotiklerin kuinolonlar, kuvvetlendirilmiş sülfanomidler ve florfenikol olarak rapor etmişlerdir (Akaylı, 2001, Bruno et al., 1997). Hastalık görülmeden önce sülfametozinin kullanılmasının koruyucu tedavide oldukça başarılı olduğu belirtilmektedir (Bullock and Sniesko, 1971; Akaylı, 2001).

Ancak diğer balık hastalıklarında olduğu gibi vibriosisin ciddi bir problemi de bakterinin antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesidir. Özellikle salmonid balıklarda *V.anguillarum*'a karşı kullanımı çok yaygın olan oksitetrasiklin, sülfanomid ve oksolinik asit gibi belirli bazı antibiyotikler balıklarda bağışıklığı bastırdığı deneysel olarak kanıtlanmıştır (Bruno et al., 1997; Akaylı,2001).

2.2.6.2. Aşılar

Son yıllarda vibriosisin önlenmesi konusundaki çalışmaların büyük kısmı immunizasyon ile ilgili olduğu görülmektedir (Bullock and Sniesko, 1971; Bruno et al.,1997). Vibriosis'e karşı geliştirilen aşıların büyük çoğunluğu formalinle öldürülmüş *V.anguillarum* veya onların bakteriyel membran bileşenlerinden oluşmaktadır. Bu aşılar çoğunlukla Serotip 1'den ya da Serotip1 ve Serotip 2 α 'nın

karışımından hazırlanır. Yapılan araştırmalarda *V. anguillarum* epizootilerinden elde edilen Serotip 1, 2 α ve 2 β karışımından hazırlanan aşının başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Toranzo et al., 2005).

2.3. Balıklarda Bağışıklık

Balıkların bağışıklık sistemi memelilerin bağışıklık sistemine göre daha az karışık sistem olmasına rağmen sellüler ve humoral bağışıklık gibi çeşitli koruma mekanizmalarını içermektedir (Ellis, 1978; 1988; 1989).

Bağışıklık hayvanlarda enfeksiyonlara karşı korunmada en önemli bir fizyolojik mekanizmadır. Omurgalılarda bağışıklık; primer (doğal) ve adaptive (kazanılmış) bağışıklık olmak üzere iki tiptir.

2.3.1. Doğal bağışıklık (Spesifik olmayan savunma)

Primer bağışıklık, doğuştan savunma mekanizmalarına dayanır ve vücuda girebilecek çok geniş bir zarar verme mekanizmasına karşı non-spesifik olarak çalışır. Bu savunma mekanizması (spesifik olmayan bağışıklık sistemi) fagositik hücrelerin faaliyetini, interferonları ve vücutta çeşitli doğal olarak oluşan lizozim, C-reaktive protein, aglutinin ve lizin gibi maddelerin etkisini içerir (Ellis,1978; 1988; 1989; Busch, 1981; Pelczar et al., 1986; Trust, 1986; Janeway and Travers,1996).

2.3.2. Kazanılmış bağışıklık (Spesifik savunma)

Kazanılmış bağışıklık sonradan kazanılan bir durumdur ve vücudun tepkime verme yeteneğine bağlı olarak zarar verici spesifik partiküler mikroorganizmalara karşı, spesifik reaktive lenfosit (sellüler bağışıklık) veya serum antikorlarının (humoral bağışıklık) oluşmasıdır (Ellis,1978; 1988; 1989; Busch, 1981; Pelczar et al., 1986; Trust, 1986; Janeway and Travers,1996).

Kazanılmış bağışıklıkta savunma mekanizmasının merkezi lenfositlerdir. Lenfositler kazanılmış bağışıklığın, humoral bağışıklık, sellüler bağışıklık ve bellek gibi üç safhasının başlatılmasından ve yürütülmesinden sorumludur. Humoral cevap “Homolog veya spesifik antijene karşı serum protein moleküllerinin sentezi amacıyla

uyarılması” olarak tanımlanmaktadır. Bu serum protein molekülleri (globulinler) antikorlar olarak isimlendirilir. Bu nedenle canlı patojenlerin avirulent suşları, öldürülmüş patojenler veya bunlardan elde edilmiş antijenler, konakçının patojen tarafından hasta edilmesini önlemek için kazanılmış bağışıklık oluşturmak üzere kullanılmaktadır (Post, 1987).

2.3.2.1. Humoral bağışıklık

Antijenin vücuda ilk kez girmesi halinde T ve B lenfositleri birlikte reaksiyon verirler. B lenfositler plazma hücrelerine veya bellek hücrelerine dönüşürler (Ellis, 1978; 1988; 1989; Minbay, 1988; Arda vd., 1994). Plazma hücreleri kendilerinin oluşmasını uyarın antijene karşı özel antikor üretirken bellek hücrelerine ve daha sonra aynı antijenin ikinci kez vücuda girmesi halinde plazma hücrelerine dönüşebilecek özelliğe sahip hücrelerdir. T hücreleri farklı bir fonksiyona sahiptir. Başlangıçtaki T hücreleri, yardımcı hücreler olarak isimlendirilirler. Bu klon hücreleri antijenin başlangıç stimülasyonu ile çoğalırlar. Uzun süre hayatta kalabilen yardımcı bellek hücrelerine dönüşürler. Böylece ikinci bir uyarıda T hücrelerinin sayısı artar. Bunlar sayıları artan B bellek hücreleri ile işbirliği yaparlar. Böylece ikinci uyarıda kandaki antikor üretimi daha hızlı gerçekleşir ve birinci uyarıya göre daha yüksek konsantrasyona ulaşır (Ellis, 1988; Arda vd., 1994). Bellek hücrelerinin hızlı ve yüksek seviyede reaksiyon kabiliyeti nedeniyle patojen ve aşuların uygulanmasını takiben dikkate değer artan bir direnç oluşturur (Ellis, 1988).

2.3.2.2. Selüler bağışıklık (Cell mediated immunity, CMI)

Timustan köken alan T lenfositleri sellüler bağışıklığın hücrelerini oluşturur. T lenfosit popülasyonu T yardımcı klonlarının yanı sıra selüler bağışıklıktan sorumlu klonlara da sahiptir. Bağışıklığın bu bölümü geniş bir sahayı içine alır ve vücuda istila eden mikroorganizmaları fagosite ederek sindirmek suretiyle vücudun spesifik olmayan koruma mekanizmasını oluşturan makrofajların teminini sağlar (Ellis, 1988; Arda vd., 1994).

Primer antijen stimulasyonunda T lenfosit klonları selüler bağışıklıkta rol alan çeşitli farklı fonksiyonel hücrelere dönüşür. Bunlar arasında öldürücü hücreler, baskılayıcı hücreler ve lenfokin üreten hücreler bulunur (Ellis, 1988).

2.3.3. İmmunoglobulinler (Antikorlar)

İmmunoglobulinler antijenik uyarımlar sonucu vücutta plazma hücreleri tarafından sentezlenen ve homolog antijenle birleşerek spesifik bir reaksiyon verebilen glikoprotein karakterindeki moleküllerdir (Gülmezoğlu, 1975; İlter, 1975; Minbay, 1988, Bilgehan,1993, Müftüoğlu vd., 1993; Arda vd., 1994) Protein olmaları nedeniyle immunoglobulinler çok iyi antijenik özelliklere sahiptirler. Kendilerine karşı antikor sentezini uyarırlar ve bunarlada reaksiyon verirler. Antikorlar çeşitli maddelerle (FITC, izotop, enzim) konjuge edilerek serolojik reaksiyonlarda (FAT, RIA, ELISA) başarı ile kullanılmaktadır (Austin and Austin, 1999; Schill et al.,1989; Arda vd., 1994; Janeway and Travers, 1996; Kubilay, 1997).

Teleost balıklarda ise bir sınıf immunoglobulin kesin olarak identifiye edilmiştir. Bu immunoglobulin memelilerde makroglobulin veya IgM olarak isimlendirilen sınıfa bir çok hususta benzerlik gösterir (Trust, 1986; Fuda et al.,1991; Michel et al., 1991; Sanchez et al.,1991; Buchman et al.,1992; Fuda et al., 1992; Al-Harbi and Austin, 1993; Estevez et al., 1993; Smith et al., 1993; Nagae et al., 1993;1994a,b; Williams and Hole, 1995).

Balıklarda antikor serum, doku sıvıları ve sindirim kanalı, deri ve solungaçlardan salgılanan mukus içinde bulunmuştur (Ellis, 1978). Balıkların kanlarında çeşitli tipteki antikorların varlığı saptanmıştır. Bunlar arasında komplement, lizozim, properdin, hemolizin, presipitin nötralizan antikorları ve hemaglutininler sayılabilir (Arda vd., 1994).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmada kullanılan *Vibrio anguillarum* suşları

Araştırmada 4 adet *V. anguillarum* suşu kullanılmış olup, bu suşlardan bir tanesi referans (ATCC 14181) diğerleri ise Fethiye'deki balık çiftliklerinde hasta balıklardan izole edilmiştir. Bu suşların kökenleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Vibrio anguillarum* suşları

Suş No	Balık Türü	Köken
1	Gökkuşığı alabalığı	Fethiye (A4)
2	Gökkuşığı alabalığı	Fethiye (A6)
3	Gökkuşığı alabalığı	Fethiye (M1)
4	<i>Salmo trutta</i>	ATCC 14181

Çizelge 3.1.' de belirtilen suşların 3 tanesi; Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan (1,2,3) ve 1 tanesi yurt dışından American Type Culture Collection (ATCC 14181 CEFAS Weymouth Laboratory., UK)'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Araştırmada kullanılan balık kaynağı ve uygulama yeri

Araştırmada kullanılmak üzere ortalama 10 g ağırlığında 2000 adet, 20 g ağırlığında 1000 adet olmak üzere toplam 3000 adet sağlıklı gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Aksu-ISPARTA'da bulunan bir işletmeden uygun koşullar sağlanarak Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Ünitesine taşınmıştır.

Araştırmada balıklar; 0.6 m³ hacimli, içerisinde 450 lt su bulunan 12 adet yuvarlak fiberglas tanka yerleştirilmiştir (Şekil 3.1.). Araştırmaya başlamadan rastgele seçilen 10 adet balık mikrobiyolojik yönden (bakteri, mantar, parazit) incelenmiş ve herhangi bir enfeksiyon taşımadığı görülmüştür.



Şekil 3.1. Denemede kullanılan sirküler fiber tanklar

3.1.3. Araştırmada kullanılan su kaynağı ve suyun kalitesi

Araştırma süresince kullanılan artezyen suyunun debisi 12 l/dk, tanklardaki suyun ortalama sıcaklığı 12 °C, pH'sı 7,2 ve suda çözülmüş oksijen miktarı 7,4 mg/l olarak ölçülmüştür.

3.1.4. Araştırmada kullanılan yem

Deneme balıkları adaptasyon ve deneme süresince bir ticari alabalık pelet yemi ile günde iki kez doyuncaya kadar beslenmişlerdir.

3.1.5. Epruvasyon ve immunizasyon uygulama yeri

Balıkların *V. anguillarum* bakterini ile immunizasyonu ile ilgili deneysel çalışmalar Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Ünitesinde ve *V. anguillarum* patojeni ile yapılan epruvasyon çalışmaları ise Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Ünitesinde yürütülmüştür.

3.1.6. *V.anguillarum* aşılarının hazırlandığı kuruluşlar

Bu araştırmada, kısa süreli banyo ve enjeksiyon için hazırlanan aşular SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında hazırlanmıştır.

Poly DL-lactide-co-glycolide (PLG) polimeriyle kapsüllenmesiyle hazırlanan oral aşı (Lavelle et al., 1997) Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Bölümünde hazırlanmıştır.

3.1.7. Oral aşıda kullanılan mikrokapsülasyon

Mikrokapsülasyon işlemlerinde 50:50 PLG (Sigma P2191) polimeri ve organik çözücü olarak DCM (Dichloromethane / Methylenchlorid) (Sigma) kullanılmıştır.

3.1.8. ELISA testinin yapıldığı kuruluşlar ve laboratuvarlar

ELISA testinde kullanılmak üzere *V.anguillarum* bakterisinin eriyik (soluble) antijeninin hazırlanması amacıyla bakterilerin sonikasyonu işlemi SDÜ Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezinde yapılmıştır.

Eriyik antijenlerin protein miktarının tayini SDÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı laboratuvarında yapılmıştır.

ELISA testi ile ilgili işlemler Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1.9. ELISA testinde kullanılan antiserum ve konjugatlar

ELISA testinde ticari salmon immunoglobüline karşı oluşturulan polyclonal tavşan antiserumu (AHP761 rabbit anti-salmonid Ig) (AbD Serotec (UK)) kullanılmıştır.

ELISA serolojik testinde kullanılmak üzere ticari anti-tavşan Ig G peroksidaz konjugatı (Horseradish Peroxidase Goat Anti-Rabbit Ig G) (Sigma) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Vibrio anguillarum* suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi

V.anguillarum suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde geleneksel bakteriyolojik testler (Collins and Lyne, 1976; Holt et al., 1994) ve API 20 E (Bio Meriux) hızlı teşhis kiti kullanılmıştır (Tanrıkul vd., 2004; Austin and Austin, 2007)

3.2.1.1. Geleneksel bakteriyolojik testlerin kullanımı

V. anguillarum suşlarının geleneksel bakteriyolojik testler kullanılarak fenotipik özelliklerinin belirlenmesi sırasında, tüm suşların 24-48 saat'lik kültürleri kullanılmıştır.

V. anguillarum suşlarında; Gram boyama, oksidasyon-fermentasyon (O/F), hareket testi (asılı damla metodu), sitokram oksidaz, katalaz, O/129, Simmons sitrat, jelatin hidrolizi, indol, metil red, voges proskouer, H₂S, nişasta, karbonhidratların kullanılması , % 0, % 3, % 6, % 7, % 8, % 10 NaCl ve 4, 15, 25, 37, 42 °C' lerde büyüme özellikleri yönünden incelenmiştir (Arda vd., 2002; Austin and Austin, 2007). Tüm testler ortama % 1 NaCl eklenerek ve 22 °C'de 24-48 saat inkübasyona tabi tutularak yapılmıştır.

3.2.1.2. API 20 E testi

API 20 E teşhis kitinin kullanımı sırasında, üretici firmanın (Biomerieux, 20 100) vermiş olduğu talimatlara uygun olacak şekilde, aseptik koşullarda ekimler yapılmıştır. Ekim sonrası kültürler 22 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilerek, bu sürenin sonunda ONPG, Arginin dihidrolaz, Üre, Lisin ve Ornitin dekarboksilaz gibi amino asitlerin kullanılması ve çeşitli şekerlerin kullanılması ile ilgili özellikleri değerlendirilmiştir (Tanrıkul vd., 2004, Austin and Austin, 2007).

3.2.2. Deneysel aşının hazırlanması

Denemede kullanılacak *V.anguillarum*'un inaktif aşısının hazırlanmasında aşağıda verilen basamaklar takip edilmiştir (Ellis, 1988; Altun, 2001).

1. Aşı suşunun seçimi
2. Etken izolasyonu ve saflaştırılması
3. Aşının üretimi
4. Aşının etkinliğinin değerlendirilmesi (Eprüvasyon) ve kanda antikor miktarının serolojik testlerle belirlenmesi)

3.2.3. Aşı suşunun seçimi

Araştırmada 3 farklı *V. anguillarum* suşu üzerinde virülens çalışmaları yapılarak antijen çalışmalarında kullanılacak olan suş seçilmiştir. Bu amaçla 10^3 kob/ml yoğunluğundaki *V. anguillarum* suşları 30 adet gökkuşığı alabalığına intra peritoneal (i.p.) yolla verilerek eprüvasyon oluşturulmuş ve balıklar 15 gün süreyle takip edilmiştir. Ölen balıklardan reizolasyon amacıyla % 1 NaCl içeren TSA'ya ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan petrilere üreyen bakterinin Gram negatif, sitokrom oksidaz, katalaz, hareketlilik ve O/129 (Vibriostat testi) testine duyarlı olup olmadığı belirlenmiştir. Böylelikle ölümlerin gökkuşığı alabalıklarına verilen *V.anguillarum* suşlarından kaynaklandığı teyit edilip, suşlar arasında virülensi (hastalık oluşturma gücü) en yüksek olan M1 suşu antijen hazırlanması için seçilmiştir.

3.2.4. Deneysel aşının üretimi

Saflık kontrolleri yapılan *V. anguillarum* suşu % 1 NaCl içeren TSA (T-TSA)'ya ekilmiştir. % 1 NaCl içeren TSA'da 22 °C'de 24-48 saat inkübasyon sonucunda üreyen koloniler % 1 NaCl içeren TSB (T-TSB) besiyerine alınmıştır. T-TSB'de 22 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra T-TSA'a üçer paralel olacak şekilde ekimler yapılarak canlı bakteri sayımı (kob/ml belirlemek için) yapılmıştır (Arda, 1998). Ayrıca *V. anguillarum* kültürünün (T-TSA'da üç paralel ekimi yapılan 24 saatlik T-TSB kültürünün) spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda optik dansite değeri (0.785) belirlenmiştir. Böylece kob/ml değeri ile O.D. değeri karşılaştırılarak, hazırlanacak deneysel aşının standartizasyonu yapılmıştır.

Aşı üretimi için en yüksek virülens gösteren 3 nolu *V. anguillarum* suşu (M1) pH'sı 7,2 olan T-TSB içerisinde 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası

üreyen kültür steril santrifüj tüplerine alınarak soğutmalı santrifüj (SİGMA 2-16K)'de 5000 devirde 15 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen bakteri çökeleği Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,2'de 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra süspansiyon % 0,5'lik formaldehit solüsyonu içinde oda sıcaklığında 1 saat ve +4 °C'de bir gece olacak şekilde inaktivasyona bırakılmıştır (Akhlaghi, 1999). İnaktivasyonun sonunda aşı solüsyonundan formaldehiti uzaklaştırmak amacıyla 2 kez PBS (pH=7,2) ile yıkanmış ve son konsantrasyon injeksiyon için 2×10^8 kob/ml kısa süreli banyo aşılama için 2×10^7 kob/ml ve oral aşılama için her balığın alacağı günlük doz $0,5 \times 10^8$ kob/ml olacak şekilde PBS ile yeniden suspanse edilerek bakterin hazırlanmıştır. Hazırlanan deneysel aşılar kısa süreli banyo, oral ve i.p. enjeksiyon yolu ile immunizasyonda kullanılmıştır.

3.2.4.1. Oral aşının hazırlanması

Oral aşılamanın hazırlanmasında temel olarak mikropartikül elde etmek için organik çözücü buharlaştırılarak S/Y/S multiple emülsiyon oluşumu sağlanmıştır (Lavelle et al., 1997; O' Hagan, 1998; Singh and O' Hagan 1998; Yeh et al., 2002).

3.2.4.1.1. Polimer ve çözücünün seçilmesi

Çözücü buharlaştırılmasında, en yaygın olarak kullanılan polimerlerden PLGA kullanılmıştır (Lavelle et al., 1997; O' Hagan, 1998; Singh and O' Hagan 1998; Yeh et al., 2002; Vila et al., 2002). Bu çalışmada en çok kullanılan çözücülerden Dichloromethan (DMC) kullanılmıştır (Singh and O' Hagan 1998; Vila et al., 2002).

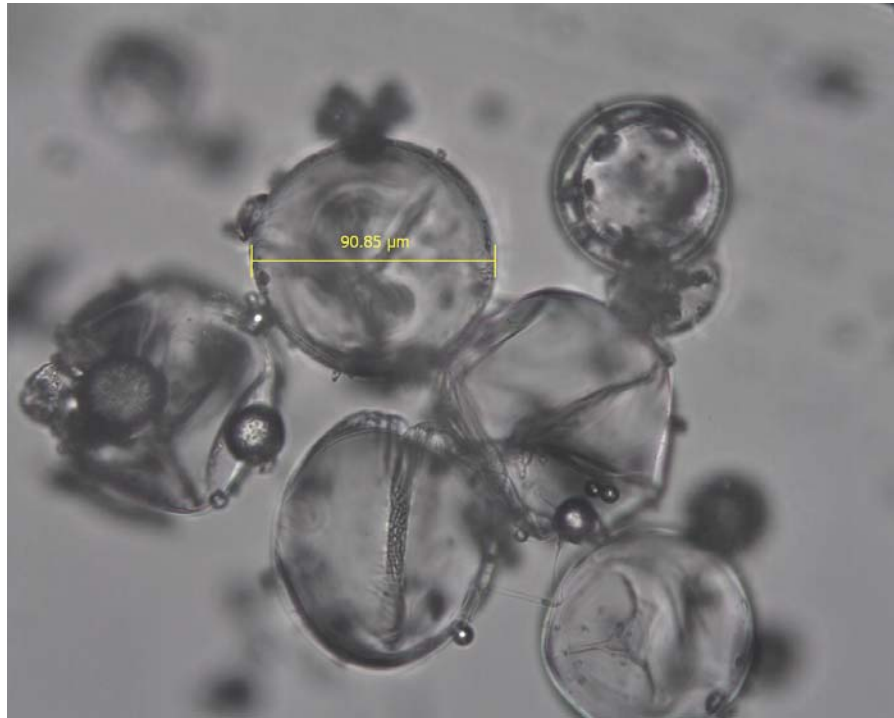
3.2.4.1.2. PLGA mikropartüküllerin in vitro hazırlanması

Emülsifikasyon / çözücü buharlaştırma işlemi mikro kürelerin hazırlanmasında kullanılmıştır. Kısaca 400 mg PLGA (50:50 kompozisyonu) 5 ml'lik çözücüye (diklormethan: metanol, 90:10) katılmıştır. Elde edilen bu solüsyon % 4' lük 60 ml sulu polyvinil alkol (PVA) solüsyonu içerisine azar azar ilave edilmiş ve karışımda mikro küreleri elde etmek için ultraturax homojenizatörde 500 rpm'de 2 dakika süreyle karıştırılmıştır. Böylelikle yağ/su emülsiyonu oluşmuştur. 2 dakika sonunda Y/S emülsiyonu 800 ml'lik saf su içine transfer edilip organik çözücü tamamıyla

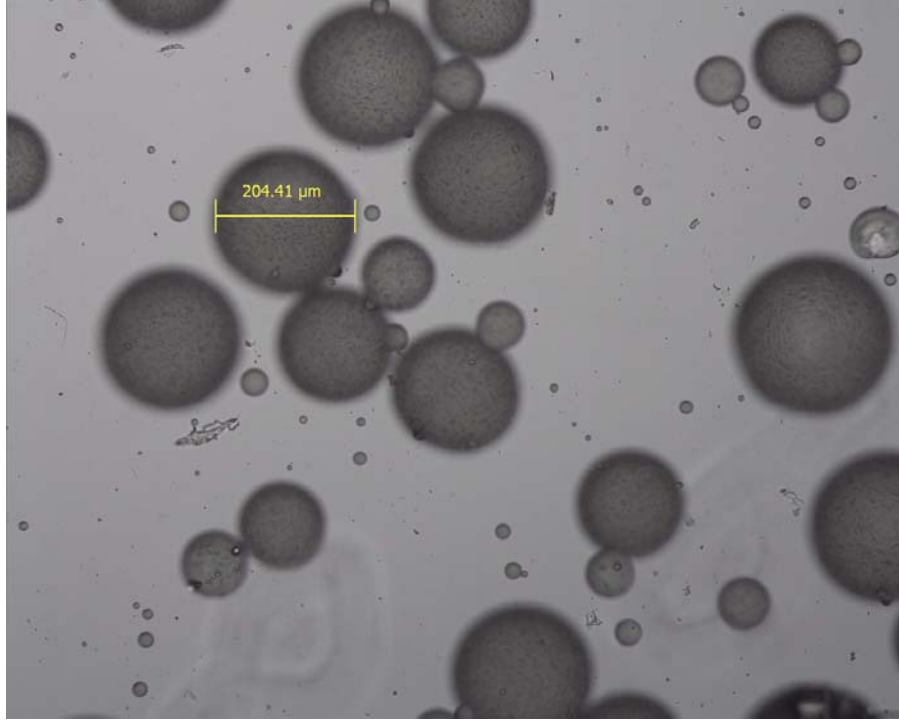
buharlaştırılana kadar manyetik karıştırıcı ile 3 saat 400 rpm de karıştırılmıştır. Böylelikle S/Y/S emülsiyonu oluşmuştur. Bu aşamada da mikrokürelerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Mikropartikül süspansiyonu 3000 veya daha fazla rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek üstteki sıvı kısım uzaklaştırılıp, katı olan kısımda bulunan mikroküreler toplanarak saf su ile 2 kez yıkanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen mikropartiküller belli yoğunlukta aşı çözeltisi (her balığın alacağı günlük doz $0,5 \times 10^8$ kob/ml olacak şekilde) ile karıştırılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan aşı+küre karışımı gökkuşağı alabalıklarının yemine canlı ağırlıklarının % 2'si oranında ilave edilerek balıklar 10 gün boyunca aşılı yemle beslenmiştir (Romalde et al., 2004; Değim vd., 2005).

3.2.4.1.3. Mikrokürelerin şekli ve büyüklüğü

Mikroküreler suda yeniden şekillendirilerek ortalama partikül büyüklüğü, şekil, gözeneğin olmaması gibi yüzey özellikleri ile karakterize edilmiştir (Şekil 3.2. ve 3.3.) (Romalde et al., 2004; Değim vd., 2005).



Şekil 3.2. PLGA Mikropartikülleri



Şekil 3.3. Suda yeniden şekillendirilen PLGA mikropartikülleri

3.2.5. Sterilite testi ve toksisite denemeleri

Hazırlanan aşı solüsyonlarından 10 ml'lik örnekler 100 ml'lik T-TSB besiyerine ekilerek (her bir besiyerinden 2 paralel olacak şekilde) sterilite kontrolü yapılmıştır. Ekim yapılan örnekler 25 °C'de 15 gün süreyle inkübe edilmiştir. Sterilite kontrolü yapılmış olan aşılar +4 °C' de muhafaza edilmiştir (Ellis, 1988).

Toksisite denemeleri için steril PBS kontrol olmak üzere, hazırlanan antijenden alınan örneklerle toksisite denemeleri yapılmıştır. Toksisite denemelerinde her grup için 30 adet gökkuşağı alabalığı kullanılmıştır. Bu gruptaki balıkların her birine i.p. yolla 0,1 ml aşı inokule edilmiş ve balıklar 15 gün boyunca takip edilmiştir (Ellis,1988).

3.2.6. Aşı etkinliğinin değerlendirilmesi

Balıklarda aşının etkinliği; eprüvasyon uygulamaları ve aşılı balıkların serumunda antikor miktarı ELISA ve mikroaglütinasyon yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Eprüvasyon uygulamalarında ürettiğimiz antijenlerin (kısa süreli banyo (k.b.), i.p. enjeksiyon, oral ve kısa süreli banyo uygulamayı takiben 30 gün sonra oral aşı (k.b.+oral) sağladığı koruyuculuk, virülensi yüksek bulunan *V.anguillarum* suşunun deney grubundaki balıklara LD₇₀ dozunda 0,1 ml miktarında i.p. yolla verilmesiyle tespit edilmiştir.

ELISA ve mikroaglütinasyon yöntemi için balıklara i.p. enjeksiyon, kısa süreli banyo, oral ve k.b.+oral aşı uygulamalarını takiben 21, 28, 45, 60, 90 ve 120. günlerde her gruptan 5 balığın kaudal venasından kan alınarak serumları elde edilmiştir.

3.2.7. Eprüvasyon uygulamaları

Aşı etkinliğinin değerlendirilmesi için yapılacak eprüvasyonlarda kullanılan *V.anguillarum* suşu stok kültürden alınarak T-TSA'ya ekimi yapılmıştır. T-TSA'da 25 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilerek üreyen koloniler *V.anguillarum* yönünden kontrol edildikten sonra T-TSB'ye alınmıştır. T-TSB besiyerinde 25 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra mililitredeki canlı bakteri sayıları (kob/ml) ve optik dansite değerleri (O.D.) tespit edilmiştir.

Aşılanan balıklarda bağışıklığın tespitine geçmeden önce, test yapılacak balık popülasyonunda % 70'ini öldüren bakteri sayısı (LD₇₀) belirlenmiştir. LD₇₀ değerini saptamak için her biri 30'ar adet balıktan oluşan gruplara 2x10⁷, 2x10⁵, 2x10⁴, 2x10² ve 2x10¹ kob/ml yoğunlukta bakteri i.p. yolla injekte edilip, balıklar 15 gün boyunca takip edilmiştir. Eprüvasyon çalışmaları neticesinde elde edilen sonuçlar semi-logaritmik grafik kağıdı üzerinde değerlendirilerek LD₇₀ değeri belirlenmiştir (Ellis,1999).

Balıkların kısa süreli banyo, i.p. enjeksiyon ve oral yolla aşılmasını takiben 30., 60., 90. ve 120. günlerde LD₇₀ dozu belirlenen miktarda patojen *V.anguillarum* verilerek balıklarda oransal yaşama oranı ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Aşılama

sonrası epruvasyon, 50'şer adetlik gruplar halinde aşılı ve aşısız (kontrol) tüm gruplardaki balıklara LD₇₀ oranındaki bakterinin i.p. enjeksiyon (0,1 ml) ile verilmesiyle yapılmıştır. Epruvasyondan sonra balıklar 14 gün boyunca izlenerek, ölümler günlük olarak kayıt edilmiş ve ölü veya ölmekte olan balıkların iç organlarından reizolasyon için T-TSA'ya ekimler yapılmıştır. Ekimler sonucu ölümlerin *V. anguillarum*'un neden olduğu enfeksiyondan kaynaklanıp kaynaklanmadığı tespit edilmiştir.

3.2.8. Aşıların uygulanması

Çalışmamızda gökkuşağı alabalığından izole edilen *V. anguillarum* suşundan hazırlanan 4 farklı deneysel aşı kullanılmıştır.

I. grup: 10 g ağırlığındaki toplam 1000 adet gökkuşağı alabalığına kısa süreli banyo yöntemi ile 1:10 oranında sulandırılarak 1dk süreyle uygulanmıştır.

II.grup: 10g ağırlığındaki 1000 adet gökkuşağı alabalığına PLG polimerleri ile hazırlanan oral aşı günlük olarak canlı ağırlıklarının % 2' si oranında yeme ilave edilerek 10 gün boyunca beslenmiştir.

III.grup: 20 g ağırlığındaki toplam 1000 adet gökkuşağı alabalığına i.p. enjeksiyon yöntemiyle (0,1 ml miktarında) uygulanmıştır.

IV. grup: 10 g ağırlığındaki 1000 adet gökkuşağı alabalığına kısa süreli banyo uygulamayı takiben 30 gün sonra destekleyici olarak oral aşı (k.b.+oral) canlı ağırlıklarının % 2' si oranında yeme ilave edilerek balıklar 10 gün boyunca beslenmiştir

3.2.9. Bağışıklığın değerlendirilmesi

Balıklarda aşının sağladığı bağışıklık, Oransal Yaşama Oranı (RPS= Relative Percent Survival) temel alınarak değerlendirilmiştir (Ellis, 1988).

$$\text{RPS (Oransal Yaşama Oranı)} = \left(1 - \frac{\text{Aşılı balıklardaki ölüm miktarı \%}}{\text{Aşısız balıklardaki ölüm miktarı \%}}\right) \times 100 \quad (3.1)$$

Ayrıca aşının etkinliğinin değerlendirilmesinde, alabalık serumlarında antikor varlığı ve miktarının tayini için ELISA ve mikroaglutinasyon testi uygulanmıştır.

3.2.10. Aşılı balıkların serumunda antikor tespiti için kullanılan serolojik yöntemler

Gökkuşığı alabalıklarında *V.anguillarum*'a karşı oluşan antikor titreleri mikroaglutinasyon ve ELISA testi uygulanarak belirlenmiştir. Bu amaçla ilk aşı uygulamasından sonra 21., 28., 45., 60., 90. ve 120. günlerde balıklardan kan alınıp, serum çıkartılmıştır. Mikroaglutinasyon ve ELISA testi yapıncaya kadar -20 °C de saklanmıştır.

3.2.10.1. Serum elde edilmesi

Fenoksi ethanol ile bayıltılan gökkuşığı alabalıklarının kuyrukları kesilerek, kaudal venadan kan eppendorf tüplerine toplanmıştır. 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 5000 devirde 15 dakika süre ile santrifüj edilerek üstte kalan sıvı kısım otomatik pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde alınmıştır. Elde edilen serumlar ELISA testinde kullanılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır (Strand et al., 1977; Thuvander, 1987; Aakre et al., 1994).

3.2.11. Aglutinasyon testi

3.2.11.1. Antijen hazırlanması

Antijen hazırlamak için; *V.anguillarum* suşunun saflığı kontrol edildikten sonra T-TSB'ye ekilerek 25 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteri kültürü 5000 devirde 15 dk santrifüj edilerek, çökelti kısmı ayrılmış ve % 0,3 formaldehit ilave edilmiş

PBS ile sulandırılmıştır. Daha sonra bakteri kültürü 100 °C’de 1 saat süreyle otoklavda bekletilerek sıcaklığa dayanıklı O antijeni elde edilmiştir. Otoklavlanan bakteri kültürü 5000 devirde 15 dk santrifüje edilerek PBS ile sulandırılmıştır. Sulandırma sonucu oluşan süspansiyon (antijen) yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0,7 O.D. (Optik Dansiteye) ayarlanmıştır. Böylece hazırlanan antijen somatik O antijeni olarak mikropleyt aglutinasyon testinde kullanılmak üzere saklanmıştır (Sorensen and Larsen, 1986).

3.2.11.2. 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, aşılınmamış balık serumları ve PBS ile yapılmıştır (Roberson, 1993; Kubilay, 1997).

3.2.11.3. Mikropleyt (Mikroplak) aglutinasyon testinin uygulanması

Gökkuşığı alabalıklarında *V.anguillarum*’a karşı oluşan antikor titrelerinin belirlenmesi amacıyla mikropleyt aglutinasyon testi kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan yuvarlak tabanlı polyester mikropleytlerin soldan sağa doğru birinci sıradaki çukurlarına test serumları konulmuştur. Sonra yukarıdan aşağıya doğru serumlar 1/2 dilüsyondan başlayarak otomatik sulandırıcı ile her seferinde 50 µl bir aşağıdaki çukura aktarılacak suretiyle 2 katlı dilüsyonları yapılmıştır. Pleyt’in tüm çukurlarına çoklu pipetle önceden hazırlanmış aglutinasyon antijeninden 50 µl ilave edilerek karıştırıcı (vorteks) ile iyice karıştırılmıştır. Pleyt’ler iki saat oda sıcaklığında ve tüm gece boyunca +4 °C’ de inkübe edilmiştir (Sorensen and Larsen, 1986; Kubilay, 1997; Boesen et al., 1999). Testin kontrolü için pozitif ve negatif serumlar çalışılan her pleyt’in sondan bir ve ikinci gözlerine konulmuştur.

Aglutinasyon titresi olarak en yüksek aglutinasyonu veren serum dilüsyonu kaydedilerek, bu değerler log₂ tabanına göre değerlendirilmiştir (Sorensen and Larsen, 1986; Boesen et al., 1999)

3.2.12. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) testi

3.2.12.1. Pozitif kontrol serumunun hazırlanması

Testlerde pozitif kontrol serumu olarak kullanmak amacıyla 15 adet 50 g'lık gökkuşığı alabalığına 600 nm'de 0.785 değerindeki ($\sim 10^8$ kob/ml) formaldehitte inaktive edilip PBS ile sulandırılmış bakteri inokulatından 0,2 ml iki hafta ara ile iki kez i.p. yolla enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyondan 4 hafta sonra tüm balıklardan kan alınmış ve serum elde edilmiştir. Elde edilen serum ELISA testinde pozitif kontrol serum olarak kullanılmıştır (Olesen, 1991).

3.2.12.2. ELISA tekniği için antijen hazırlama

Bakteri 25 °C 24 saat % 1 NaCl ilaveli TSB'ye ekilerek inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültür 5000 devirde 15 dk santrifüj edilerek 2 kez PBS ile yıkanmıştır. PBS ile sulandırılarak -20 °C'de derin dondurucuda dondurulmuştur ve soğuk zincirde SDÜ Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde Bandelin Sonopuls (HD 2200) marka sonikatör ile 10 dk süre ile sonike edilmiştir. Süspansiyon 10.000 devirde 30 dk süre ile santrifüj edilmiştir ve üst sıvı kısım (süpernatant) dikkatli bir şekilde alınmıştır. Alınan bu kısım ELISA'da eriyik (soluble) antijen olarak kullanılmıştır (Schill et al., 1989).

Bu antijen kullanılmadan önce protein miktarı biüret yöntemi ile tespit edilmiştir. Protein miktarı 20 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Yardımcı, 1989; Esendal 1994).

3.2.12.3. ELISA testi için antijen kaplı plakların hazırlanması

Antijen titrasyonun belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyondaki eriyik antijenden U tabanlı microçukurlu pleyt'in her çukuruna 100 µl konulmuştur. Antijen kaplanmış pleyt'lar parafilm ile iyice kapatılarak gece boyunca buzdolabında +4 °C'de tutulmuştur. Pleyt'ler silkelenerek boşaltılmış ve yeniden kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır (Voller et al., 1979; Namakura et al., 1986).

3.2.12.4. ELISA testinin uygulanması

ELISA testinde aşağıda bildirilen tampon, substrat ve solüsyonlar kullanılmıştır.

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

NaN₃ : 0,20 g
NaCl : 20 g
Distile su: 2000 ml karıştırılmıştır

Borik Asit Tampon Solüsyonu (Stok BBS)

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

Çalışma Tampon Solüsyonu (Working Buffer)

Saline aside (% 1) : 180 ml
Stok BBS : 200 ml
Tween 20 : 1 ml
Bovine Serum Albumin (BSA) 10 ml karıştırılıp, pH 7,4 'e ayarlanmıştır.

ELISA Tampon Solüsyonu (ELISA PBS)

K₂HPO₄ : 2,40 g
NaH₂PO₄ : 0,44g
NaCl : 17g
Distile su : 2000 ml karıştırılıp pH 7,4'e ayarlanmıştır

Yıkama Tampon Solüsyonu (Washing Buffer (PBS+Tween 20))

Tween 20 : 1 ml
PBS : 2000 ml

Sitratlı Tampon Solüsyonu (Citrate Phosphate Buffer)

Sitrik asit : 1,92g
Na₂NPO₄ 12H₂O : 6,45g
Distile su : 200 ml pH 5'e ayarlanmıştır.

Peroksidaz Konjugatı İçin Substrat Hazırlanması

Solüsyon A: 100 ml sitrat fosfat tamponu içine 2 adet 2,2-azino-bis (3 ethylbenthioazoline-sulfonic acid) diamonyum (ABTS, Sigma 9941) tableti konularak eritilmiştir.

Solüsyon B: 100 ml sitrat fosfat tamponu içine 40 µl saf H₂O₂ eklenmiştir.

3.2.12.5. Antijen, antiserum, konjugat titrasyonun belirlenmesi

ELISA için hazırlanmış olan eriyik antijenden 20 µg/ml konsantrasyonlarındaki antijen U tabanlı polyester microçukurlu pleyt'in soldan sağa doğru ilk 4 sırasındaki çukurlara, 10 µg/ml 4-8 arasındaki çukurlara, 5 µg/ml 8-12 arasındaki çukurlara gelecek şekilde aşağı kadar tüm çukurlara konulmuş ve böylece antijen titrasyonu için antijenin pleytlere kaplanması amacıyla gece boyunca buzdolabında +4 °C' de tutulmuştur.

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

Bloklama işlemi sonrasında soldan sağa tüm çukurlara 90 µl Working Buffer (WB) ilave edilmiştir. Daha sonra pleyt çukurlarına yukarıdan aşağıya doğru bir sıra pozitif, bir sıra negatif olduğu bilinen serumları 10 µl olacak şekilde soldan sağa doğru sırasıyla konulmuştur. Böylece serumların 1/10 kat dilüsyonları elde edilmiş olur. Pleyt'ler bir saat oda sıcaklığında bekletilmiş, süre bitince silkelenerek boşaltılmıştır. Tüm çukurlar 150 µl WB ile 3 kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır.

Pleyt inkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra salmon immunoglobuline karşı oluşturulan ticari polyclonal anti tavşan serumundan (Abd Serotec) soldan 1-4 çukura 1/1000, 4-8 arasındaki çukurlara 1/5000, 8-12 arasındaki çukurlara 1/10.000 olacak şekilde farklı titrasyonlarda her çukura 100 µl ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra pleyt'ler silkelenerek boşaltılmış ve iki kez

WB ile iki kez PBS ile 5'er dakika yıkanmıştır. Her yıkama sonunda ve özellikle son yıkamada pleyt'lerin iyice temizlenmesi için havluya birkaç kez vurulmuştur.

İnkübasyon ve yıkama işleminden sonra yukarıdan aşağıya doğru ilk iki göze 1/500, 3-4. gözlere 1/1000, 5-6. gözlere 1/5000, 7-8. gözlere 1/10.000 lik peroxidase konjugatı (horseradish peroxidase conjugated goat anti- rabbit IgG) dilüsyonları soldan sağa doğru her çukura 100 µl ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat tutulmuştur. Süre tamamlanınca konjugatlı pleytler silkelenerek içerikleri dökülmüş çukurlar iki kez 150 µl WB ile 2 kez PBS ile 5'er dakika yıkanmıştır.

Tekrar inkübasyon ve yıkama işleminden sonra tüm çukurlara renk reaksiyonu oluşturmak üzere substrat ilave edilmiştir. Substrat hazırlamak için 5 ml solüsyon A + 5 ml solüsyon B karıştırılmıştır. Hazırlanan substrattan başka bir tüpe 1 damla konarak üzerine 1 damla konjugat ilavesi ile substratın ve konjugatın çalışması kontrol edilmiştir. Daha sonra substrattan bütün çukurlara 100 µl konulup oda sıcaklığında 30-60 dakika arasında tutularak test pleyt çukurlarına durdurma işlemi yapılmadan optik yoğunluk spektrofotometrik olarak 405 nm'de ELISA Reader (Bio Tek)'da okunmuştur (Voller et al., 1979; Namakura et al., 1986).

Pozitif serumla en iyi renk reaksiyonunu veren antijen, antiserum ve konjugat titreleri tespiti amacıyla yapılan bu testte çok zayıf renk reaksiyonu tespit edilmiştir. Bu nedenle farklı yöntemlerle deneysel aşı verilen balıkların serumlarında antikor miktarının tespit edilemeyecek kadar düşük düzeylerde olduğu için ELISA testi yapılamamıştır.

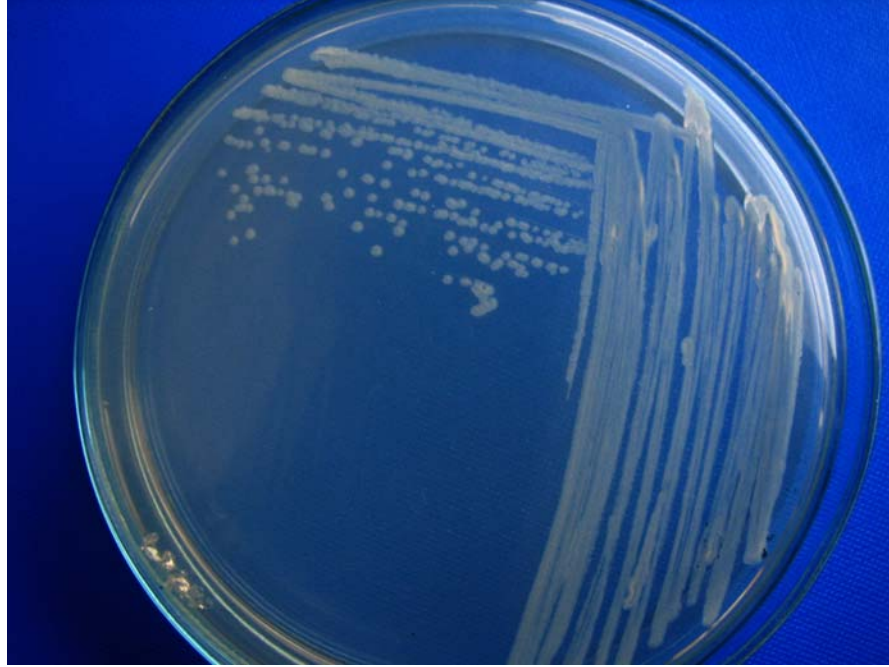
3.2.13. İstatistiksel hesaplamalar

Aşıların verdiği bağışıklığın ve ölümlerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi, SPSS 13.0 istatistik programında Varyans Analizi ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testleri ile yapılmıştır. Önem düzeyi olarak $p < 0,05$ seçilmiştir (Hayran ve Özdemir, 1995).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Vibrio anguillarum* Suşlarının Fenotipik Özelliklerine Ait Bulgular

Çalışmada Fethiye'deki gökkuşuğu alabalığı işletmelerinde yüksek ölümlere neden olan hastalık vakalarından izole edilen 3 suşun fenotipik özellikleri yurt dışından getirilen referans bakterinin (ATCC 14181 CEFAS Weymouth Laboratory., UK) özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Bu suşların % 1 NaCl içeren T-TSA' da 25 °C' de 24-48 saatlik inkübasyondan sonra düz, hafif kabarık, yuvarlak, krem renginde 2-3 mm çapında küçük koloniler oluşturdukları gözlenmiştir (Şekil 4.1.).



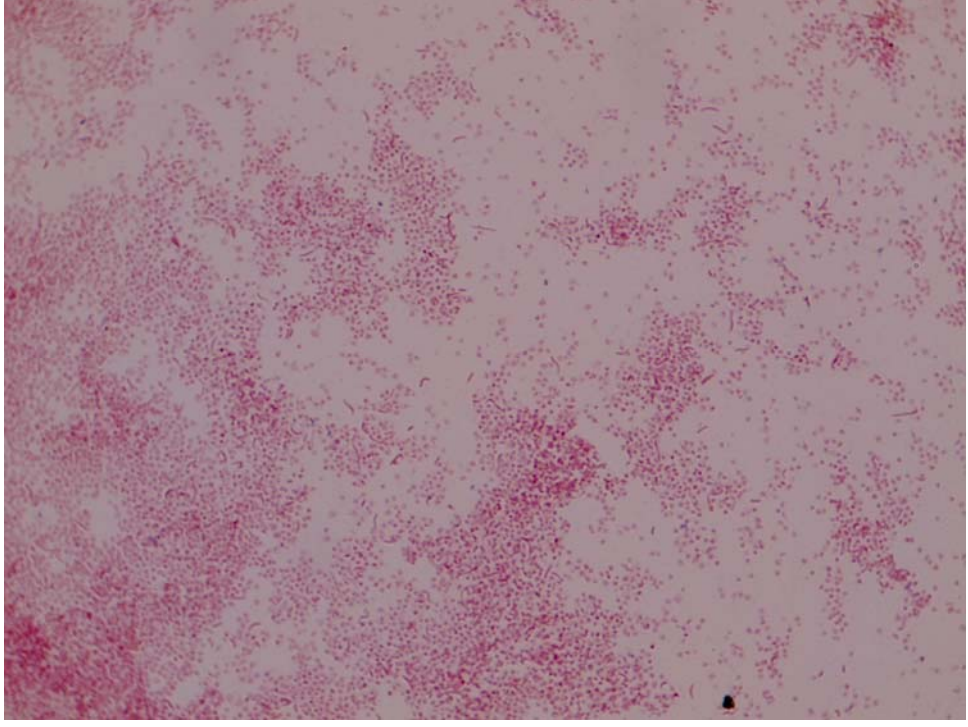
Şekil 4.1. *Vibrio anguillarum* reizolatının % 1 NaCl içeren T-TSA'da krem renkli saf kültür kolonileri

V.anguillarum suşların vibrio için seçici besiyeri olan Thiosulphate-Citrate-Bile Salt-Sucrose Agar'a (TCBS) ekimleri yapıldığında suşların tamamının sarı renkli koloniler oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.2.) Bu primer kültür izolatlarının saf kültürleri yapılmıştır. Mikroskopik morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için saf kolonilerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yapılarak incelenmiştir. İnceleme sonrası bakterilerin Gram negatif düz ya da hafif kıvrık çomaklar şeklinde oldukları

gözlenmiştir (Şekil 4.3.) Çukur lamda asılı damla yöntemi ile yapılan hareket muayenesinde ise bakterilerin aktif flagellar hareket gösterdikleri gözlenmiştir. Ayrıca sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif, O/F testine fermentatif ve O/129 (Vibriostat) testine duyarlı olan bakterinin geleneksel ve API 20 E testleriyle fenotipik özellikleri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan *V.anguillarum* suşlarının fenotipik özellikleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. TCBS agarda *Vibrio anguillarum*'un sarı renkli kolonilerinin görünümü



Şekil 4.3. Gram boyama sonucunda düz yada hafif kıvrık şekilli *Vibrio anguillarum* bakterisinin görünümü (x100)

Çizelge 4.1. *Vibrio anguillarum* suşlarının fenotipik özellikleri ile ilgili bulgular (25 °C’ de 24-48 saatlik inkübasyon)

	A4	A6	M1	ATCC 14181
TCBS’de üreme	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
Gram boyama	-, çubuk	-, çubuk	-, çubuk	-, çubuk
Sitokram Oksidaz	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+
Hareket	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F
O/129 (10µg)	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
O/129 (150µg)	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
β galaktozidaz (ONPG)	+	+	+	+
Arginin Dihidrolaz	+	+	+	+
Ornithin Dekarboksilaz	-	-	-	-
Lizin Dekarboksilaz	-	-	-	-
Sitrat kullanımı	+	+	+	+
H₂S indirgeme	-	-	-	-
Jelatin hidrolizasyonu	+	+	+	+
Üre	-	-	-	-
Triptofan Deaminaz	-	-	-	-
İndol	+	+	-	+
Voges proskauer	+	+	+	+
Hemoliz	β hemoliz	B hemoliz	β hemoliz	β hemoliz
Metil Red	-	-	-	-
Glukoz*	+	+	+	+
Mannitol*	+	+	+	+
Inositol*	-	-	-	-
Sorbitol*	+	+	+	+
Ramnoz*	-	-	-	-
Sakaroz*	+	+	+	+
Melibioz*	-	-	-	-
Amigdalın*	-	-	-	-
Arabinoz*	-	-	+	-
Laktoz*	-	-	-	-
Maltoz*	+	+	+	+
Fruktoz*	+	+	+	+
Galaktoz*	+	+	+	+
Nişasta*	+	+	+	+

Çizelge 4.1. (devam)

4 °C de üreme	+	+	+	+
15 °C de üreme	+	+	+	+
37 °C de üreme	+	+	+	+
42 °C de üreme	+	+	+	+
%0 NaCl üreme	+	+	+	+
%3 NaCl üreme	+	+	+	+
%6 NaCl üreme	+	+	+	+
%7 NaCl üreme	+	+	+	-
%8 NaCl üreme	-	-	-	-
%10NaCl üreme	-	-	-	-
Nitrat indirgeme	+	+	+	+

* Karbonhidratların fermentasyonu

4.2. Aşı Suşunun Seçimi Amacıyla Yapılan Virülens Çalışmalarına Ait Bulgular

Deneysel aşı hazırlanmasında kullanılacak olan suşun seçimi için virülens çalışmaları yapılmıştır. *V. anguillarum* suşlarının virülens durumlarının belirlenmesi sırasında mililitredeki canlı bakteri sayısı ve bu bakteri sayımlarının elde edildiği kültürlerin spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda optik dansite (O.D) değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.). Suşların gerek mililitredeki canlı bakteri sayımlarında (kob/ml) gerekse O.D. değerlerindeki farklılıklar nedeniyle balıklara verilecek (i.p. yolla 0,1 ml) bakteri miktarının standart hale getirilmesi düşünülmüştür. Bu nedenle çalışmada kullanılan tüm *V.anguillarum* suşlarının O.D. değerleri 0,825'e ayarlanmıştır.

Çizelge 4.2. *V.anguillarum* suşlarının virülens durumlarının belirlenmesi

Suş No	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Ölüm %	Kob/ml	O.D. (600 nm)	Standart O.D.
A4	50	50	100	3.25x10 ⁸	0,796	0,825
A6	50	50	100	4.63x10 ⁸	0,868	0,825
M1	50	50	100	8,5x10 ⁸	0,785	0,825

Standart hale getirilmiş 0,825 O.D. değerine göre hazırlanan bakteri süspansiyonundan balıklara 0,1 ml miktarında i.p. olarak enjekte edilmesinden 24 saat sonra tüm gruplarda % 100 ölüm görülmüştür. Bu nedenle *V.anguillarum* suşlarının 10^3 kob/ml yoğunluğunda bakteri içeren PBS solüsyonları balıklara enjekte edilerek ikinci bir deneme gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçları Çizelge 4.3.' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. *V.anguillarum* suşunun virülens durumlarının kontrol edilmesi

Suş No	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Ölüm %	DeneySEL İnfeksiyon kob/ml	O.D. (600 nm)
A4	50	48	96	3.5×10^3	*
A6	50	47	94	5×10^3	*
M1	50	48	96	8.5×10^3	*

*: Yetersiz Dansite

İkinci denemede *V.anguillarum* suşları içinde yüksek mortaliteye sebep olan M1 suşu aşı çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

Seçilen bu suş ile çalışmaya başlamadan önce tekrar $8,5 \times 10^3$ kob/ml dozunda balıklara verilerek test edilmiştir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Aşı suşu olarak kullanılan *V.anguillarum* suşunun virülens durumunun kontrol edilmesi

Suş No	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Ölüm %	DeneySEL İnfeksiyon kob/ml	O.D. (600 nm)	Standart O.D.
M1	30	29	96.7	$8,5 \times 10^3$	*	*

*: Yetersiz Dansite

4.3. LD₇₀ Dozunun Belirlenmesinde Kullanılan Testlerin Sonuçlarıyla İlgili Bulgular

Antijen etkinliğinin belirlenmesinde; aşılarda hazırlanmış olduğu M1 suşu epruvasyon uygulamasında LD₇₀ dozunda kullanılmıştır. LD₇₀ dozunu tespit etmek amacıyla epruvasyon sonuçları Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. LD₇₀ oranının tespitinde epruvasyon sonuçları

Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Ölüm %	Kob/ml**	O.D.* (600 nm)	LD ₇₀ ***
30	30	100	8,5x10 ⁷	0,082	8,5x10 ² kob/ml
30	30	100	8,5x10 ⁶	0,008	
30	30	100	8,5x10 ⁵	****	
30	30	100	8,5x10 ⁴	****	
30	29	96,7	8,5x10 ³	****	
30	21	70	8,5x10 ²	****	
30	15	50	8,5x10 ¹	****	

*O.D.₆₀₀ : Spektrofotometrede 600 nm dalga boyundaki optik dansite

** kob/ml : Mililitredeki canlı bakteri sayısı

*** LD₇₀ : Bir balık popülasyonunun %70'ini öldürebilen doz.

****: Yetersiz Dansite

Ortalama ağırlıkları 20 g olan balıklar 8,5x10⁷ kob/ml *V.anguillarum* bakterisine maruz bırakıldığında (i.p. yolla, 0,1 ml miktarda enjekte edilen) % 100; 8,5x10¹ kob/ml bakteriye maruz kaldığında ise % 50 ölüm meydana gelmiştir. LD₇₀ değeri ise Çizelge 4.5.'deki sonuçlara göre semi logaritmik kağıt üzerinde 8,5x10² kob/ml olarak belirlenmiştir.

4.4. Hazırlanan Aşının Toksikitesinin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan Denemelerin Sonuçları ile İlgili Bulgular

Deneme sonucunda aşının hazırlanması sırasında kullanılan PBS ve antijen örneklerinin herhangi bir toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. Hazırlanan antijenlerin toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçları

Aşı	Balık Adedi	Mortalite	Yaşama Oranı (%)
Kontrol (PBS)	30	0	100
Kısa süreli banyo	30	0	100
İ.p. enjeksiyon	30	0	100
Oral	30	0	100

4.5. Deneysel Aşıların Sağladığı Bağışıklık Seviyesinin Sonuçlarıyla İlgili Bulgular

Deneysel aşuların etkinliğini değerlendirmek için, çalışmada kullanılan balık grupları LD₇₀ oranında *V.anguillarum* suşuna ($8,5 \times 10^2$ kob/ml) maruz bırakılmıştır. İ.p. enjeksiyon yöntemi ile aşılanan balıklarda 30, 60, 90 ve 120. günlerde % 100 RPS değeri ile diğer yöntemlere ve epruvasyon günlerine göre istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.4.). Kısa süreli banyo (k.b.) yoluyla aşılanan balıklarda 30. günde en yüksek koruma elde edilirken, 60 ve 90. günlerde sağlanan koruma ile istatistiki olarak farklılık göstermemiştir. Oral aşılanan grupta 30. günde elde edilen koruma diğer epruvasyon günlerine göre istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Kısa süreli banyo uygulamasını takiben destek olarak oral aşı uygulanan grubunda ise 30 ve 60. günlerde en yüksek koruma elde edilmiş ve bu günler arasında istatistiki olarak fark bulunmamıştır (Çizelge 4.7., Çizelge 4.8., Çizelge 4.9., Çizelge 4.10., Çizelge 4.11.).

30. günde yapılan epruvasyon denemesinde gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur. En yüksek koruma i.p. grupta elde edilmiştir. 60. günde k.b. ve k.b.+oral grubu, 90. günde kısa süreli banyo ve kısa süreli banyo uygulamayı takiben destek oral aşı; oral ve kısa süreli banyo+oral gruplarında istatistiki olarak farklılık görülmemiştir. 120. günde ise oral ve kısa süreli banyo+oral grupları arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Gökkuşuğu alabalıklarında farklı aşılama yöntemleri ile uygulanan deneysel aşımın koruyuculuğunun karşılaştırılması

Epruvasyon Günleri	İp. enjeksiyon	Kısa süreli banyo (k.b.)	Oral	K.b.+oral
30	100±0 ^{Aa}	31,42±0,5 ^{Ca}	57,11±0 ^{Ba}	28,57±0 ^{Da}
60	100±0 ^{Aa}	19,44±0 ^{Bb}	0 ^{Cb}	30,55±0,5 ^{Ba}
90	100±0 ^{Aa}	8,57±4 ^{Bc}	0 ^{Cb}	2,85±2 ^{BCb}
120	100±0 ^{Aa}	5,12±0 ^{Bc}	0 ^{Cb}	0 ^{Cc}

* Aynı satırda farklı büyük harf ve aynı sütunda farklı küçük harf olan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05)

Çizelge 4.8. İp. enjeksiyon yöntemiyle aşılana 20 g ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında 30, 60, 90 ve 120. günlerde yapılan epruvasyon (LD₇₀) sonrası elde edilen RPS değerleri

Epruvasyon günleri	İp. enjeksiyon aşılama				Kontrol		
	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite (%)	RPS	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	(%)Mortalite (LD ₇₀)
30. gün	50	0	0	100	50	34	68
60.gün	50	0	0	100	50	36	72
90.gün	50	0	0	100	50	35	70
120.gün	50	0	0	100	50	37	74

Çizelge 4.9. Kısa süreli banyo yöntemiyle aşılana 10 g ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında 30, 60, 90 ve 120. günlerde yapılan epruvasyon (LD₇₀) sonrası elde edilen RPS değerleri

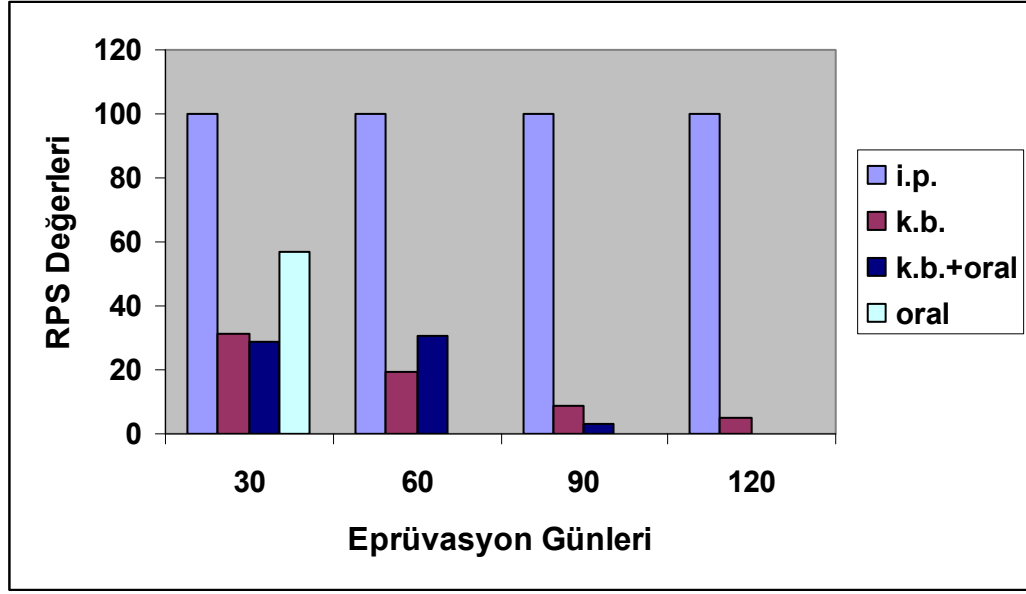
Epruvasyon günleri	Kısa süreli banyo aşılama				Kontrol		
	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite (%)	RPS	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	(%)Mortalite (LD ₇₀)
30. gün	50	24	48	31,42	50	35	70
60. gün	50	29	58	19,44	50	36	72
90. gün	50	32	64	8,57	50	35	70
120. gün	50	37	74	5,12	50	39	78

Çizelge 4.10. Oral yöntemle aşılanan 10 g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarında 30, 60, 90 ve 120. günlerde yapılan eprüvasyon (LD₇₀) sonrası elde edilen RPS değerleri

Eprüvasyon günleri	Oral aşılama				Kontrol		
	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite (%)	RPS	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	(%)Mortalite (LD ₇₀)
30. gün	50	15	30	57,11	50	35	70
60. gün	50	38	76	<0	50	36	72
90. gün	50	40	80	<0	50	35	70
120. gün	50	44	88	<0	50	39	78

Çizelge 4.11. Kısa süreli banyo yoluyla aşılamaı takiben destek olarak oral yolla aşılanan 10 g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarında 30, 60, 90 ve 120. günlerde yapılan eprüvasyon (LD₇₀) sonrası elde edilen RPS değerleri

Eprüvasyon günleri	Kısa süreli banyo+oral aşılama				Kontrol		
	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Mortalite (%)	RPS	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	(%)Mortalite (LD ₇₀)
30. gün	50	25	50	28,57	50	35	70
60. gün	50	25	50	30,55	50	36	72
90. gün	50	34	68	2,85	50	35	70
120. gün	50	39	78	0	50	39	78



Şekil 4.4. Farklı aşılama yöntemleri ile aşılanan gökkuşacağı alabalıklarında antijenlerin koruyuculuk değerlerinin (RPS) karşılaştırılması

i.p: i.p. enjeksiyon uygulanan grup

k.b.: kısa süreli banyo uygulanan grup

k.b.+oral: kısa süreli banyo uygulamayı takiben 1 ay sonra destek oral aşı uygulanan grup

oral: oral olarak aşı uygulanan grup

4.6. Antikor Tespitinde Kullanılan Serolojik Yöntemlerle İlgili Bulgular

4.6.1. Lam aglutinasyon testi ile ilgili bulgular

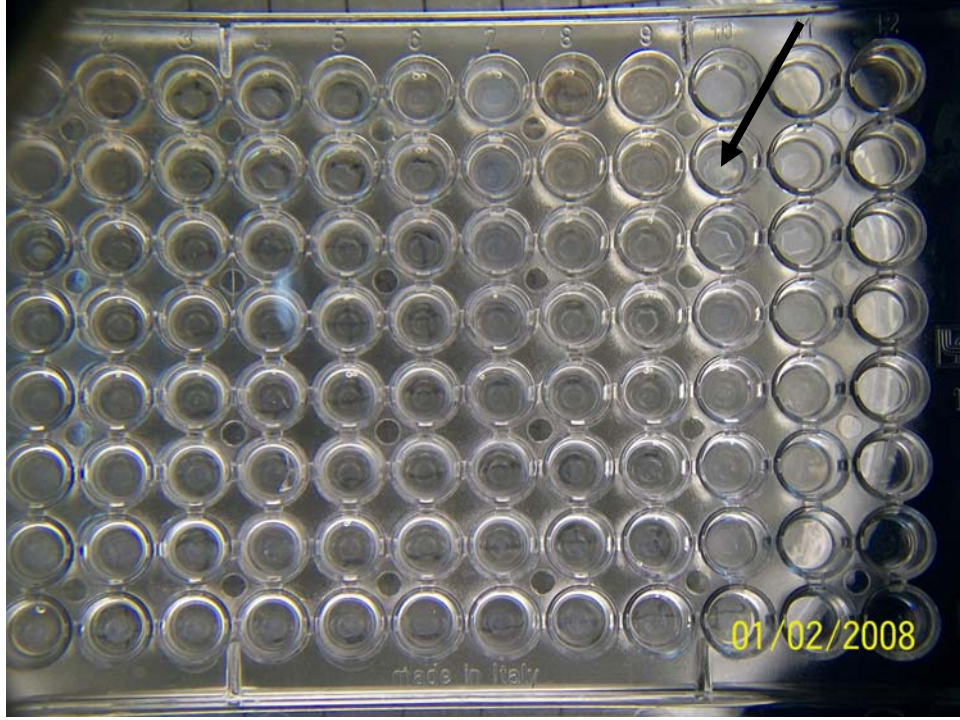
Aglutinasyon antijeni ile immun test serumunun lam üzerinde karıştırılması halinde zayıf aglutinasyon görülmüştür. Aglutinasyonun olduğu lamaların ışık mikroskobu altında incelenmesi halinde bakterilerle antikorun oluşturduğu kümeleşmeler gözlenmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antijenin oluşturduğu kümelerin ışık mikroskopunda görünümü

4.6.2. Mikroaglutinasyon testi ile ilgili bulgular

Aglutinasyon antikorlu içeren test serumlarının polyester yuvarlak tabanlı microplak pleyt çukurlarında antijen ile karıştırılması sonucunda gözle görülebilen zayıf aglutinasyon çökelekleri oluşmuştur (Şekil 4.6.).

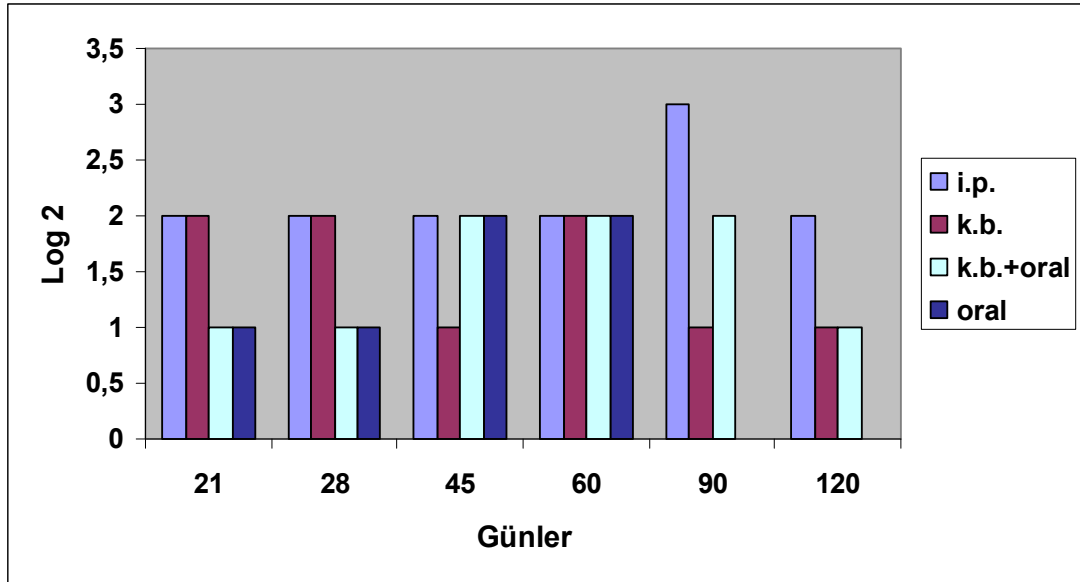


Şekil 4.6. İmmun test serumlarını içeren mikroaglutinasyon plakları

V.anguillarum bakterini ile farklı metotlarla aşıl原因an balıklarda 21, 28, 45, 60, 90 ve 120. günlerde elde edilen serumlardan hazırlanan mikroaglutinasyon testine ait antikor titre sonuçları Çizelge 4.12. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir. Çizelge 4.12.'nin incelenmesinden anlaşılacağı üzere i.p. enjeksiyon yolu ile aşıl原因an balıklarda 21, 28, 45, 60 ve 120. günlerde 1/4 dilüsyonda aglutinasyon görülmüştür. Kısa süreli banyo yoluyla aşıl原因an balıklarda 21, 28 ve 45. günlerde 1/4 dilüsyonunda aglutinasyon görülürken bu değer 90 ve 120. günde azalarak 1/2 dilüsyonuna düşmüştür. Oral aşı grubunda ise 21. günde 1/2 dilüsyonda görülen aglutinasyon 28, 45 ve 60. günde artış göstermiş ve 1/4 dilüsyonda olduğu tespit edilmiştir. 90. günden itibaren bu grupta aglutinasyonun olmadığı belirlenmiştir. Kısa süreli banyo uygulamayı takiben 30 gün sonra destek oral aşı uygulanan grupta 21. ve 28. günlerde 1/2 dilüsyonda aglutinasyon gözlemlenirken, 45. günden 90. güne kadar aglutinasyon 1/4 dilüsyonda elde edilmiştir. 120. günde ise aglutinasyon düzeyinde azalmanın olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı aşılama yöntemleri uygulanarak aşılanan balıkların immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri

İmmünizasyon Sonrası günler	Deneme grupları							
	Enjeksiyon		Kısa süreli banyo		Oral		Kısa süreli banyo+oral	
		Log ₂		Log ₂		Log ₂		Log ₂
21	1/4	2	1/4	2	1/2	1	1/2	1
28	1/4	2	1/4	2	1/4	1	1/2	1
45	1/4	2	1/2	1	1/4	2	1/4	2
60	1/4	2	1/4	2	1/4	2	1/4	2
90	1/8	3	1/2	1	-	-	1/4	2
120	1/4	2	1/2	1	-	-	1/2	1

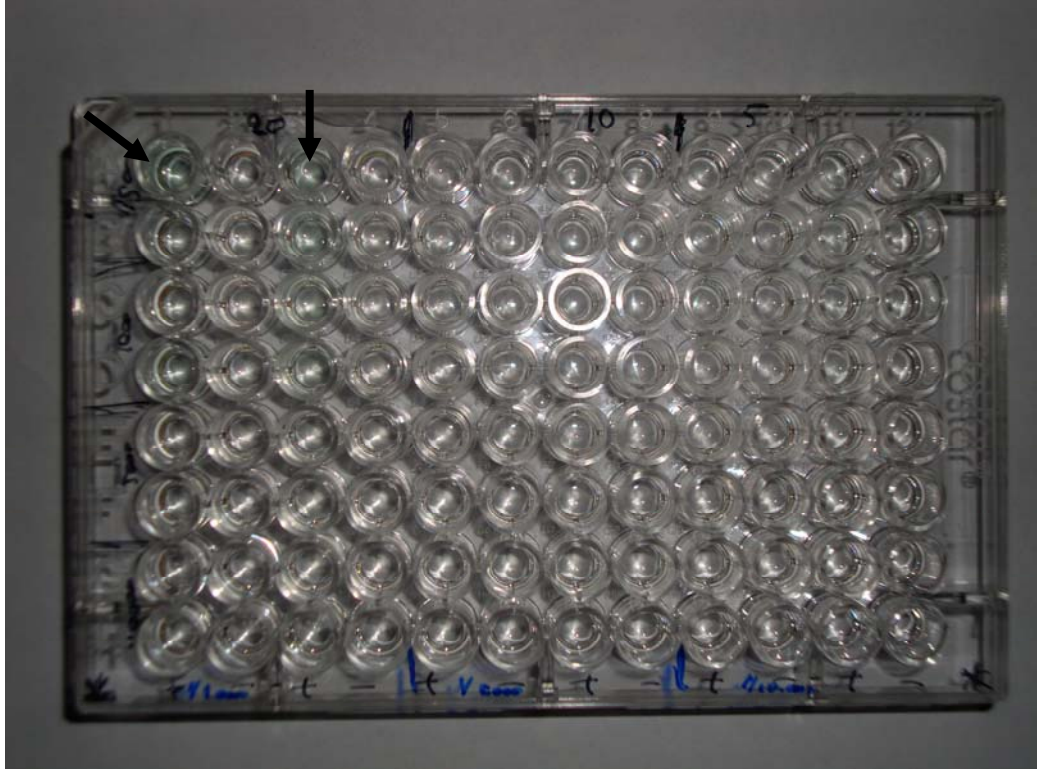


Şekil 4.7. Farklı aşılama yöntemleri uygulanarak aşılanan alabalıkların kan serumunda oluşan antikor titrelerinin (Log₂) günlük dağılımı

4.6.3. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) testi ile ilgili bulgular

ELISA testinin uygulanabilmesi için uygun eriyik antijen protein miktarı ile uygun antiserum ve konjugat titrelerinin tespiti amacıyla microplak pleyt üzerinde ön deneme çalışmaları yapılarak en iyi pozitif reaksiyon oluşturan antijen protein yoğunluğu, antiserum ve konjugat dilüsyonlarına ait değerler tespit edilmeye

alışılmıştır. Fakat bu denemede çok zayıf renk reaksiyonu elde edildiği için uygun protein yoğunluğu, antiserum ve konjugat dilusyonları tespit edilememiştir (şekil 4.8.).



şekil 4.8. ELISA testine ait antijen protein değeri, antiserum ve konjugat dilusyonlarının tespit edildiği mikroyeyt (ok zayıf yeşil renk reaksiyonu)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Su ürünleri yetiştiriciliği özellikle 1980'li yıllardan sonra hızla gelişim göstermiştir. Bu alanda yapılan yatırımların çoğunluğunu gökkuşuğu alabalığı çiftlikleri oluşturmaktadır. Bu işletmelerdeki intensif yetiştiriciliğe bağlı olarak, özellikle de balıkların yoğun bir şekilde stoklanması, stres ve su kalitesindeki olumsuz değişiklikler nedeniyle hastalık sorunları ortaya çıkmaktadır.

Ülkemizde hem deniz balıkları (Çağırğan 1993; Akaylı, 2001; Tanrıku vd., 2004; Demircan ve Candan, 2006; Korun ve Timur, 2008) hem de gökkuşuğu alabalıklarından (Timur ve Korun, 2004; Tanrıku, 2007) izole edilen *Vibrio anguillarum*, su sıcaklığındaki ani değişiklikler, yoğun yetiştiricilik şartları ve su kirliliğine bağlı olarak hastalık oluşturmaktadır.

Gram negatif, tek polar flagellumu ile hareketli, virgül ya da çubuk biçiminde olan *V.anguillarum*'un teşhisi, genellikle fenotipik (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal) özellikleri incelenerek yapılmaktadır (Bruno et al., 1997; Austin and Austin, 1999).

İlk defa 1500'lü yıllarda İtalya sahillerinde yetiştiriciliği yapılan yılan balıklarından izole edilen *V. anguillarum* daha sonraki tarihlerde diğer ülkelere yayılarak farklı balık türlerinde yüksek mortaliteye neden olmuştur (Bullock ve Sniesko, 1971, Austin and Austin, 1999). Farklı balık türlerinden izole edilen *V. anguillarum* suşları ile yapılan çalışmalarda; deniz levreklerinden izole suşlar (*V.anguillarum* O1) arasında biyokimyasal özellikleri yönünden farklılık görülürken (Tanrıku vd., 2004), farklı bölge ve zamanlarda gökkuşuğu alabalığından izole edilen *V.anguillarum* O1 suşları arasında biyokimyasal özellikleri açısından farklılık olmadığı ifade edilmiştir (Tanrıku, 2007). *V. anguillarum*'un fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde geleneksel mikrobiyolojik testler ve günümüzde API 20 E ve BIONOR Mono aglütinasyon hızlı teşhis kitleri de yaygın olarak kullanılmaktadır (Akaylı, 2001; Tanrıku vd., 2004; Austin and Austin, 2007).

Araştırmamızda geleneksel mikrobiyolojik testleri kullanarak elde ettiğimiz sonuçlarda; TCBS'de üreme, Gram boyama, sitokram oksidaz, katalaz, hareketlilik,

O/F, O/129 testi (10 ve 150 µg), sitrat kullanımı, jelatin ve nişasta hidrolizi, H₂S üretimi, voges proskauer reaksiyonu, metil red, hemoliz, glukoz, laktoz, fruktoz ve galaktoz kullanımları, % 0, 3, 6, 7, 8 ve 10 NaCl'de büyüme, 4, 15, 25, 37 ve 42 °C'de üreme açısından suşlar arasında bir farklılık görülmemiştir. Bu yönüyle çalışmamızda kullandığımız suşlar homojen bir yapı göstermiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, ülkemizden izole edilen *Vibrio anguillarum* suşlarıyla çalışmış olan Candan, 2000; Tanrıkul vd., 2004; Korun ve Timur, 2004; Ercan ve Candan, 2006; Tanrıkul, 2007 ile Korun ve Gökoğlu, 2007'nun bulgularını desteklemiştir.

Yapılan araştırmalarda, bazı *V.anguillarum* suşlarının % 0 NaCl'de üreyemediği bildirilmiştir. Austin (1987), *V.anguillarum*'un tuzsuz ortamda üreyemediğini bildirmesine karşın Nishibuahi ve Murago (1977), *V.anguillarum* %0,1 NaCl' de üreyebildiğini bildirmiştir. Ezura vd. (1980), Schoperclaus (1992) ve Plumb (1999) *V.anguillarum*'un % 0 NaCl içeren ortamlarda üreyebildiğini bildirmişlerdir (Çağırğan, 1993). Bu çalışmada kullanılan *V.anguillarum* suşlarının tamamının % 0 NaCl içeren ortamlarda üreyebilmeleri Ezura vd. (1980), Schoperclaus (1992) ve Plumb (1999) sonuçlarına benzemektedir.

Bakteriyel hastalıkların teşhisinde patojenin çabuk ve doğru identifikasyonu önemlidir. Bu amaçla Gram (-) enterik bakterilerin identifikasyonunda API 20 E, Minitex, Micro-ID, Uni-N/F ve Biolog GN adıyla bilinen minyatür multitest identifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Balık patojenlerinin identifikasyonunda en yaygın olarak kullanılanı ise API 20E test stripleridir (BioMerieux S.A.). API 20 E'nin son yıllarda deniz ve tatlı su balıklarının bakteriyel patojenlerinin identifikasyonunda kullanımı gittikçe artmaktadır (Baudin-Laurencin, 1981; MacDonell et al., 1982; Kent, 1982; Maugeri et al., 1983; Romalde and Toranzo, 1991; Biosca et al., 1993; Grisez et al., 1991). *V.anguillarum* suşlarının fenotipik özelliklerinin API 20 E testiyle belirlendiği araştırmalarda; biyokimyasal özellikleri suşlara göre değişiklik gösterdiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Bu bakteri ile yapılan biyokimyasal çalışmalarda Arjinin dihidrolaz, ONPG, Simon sitrat besiyerinde üreme, jelatin ve sorbitol kullanımı pozitif; H₂S, Lizin ve Ornitin dekarboksilaz ve üre kullanımı negatiftir. *V. anguillarum* türleri içerisinde biyokimyasal farklılıklar daha çok şekerlerden asit üretiminde görülse de türlerin

hepsinde glukoz, mannitol, sakarozdan asit üretimi pozitifdir (Bkz. Çizelge 2.1.) (Austin and Austin, 2007). *V.anguillarum*'un farklı serotip veya farklı coğrafik bölgelerden izole edilen suşları arasında biyokimyasal özelliklerin değişkenlik gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada 25 °C'de 24 saat inkübasyon sonucunda *V.anguillarum* suşlarının tamamının ONPG, Simmon's sitrat besiyerinde sitrat kullanımı, VP reaksiyonu, jelatin hidrolizasyonu, arginin dihidrolaz, nitratı indirgeme ve mannitol ve sakkaroz gibi şekerlerden asit üretiminin pozitif; lizin ve ornitin dekarboksilaz, üre ve H₂S testlerinin negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda ADH ve ONPG pozitif, LDC ve ODC'nin negatif olması ile diğer araştırmacılara benzer sonuçlar elde edilmiştir.

1960 yılında *Salmo trutta*'dan izole edilen ATCC 14181 numaralı *V.anguillarum* suşu O2a serotipidir (Buller, 2004; Mikkelsen, 2007). Actis vd. (1999)'ın bildirdiği gibi salmon ve salmon olmayan balıkların patojeni olan O2a serotipine sahip bu suş çalışmada referans olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan suşlar ile referans bakteri (ATCC 14181) karşılaştırıldığında indol ve arabinozdan asit üretimi testlerinde farklılıklar tespit edilmiştir. ATCC 14181 nolu suş ile A4 ve A6 suşlarında indol üretiminin pozitif olması ile Korun ve Gökoğlu (2007), Austin ve Austin (2007), Candan (2000) ve Çağırğan (1993) elde ettiği sonuçla aynı iken araştırmada kullanılan M1 suşunda indol negatif olarak bulunmuştur. Bu sonuç Tanrıkul (2007)'un elde ettiği sonuca benzerlik göstermektedir (Çağırğan, 1993; Candan, 2000; Austin and Austin, 2007; Korun ve Gökoğlu, 2007; Tanrıkul, 2007). Arabinozdan asit üretimi, sadece M1 suşunda pozitif olarak bulunmuştur. Bu sonuç Tanrıkul (2007), Austin ve Austin (2007) ve Çağırğan (1993) elde ettiği sonuca benzerken Korun ve Gökoğlu (2007) elde ettiği sonuçtan farklı olduğu tespit edilmiştir (Çağırğan, 1993; Austin and Austin, 2007; Korun ve Gökoğlu, 2007; Tanrıkul, 2007).

Tanrıkul vd. (2004), levrek balıklarından izole ettiği 9 adet *Vibrio* türünün API 20E ile identifikasyonu yapmıştır. İzole edilen dokuz türden sekizi *Vibrio anguillarum*, biri ise *Vibrio ordalii* olarak identifiye edilmiştir. *Vibrio anguillarum* suşları

içersinde indol testi, inositol, sorbitol, amigdalin ve arabinozdan asit üretiminde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Tanrıkul vd. (2004)'in sonuçlarına benzer olarak çalışmamızda 4 adet *V.anguillarum* suşunun indol testi ve arabinozdan asit üretimi yönünden farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

V.anguillarum Türkiye'deki deniz balığı yetiştiriciliğinde özellikle çipura ve levrek balıklarında hastalığa neden olmaktadır (Çağırğan, 1993; Tanrıkul, 2007). Son yıllarda gökkuşağı alabalıklarında işletmelerinde de vibriosis görülmeye başlanmış ve hızlı bir şekilde yayılım göstermiştir. Gerçekte, hastalık yoğun yetiştiricilik bölgelerinde işletmeden işletmeye hızlı bir şekilde yayılmaktadır (Tanrıkul, 2007).

Vibriosis'e karşı ilk aşı uygulaması 1970'li yıllarda hiperozmatik infiltrasyon yöntemi ile başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Evelyn, 1984). Ancak bu yöntemle aşılanan balıklarda oluşan stres nedeniyle subklinik enfeksiyonların arttığı ve bu nedenle direkt daldırma yönteminin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Çağırğan, 2004; Sommerset et al., 2005). Günümüzde vibriosis, soğuk su vibriosisi ve ERM'ye karşı etkili aşılar geliştirilmiştir. *Vibrio salmonicida*, *Vibrio anguillarum* ve *Yersinia ruckeri* gibi bakterilerden formalinle inaktive edilerek hazırlanan bakterinin balıklara verilmesi ile hastalıklara karşı etkili bir şekilde koruma sağlanmaktadır (Bogwald et al., 1992). Vibriosis'e karşı yüksek düzeyde bağışıklık elde edilmesi için en uygun yöntemin enjeksiyon olduğu saptanmıştır. Bu yöntemi sırasıyla banyo ve oral yöntem izlemektedir (Ellis, 1988; Vigneulle and Baudin Laurencin, 1991). Günümüzde ticari vibriosis aşuların çoğu enjeksiyon ve kısa süreli banyo ve son yıllarda da oral yolla verilecek şekilde formüle edilmiştir (Ellis, 1988; Joosten et al., 1995; Joosten et al., 1997; Midtlyng, 1997).

Bu çalışmada gökkuşağı alabalıklarında (*Onchorhynchus mykiss*) *Vibrio anguillarum*'un neden olduğu vibriozise karşı farklı aşılama yöntemlerinin etkinliği araştırılmıştır. 10 g'lık balıklara kısa süreli banyo, oral ve kısa süreli banyo uygulamayı takiben 30 gün sonra destek oral aşı, 20 g'lık balıklara ise enjeksiyon yolu ile aşı uygulanmıştır. Gökkuşağı alabalıklarında oluşan korunma 30, 60, 90 ve 120. günlerde i.p. enjeksiyon yöntemiyle yapılan eprüvasyon ile belirlenmiştir. Aşılı ve kontrol gruplarındaki balıklara fosfat tuz tamponu içinde (PBS, pH 7,4) son

konsantrasyon 2×10^2 kob/ml dozunda olacak şekilde *V. anguillarum* enjekte edilmiştir. Epruvasyon uygulamaları sonucunda en iyi korumanın 120. güne kadar % 100 RPS değeri ile intraperitoneal enjeksiyon uygulanan grupta olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.8.). 10 g'lık balıklarda kısa süreli banyo (% 31,42 RPS) ve oral yolla aşılamanın (% 57,11 RPS) sadece 30 gün boyunca koruma sağladığı tespit edilmiştir. Kısa süreli banyo+oral aşı uygulamasının da ise 60. günde % 30,55 oranında bir koruma sağlanmıştır (Bkz. Çizelge 4.11.).

Denizde kültürü yapılan Atlantik halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)'larında *Vibrio anguillarum*'a karşı kısa süreli banyo, enjeksiyon, oral intübasyon yoluyla yapılan aşılardan 12 hafta sonra *V. anguillarum* serotip O2 α ile yapılan epruvasyonda enjeksiyon ve kısa süreli banyo gruplarında % 100 yaşama oranı elde edilmiştir. En düşük korumanın ise oral intübasyon yolu ile sağlandığı bildirilmiştir (Bowden et al., 2002).

Dec vd. (1990), 10-50 g'lık levrek balıklarında vibriosisten korunma amacıyla enjeksiyon ve oral yolla aşı uygulamışlardır. Levrek balığında i.p. ve oral yolla aşılardan sonra 33. günde yapılan ilk epruvasyon'da oldukça önemli düzeyde koruma elde edilirken (sırasıyla % 100 ve % 72,4 RPS), 79. günde yapılan 2. epruvasyon da oral ve i.p. aşılamanın sağladığı koruma % 23,1 ve % 88,4 olduğu tespit edilmiştir (Dec et al., 1990) .

Bu çalışmada i.p. enjeksiyon yoluyla deneysel aşı uygulanan gökkuşağı alabalıklarında 120. günde % 100 yaşama oranı elde edilmiştir. Kısa süreli banyo ve oral yolla aşılardan balıklarda ise kısa süreli ve düşük düzeylerde koruma sağlanmıştır. Çalışmada kısa süreli banyo (2×10^7 kob/ml) ve oral aşının hücre sayısı bakımından az olması ($0,5 \times 10^8$ kob/ml) ve oral aşı metotundaki farklılık nedeniyle korumanın Bowden vd. (2002) ve Dec vd. (1990)'in sonuçlarına göre daha az olduğu görülmüştür.

Ellis, (1988) ile Vigneulle ve Baudin Laurencin, (1991) vibriosise karşı en iyi korumanın intraperitoneal enjeksiyon yolu ile sağlandığını bildirmişlerdir. Gross ve Carson (2007), i.p. yolla aşılacağı gökkuşağı alabalıklarında 3,7, 5,6 ve 9,0. aylardaki

koruma oranının sırasıyla % 74, 74 ve 97 olduğu ve balıklarda 9. aya kadar korumanın devam ettiğini bildirmiştir (Gross and Carson, 2007). Bu çalışmaya benzer olarak Schröder vd. (2006), 20 g 'lık Atlantik cod'larında i.p. aşılama 17 hafta sonra % 74'den daha fazla oranda RPS değeri elde etmiştir.

Araştırmamızda 20 g'lık gökkuşığı alabalıkları *V.anguillarum* antijeni ile i.p. enjeksiyon yoluyla aşılanmıştır. Aşılama sonrası 30, 60, 90 ve 120. günlerde yapılan tüm epruvasyon denemeleri sonucunda %100 oranında RPS değeri elde edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç Ellis (1988), Vigneulle ve Baudin Laurencin (1991), Gross ve Carson (2007) ve Schröder vd. (2006)'in sonuçlarına benzer bulunmuştur.

Li vd. (2005), Japon yassı balığında *V.anguillarum*'a karşı i.p. yolla aşılama takiben i.p. olarak destek aşı uygulamıştır. 5×10^8 ve 2×10^9 kob/ml yoğunluğunda hazırlanan aşı balıklara enjeksiyon ve Freud İncomplete Adjuvant ilave edilmiş enjeksiyon aşı (1:1) olacak şekilde uygulanmıştır. Aşının etkinliği 110 gün sonra yapılan epruvasyon ile belirlenmiştir. Sonuçta en iyi korumanın % 93,8 RPS değeri ile $1,2 \times 10^9$ kob/ml dozda 1. ve 2. aşı uygulanmış grupta olduğu tespit edilmiştir. 5×10^8 kob/ml dozda aşı uygulanan grupta % 81,3, 5×10^8 kob/ml+FIA uygulanan grupta % 87,5 oranında yaşama oranı elde edilmiştir (Li et al., 2005). Bu çalışmada gökkuşığı alabalıkları 2×10^8 kob/ml dozunda hazırlanan *V.anguillarum* bakterini ile adjuvant kullanılmadan aşılanmıştır. Çalışmamız sonunda 120. günde yapılan epruvasyonda %100 RPS değeri elde edilmesi ile Li vd. (2005)'in sonucuna benzerlik göstermiştir. Böylece vibriosise karşı i.p. enjeksiyon ile aşılama için seçilen aşı dozunun uygun olduğu belirlenmiştir.

Quentel ve Ogier de Baulny (1995), farklı yaş ve ağırlıklardaki kalkan balıklarında ip enjeksiyon olarak tek ve destek aşılamasının etkinliğini test etmişlerdir. Formalinle öldürülmüş 2×10^{11} kob/ml dozundaki ticari vibriosis aşısı ortalama ağırlıkları 0,4-1,3 g arasında değişen aynı orjinli; 62 (grup I), 76 (grup II), 90 (grup III) ve 104 (grup IV) günlük juvenil kalkan balıklarına uygulanmıştır. Grup I ve II'ye destek aşılama ilk aşılama takiben 28 gün sonra yapılmıştır. Kalkan balıklarında ip.yolla yapılan tek aşılamadan 1 ay sonra korumanın olduğu gözlenmiştir. Oransal yaşama oranı (RPS) 62, 76 veya 104 günlük juvenillerde aşılamadan sonra benzer

bulunmuştur. İlk aşılamaadan 2 ay sonra kalkan juvenillerinin III. ve IV. gruplarında hala korumanın devam ettiği ve RPS değerleri ilk 1 aylık aşılamaadan sonra elde edilene göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. I. ve II. Gruptaki balıklara yapılan destek aşının ise etkisiz olduğu belirlenmiştir (Quentel and Ogier de Baulny, 1995).

Günümüzde kısa süreli banyo yöntemi ile vibriozis ve yersiniozis'e karşı aşılamaada oldukça başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen, diğer bakteriyel balık hastalıkları için yeterli seviyede koruma sağlanamamaktadır (Ellis, 1988, Lillehaug, 1989). Bu çalışmada kısa süreli banyo yöntemi için hazırladığımız deneysel aşı 1:10 oranında dilue edilerek son konsantrasyon 2×10^7 kob/ml olacak şekilde gökkuşağı alabalıklarına 1 dakika süre ile uygulanmıştır. 30, 60, 90 ve 120. günlerde yapılan eprüvasyon çalışmalarında sırasıyla % 31,42, % 19,44, % 8,57 ve % 5,12 oranında RPS elde edilmiştir.

Cod juvenillerinde iyi bir korumanın sağlanması amacıyla aşılama zamanında balıkların belli bir büyüklükte olmaları gerektiğini ifade eden Schröder vd. (2006), 1-20 g ağırlığındaki Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juvenillerinde banyo yolu ile ticari vibriosis aşısının (ALPHA MARINE™ Vibrio, PHARMAQ AS) etkinliği değerlendirmişlerdir. 1 g'lık juvenillerde banyo yolu ile aşılamaadan 6 hafta sonra RPS < % 47 değeri ile zayıf bir koruma sağlanırken, aşılamaadan 14 hafta sonra RPS < % 36 değeri elde etmişlerdir. Bu çalışmada daldırma aşılamaadan 7 hafta sonra 2,2 g'lık (RPS>75) juvenillerde 1,7 g'lıklara (RPS<54) göre önemli derecede yüksek koruma sağlanmıştır. 5 g'lık juvenillere uygulanan daldırma aşı ile aşılamaadan en az 28 hafta (RPS>76) sonraya kadar devam eden güçlü bir koruma elde edilmiştir. 20 g'lık balıklarda ise daldırma aşılamaadan 17 hafta sonra (RPS>74) elde edilen korumadan daha güçlü bir koruma sağlanmıştır (Schröder et al., 2006)

Johnson vd. (1982), çeşitli büyüklükteki alabalıkları ticari bir aşının 10 kat sulandırmasıyla 20 saniye kısa süreli banyo yolu ile aşılamaıştır. Eprüvasyon sonucunda bağışıklığın 1 gramlık balıklarda 120 gün, 2 gramlıklarda 180 gün, 4 g ve daha büyük balıklarda 1 yıl veya daha fazla sürdüğünü belirtmiştir (Tıravoğlu Demirtaş, 2006).

Bu çalışmada kısa süreli banyo yoluyla aşılamanın 10 g'lık gökkuşuğu alabalıklarında Johnson vd. (1982) ve Schröder vd. (2006)'ın elde ettikleri sonuçlardan farklı olarak daha düşük düzeylerde ve daha kısa süreli olarak koruma elde edilmiştir. Bu çalışmalardaki kısa süreli banyo yöntemi ile elde edilen koruma oranlarının farklı olmasının nedeni, hazırlanan aşı konsantrasyonunun yoğunluğu ile bağlantılı olabileceğini düşünmekteyiz.

Thorburn ve Jansson (1988), gökkuşuğu alabalıklarını *V.anguillarum*'a karşı tek veya 2 kez (4.1 g ve 6.3 g) aynı dozda kısa süreli banyo yolu ile aşılamıştır. İkinci aşılamadan 1 ay sonra yapılan epruvasyonda 6.3 g'da tek aşılamaya yapılmış grup ile 6.3 g'da destek aşı uygulanan gruplar arasında elde edilen balık ölümlerinde önemli farklılıklar bulunmamıştır. Bununla birlikte 6.3 g'lık her iki grupta, 4.1 g'da bir kez aşılanmış balıklardan daha düşük ölümler görülmüştür. (Thorburn and Jansson, 1988).

Antipa vd. (1980), 5 g'lık sockeye salmonlarını vibriosise karşı destek aşı olarak hiperosmatik infiltrasyon ve direkt kısa süreli banyo yolu ile aşılamıştır. Balıklar aşılamadan sonra 2 farklı konsantrasyonda banyo yolu ile epruvasyona maruz kalmışlar ve destek aşı uygulamanın, tek aşı uygulamaya göre 1/10 oranında daha fazla yaşama oranı sağladığını tespit etmişlerdir (Antipa et al., 1980).

Çağırğan (2004), Levrek yavrularında (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) *Vibrio anguillarum* Serotip 1'den hazırladığı aşının etkinliğini tespit etmiştir. Bu çalışmada 2 farklı gruptaki levrek balıkları 1:10 sulandırılmış 2×10^9 kob/ml dozunda aşı ile kısa süreli banyo ve k.b.+k.b. olacak şekilde aşılanmıştır. Aşı uygulamasından 21 gün sonra aşılı ve kontrol grubunda sırasıyla % 10 ve % 59 oranında ölüm görülmüştür. Hesaplanan oransal yaşama oranı (RPS) % 83 olarak tespit edilmiştir. 240 gün sonra bir ve iki kez aşılı gruplarda ölüm oranları sırasıyla % 53 ve % 27,5, aşısız grupta ise % 71 olarak bulunmuştur. Sonuçta, 2 kez aşılanan grupta, aşılamadan 240 gün sonra iyi bir korunmanın olduğu ortaya konulmuştur (% 61,3 RPS) (Çağırğan, 2004). Angelidis (2005)'in bu çalışmaya benzer olarak levrek yavrularında *V.anguillarum*'a karşı destek kısa süreli banyo aşı uygulaması ile güçlü bir koruma sağlamıştır. Çalışmanın sonunda destek aşı uygulanan gruplarda ölüm görülmemiştir. Kontrol

grubunda % 50 ölüm, bir kez aşılanaalarda ise % 10 oranında ölüm tespit edilmiştir (Angelidis, 2005).

Bu çalışmada 10 g'lık gökkuşığı alabalıklarına kısa süreli banyo ve k.b.+oral aşı uygulanmıştır. Sadece kısa süreli banyo yoluyla aşı uygulanan balıklarda 30. günde % 31,42 RPS elde edilirken 60. günde bu oranın % 19,44'e düştüğü tespit edilmiştir. Kısa süreli banyo yoluyla aşılamaadan 30 gün sonra yapılan destek oral aşı ile 60. günde % 30,55 RPS değeri elde edilmiştir. Bu çalışmada kısa süreli banyo yoluyla aşılamaada elde edilen yaşama oranı diğer araştırmacıların sonuçlarından (Thorburn and Jansson, (1988), Antipa et al., (1980), Çağırğan (2004), Angelidis (2005)) farklı olarak düşük düzeylerde bulunsa da, 2. aşılama ile sağlanan koruyuculuğun tek aşılamaaya göre balıklarda korumayı arttırması yönünden benzerlik göstermektedir.

Deniz balıklarından levrek ve kalkan balıklarında vibriosise karşı oral aşı uygulaması takiben iyi sonuçlar alınmasına rağmen, salmonidlerde değişken sonuçlar tespit edilmiştir. Oral aşı ile yapılan çalışmalarda Johnson ve Amend (1983) ve Vigneulle (1990) tarafından olumlu sonuçlar alınırken, Baudin Laurencin ve Tangtrongpiros (1980) ve Horne vd. (1982), tarafından ise etkisiz olduğu belirlenmiştir. Bu değişken sonuçlar yeme ilave edilen antijenin midede yıkımlanmasına kısmen bağlı olabilmektedir (Vigneulle and Baudin Laurencin, 1991).

Oral aşılamaadaki en önemli problem bakterinin mide ve bağırsağın ön kısmında sindirim sıvılarının etkisiyle yıkımlanmasıdır. Bu nedenle oral yolla verilecek aşılaların bağırsağın birinci kısmında sindirilmesini önlemek ve bağışıklık sistemini uyuracak antijenik determinantların bozulmadan ikinci kısma geçmesini sağlamak için kapsüllenmeleri gerekmektedir (Ellis, 1988; Joosten et al., 1995; Joosten et al., 1997; Lavelle et al., 1997). Son yıllarda yapılan çalışmalarda antijenlerin sodium alginat (Joosten et al.,1997), biyolojik antijen taşıyıcıları (Joosten et al.,1995) ve PLG (Polylactide co glycolide) gibi polimerler kullanılarak hazırlanan mikropartiküller içerisinde yemle balıklara verilmesi sonucu oral aşılamaada başarılı sonuçlar alınmıştır (Joosten et al., 1997; Lavelle et al., 1997).

Balıklarda biyolojik kapsülasyon (Joosten et al.,1995) alginatla kapsülasyon ve enterik kaplama (Joosten et al., 1997) gibi birçok farklı kapsülasyon uygulamaları

yapılmasına rağmen PLG ile mikrokapsülenmiş oral aşılama çalışmalarıyla ilgili çok az çalışma bulunmaktadır (Lavelle et al.,1997). Lavelle vd. (1997), gökkuşağı alabalığını PLG mikropartikülleri içine mikrokapsülenmiş antijenlerle aşıladığında istenen seviyede antikor oluşumu gözlemlenmemesine rağmen kapsülenmiş antijenlerin sindirim sisteminin proteolizinden geçerek kana ulaşabildiğini göstermiştir (Lavelle et al.,1997).

Lillehaug (1989), 50 g'lık gökkuşağı alabalığında vibriosise karşı 2 farklı metotla (enterik kaplı granüller (aside dirençli film) ve priller) hazırladığı oral aşı ile kısa süreli banyo ve i.p. enjeksiyonun etkinliğini karşılaştırmıştır. Yapılan epruvasyon denemeleri ile elde edilen ölümler sonucu kaplanmış aşıların etkinliği (prill ve enterik kaplı granüllerde sırasıyla % 45,7 ve % 40,1 RPS), standart aşılama yöntemleri (im. ve ip. sırasıyla % 94,6, % 98,2) ve kaplamadan oral olarak verilen aşıdan (% 82,7 RPS) daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeni vibriosis aşılarında önemli antijenik unsur olan lipopolisakkaritlerin mide sindirimden az da olsa etkilenmesi olarak ifade edilmiştir. Aşının kaplanması sadece antijenlerin absorpsiyonunu azaltmıştır. Sonuç olarak sindirime karşı aside dirençli film veya yavaş sindirilen peletle kaplanarak oral olarak verilen aşılamadan sonra istenen düzeylerde bağışıklık sağlanamamıştır (Lillehaug, 1989).

Dekstroz küre gibi enterik kaplı antijen mikroküreler ile kaplanan *V. anguillarum* 'un aside dirençli filmi Wong vd. (1992), tarafından çalışılmıştır. Coho salmonlarda 30 gün süresince korunmuş antijen ile beslemeden sonraki yaşama oranı, kaplanmamış antijenle beslenenlere göre artmamıştır. Buna rağmen negatif kontrol ve kaplanmamış antijenle beslenen balıklara göre hayatta kalan balıklarda serumda ve mukusta daha yüksek oranda antikor titresi elde edilmiştir (Joosten et al., 1997).

Joosten vd. (1997), yapmış oldukları çalışmada formalinle öldürülmüş ticari *V.anguillarum* bakterininden (Biovax 1300, BIOMED Inc., Washington, U.S.A.) elde ettikleri 800 g'lık supernatantı alginat mikropartikülleri ile kapsülemişlerdir. 2 farklı tipte hazırlanan alginat mikropartikülleri (Tip I: 2.4 mg liyofilize V.a. sup/g ve Tip II: 10.6 mg liyofilize V.a. sup./g) sazan ve gökkuşağı alabalıklarının yemine ilave edilerek verilmiştir. Sazan ve alabalıklar günlük olarak 16.67 g yem/ kg canlı

ağırlık olacak şekilde beslenmiştir. 2. aşılama, ilk aşılama 10 hafta sonra i.m. olarak uygulanmıştır. I. aşılama (oral aşılama) ve 2. aşılama 3 hafta sonra balıklardan kan alınarak serumda antikor titreleri tespit edilmiştir. Sazanlarda en iyi hafıza kapsüllenmiş mikropartikül Tip I ile beslemeden sonra elde edilirken, alabalıklarda Tip II mikropartikül ile beslemeden sağlanmıştır. Diğer yandan tip 2 mikropartikülleri kapsüle edilmeyen antijenle karşılaştırıldığında, enkapsüle edilen antijenle beslenmeden sonra antikor titrelerinde artış görülmediği için etkisiz olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda enkapsüle edilen antijenler ile oral aşılamanın sistemik hafızayı geliştirdiği ve mukosal bağışıklığı harekete geçirdiği belirlenmiş ve oral aşılamanın bakteriyel hastalıkların kontrolünde kullanılabileceği ifade edilmiştir (Joosten et al., 1997).

Bu çalışmada PLG polimerleri kullanarak kapsüllenmiş antijen, gökkuşağı alabalıklarının yemine canlı ağırlıklarının % 2'si oranında günlük 0.5×10^8 kob/balık dozunda ilave edilerek 10 gün boyunca beslenmiştir. Çalışma sonunda yapılan epruvasyon denemelerinde oral aşının sadece 30 gün koruma sağladığı tespit edilmiştir (% 57,11 RPS). 60, 90 ve 120. günlerde ise yapılan epruvasyon sonucu aşı balıklarda ölüm oranı kontrol grubuna benzer olarak bulunmuştur. Lillehaug (1989), Wong vd. (1992) ve Lavelle vd. (1997)'in elde ettiği sonuçlara benzer olarak bu çalışmada da istenilen düzeylerde koruma sağlanamamıştır. Bunun nedeni olarak PLG polimerleri ile hazırlanan boş mikrokürelere emdirilen aşının istenilen konsantrasyona ulaşamadığı için balıklarda beklenen düzeyde koruma sağlayamadığı düşünülmektedir.

Ellis (1988)'in oral aşı etkinliğinin diğer yöntemlere göre düşük olmasına rağmen, destek aşı olarak kullanılabileceğini ifade etmektedir. Bizim sonuçlarımızı da bu araştırma sonuçlarını desteklemektedir. Çalışmamızda kısa süreli banyo uygulamayı takiben 30 gün sonra oral destek aşı uygulaması ile balıklarda 60. güne kadar korumanın devam ettiği görülmüştür.

Enfeksiyonların teşhisinde çok geniş bir kullanım alanı bulan ELISA serolojik test yöntemi balık hastalıklarının teşhisinde de geniş bir kullanım alanını bulmuştur (Engvall and Perlmann, 1972; Voller et al.,1976;1979; Dixon, 1985; Manfredi, 1986;

Nakamura et al., 1986; Arkoosh and Kaattari, 1993; Yardımcı vd., 1994). ELİSA testi çok hassas ve fazla zaman almayan bir serolojik testtir (Dixon, 1985; Arkoosh and Kaattari, 1993).

Bu çalışmada farklı aşılama yöntemleri ile immunize edilen gökkuşağı alabalıklarının serumlarında antikor titrelerinin tespiti için mikroaglutinasyon ve ELİSA testi yapılmıştır. *V.anguillarum* bakterini ile farklı yöntemlerle aşılanan balıklarda yapılan mikroaglutinasyon testine ait sonuçları içeren Çizelge 4.12'nin incelenmesinden anlaşılacağı üzere tüm gruplarda 21, 28, 45, 60, 90 ve 120. günlerde maksimum 1/8 dilüsyonda aglutinasyonun olduğu tespit edilmiştir. ELISA testi sonucunda ise çok zayıf renk reaksiyonu görülmüştür. Sonuçta *V.anguillarum*'a karşı farklı aşılama yöntemleri kullanılarak yapılan immunizasyonda balıkların serumlarında düşük düzeylerdeki antikorların varlığı mikroaglutinasyon ve ELISA testi ile saptanmıştır.

Boesen vd. (1999)'ın yapmış olduğu çalışmada sockeye salmon, ayu veya gökkuşağı alabalığında *V. anguillarum*'a karşı özellikle oral veya kısa süreli banyo yoluyla aşı uygulanmasını takiben yapılan eprüvasyona karşı koruma sağlanırken, bu korumanın spesifik serum antikor cevabında görülen artış ile bağlantısının olmadığı ifade edilmiştir. Bu durum oral ve kısa süreli banyo aşılama da, korumanın mukozal bağışıklığın aktive edilmesiyle meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca, *V. anguillarum*'a karşı etkili koruma için, serumda az yada aglutine edilemeyen düzeylerdeki spesifik antikorların varlığının da yeterli olabildiği ifade edilmiştir (Boesen et al., 1999).

Bu çalışmada Boesen vd. (1999)'ın bildirdiği gibi gökkuşağı alabalığında *V. anguillarum*'a karşı farklı aşılama yöntemleri ile immunizasyonu sonucunda yapılan eprüvasyona karşı koruma sağlanırken, serumda düşük ya da aglutine edilemeyen düzeylerdeki spesifik antikorların varlığı mikroaglutinasyon ve ELISA testi ile tespit edilmiştir. Denemede balıklarda korumanın mukozal bağışıklık ile sağlandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada;

1. *Vibrio anguillarum* suşlarının (M1, A4, A6) fenotipik özelliklerinin benzer bir karakter gösterdiği gerek geleneksel testler gerekse API 20 E hızlı teşhis sisteminin kullanımıyla ortaya konulmuştur.

2. Çalışmada kullanılan 3 adet *Vibrio anguillarum* suşu ile yapılan virülens denemeleri sonucunda suşların tamamının yüksek virülense sahip olduğu tespit edilmiştir. Seçilen aşı suşundan hazırlanan antijen gökkuşağı alabalıklarına i.p. enjeksiyon, kısa süreli banyo, oral ve kısa süreli banyo uygulamayı takiben destek olarak oral aşı uygulanmıştır. En yüksek korumanın enjeksiyon aşı uygulanan gruplarda sağlandığı tespit edilmiştir. Enjeksiyon aşılama 120. günde hala % 100 oranında RPS değeri elde edilmiştir. Balıklarda kısa süreli banyo ve oral aşılama yöntemleri ile 30. gün sırasıyla 31,42 ve 57,11 korunma oranı elde edilmiştir. Kısa süreli banyo aşıyla oral aşının birlikte verildiği gruplarda ise 30. gün 28,57 ve 60. gün 30,55 oranında düşük bir koruma saptanmıştır. Vibriosis'e karşı mikrokapsül oral aşılardan (PLG) etkinliğinin diğer yöntemlere göre düşük olmasına rağmen, destek aşı olarak kullanılabilmesi tespit edilmiştir.

3. İmmun balıkların serumunda antikor titrelerinin tayini için yapılan mikroaglutinasyon ve ELISA testlerinde tüm gruplarda çok düşük düzeylerde antikor titresi elde edilmiştir.

Araştırmamızda elde ettiğimiz verilere göre balıklarda vibriosis ile ilgili bağışıklığın değerlendirilmesinde antikor düzeyinin belirlenmesinin yanıltıcı olduğu ve epruvasyonlar yapılarak elde edilen koruma değerinin ölçü alınması gerektiği belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Aakre, R., Wergeland, H. I., Aasjord, P. M., Endresen, C., 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing B-1, 3-M- glucan as aduvant. Fish and Shellfish Immunology, 4, 47-61.
- Actis, L.A., Tolmasky, M.E., Crosa, J.H., 1999. Vibriosis. In: Fish Diseases and Disorders, volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno. CAB International Publication,,142 pp.Newyork..
- Akhlaghi, M., 1999. Passive immunisation of fish against vibriosis, comparison of intraperitoneal, oral and immersion routes. Aquaculture, 180,191–205.
- Akaylı, T. 2001. Kültür Çipura balıklarında (*Sparus aurata*, L.1758) Vibriosis'in Elisa ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi. İstanbul Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü.Doktora Tezi, 77s. İstanbul.
- Al-Harbi, A.H., Austin, B., 1993. Purification of macroglobulins from the Serum and skin and gut mucus of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunized with lipopolysaccharide (LPS) from a fish-pathogenic Cytophaga-Like Bacterium (CLB). Bullentin Europe Association of Fish Pathology, 13(2), 40-45.
- 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.
- Angelidis, P., 2005. Immersion booster vaccination effect on sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juvenils.Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 90,46-49.
- Antipa, R.,Gould,R., Amend, D.F.,1980. *Vibrio anguillarum* vaccination of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) by direct immersion and hiperosmotic immersion. Journal of Fish Diseses, 3, 161-165.
- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Diker, K.S.,1994. İmmunoloji. Medisan Yayınevi,394s. Ankara.
- Arda, M.,1998. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi,490s. Ankara.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyüpoğlu, M., 2002. Balık Hastalıkları. Medisan Yayınevi, ISBN 75-7774-53-7, Ankara.
- 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. (STOKEN,J.S., FLETCHER, T.C., ANDERSON, D.P., ROBERSON, B.S., Van MUISWINKEI, W.B., eds.). SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303, 15-24p. USA.
- Austin, B., Austin, D.A.,1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish, Second edition. Ellis Horwood Limited Chichester, 457pp.U.K.
- Austin, B., Austin, D.A.,2007. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish 4th edition.Springer-Praxis publishing, Chichester, 594p.UK.

- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H., 1995. Some Biochemical Properties and antibiotic Sensitivities of *Pasteurella piscicida* Isolated in Greece and Comparison with Strains from Japan, France and Italy. *Journal of Fish Diseases*, 18, 1–7.
- Balebona, C.M., Zorilla, I., Morinigo, M.A., Borrege.J.J., 1998. Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt head sea bream (*Sparus aurata*, L) in south western Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture*, 166, 19-35.
- Baran, İ., Timur, M., Aydın, N., İstanbulluoğlu, E., Aydınтуğ, M.K., 1980. Çifteler-Sakaryabaşı Balık Üretim ve Araştırma İstasyonunda Alabalıklarda (*Salmo gairdneri irideus*) Görülen Bakteriyel Hemorajik Septisemi Hastalığı Üzerinde İncelemeler. A.Ü. Veteriner Fak. Derg. 27(3-4) Ankara.
- Baudin-Laurencin, F., 1981. Fish *Vibrio* strains in France. *Developments in Biological Standardization*. 49,257-259.
- Baumann, P., Bang, S. S., Baumann, L. 1978. Phenotypic characterization of *Beneckeia anguillara* biotypes I and II. *Current Microbiology*.1:85–88.
- Benediktsdottir, E., Helgason, S., Sigurjonsdottir, H., 1998. *Vibrio* spp. isolated from salmonids with shallow skin lesions and reared at low temperature. *Journal of Fish Diseases*, 21,19-28.
- Bilgehan, H. 1993. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*. Barış Yayınları, Fakülteler kitapevi, 587s. İzmir.
- Biosca E. G., C. Esteve, E. Garay, C. Amaro, 1993. Evaluation of the API 20E system for identification and discrimination of *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2. *Journal of Fish Diseases*,16,79-82.
- Boesen, H.T., Pedersen, K., Koch,C., Larsen, J.L., 1997. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to antigenic preparations from *Vibrio anguillarum* serogroup O1. *Fish and Shellfish Immunology*,7, 543–553.
- 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.
- Bogwald, J., Stensvag, K., Hoffman ,J., Holm, K.O., Jorgensen, T.O., 1992. Vaccination of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with particulate lipopolysaccharide antigens from *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology*,2, 251-261.
- Bonaldo, A., Bovo, G., Manfrin, A., Murano, E., Mordenti, O., Gatta, P.P., 2003. Improvement of protection againts vibriosis induced by oral vaccination in combination with dietary β -glukan in seabass *Dicentrarchus labrax*. 21-26 September 2003, Malta.European Association of Fish Pathology, 11th Internatioanl Conference.
- Bowden, T. J., D. Menoyo-Luque, I., Bricknell, R., Wergeland, H.,2002. Efficacy of different administration routes for vaccination against *Vibrio anguillarum* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*,12, 283-285.

- Bruno, D.W., Alderman, D. J., Schlotfeldt, H.J., 1997. What Should I Do?. A practical Guide for the marine fish farmer. ISBN 0-9526242-2-2.
- Buchmann,K., Ostergaard, L., Glamann, J., 1992. Affinity purification of antigen-specific serum immunoglobulin from the European Eel (*Anguilla anguilla*).Scandinavian Journal of Immunology, 36, 89-97.
- Buller, N.B., 2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals. A practical Identification Manual, CABI publishing,0851997384. U.K.
- Bullock, G.L., Sniesko, S.F., 1971. Bacterial Diseases of Fish. Diseases of Fishes, book 2A.. T.F.H., 56-80 pp.
- Busch, R.A., 1981. The Current Status of Diagnostic Serology for the Major Bacterial Diseases of Fishes. International Symposium on Fish Biologics. Serodiagnostics and Vaccines. Developments in Biological Standardization, 49, 85-96, Wa. USA.
- Candan, A., 1991. Çipura (*Sparus aurata*, L.1758) yetiştiriciliğinde mevsimsel olarak görülen hastalık etkenlerinin tesbit ve tedavi yönteminin geliştirilmesi. İstanbul Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 100s, İstanbul.
- Candan, A., 2000, Türkiyede Üretilen Atlantik Salmon (*Salmo salar* L.)'unda Saptanan İlk Vibriosis Olgusu. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 24, 1.
- Collins, C.H., Lyne, P.M.,1976. Microbiological Methods.Butterworths, 521p. London-Boston.
- 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.
- 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 Üniv.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.
- Çakır, H., Mater, S., 1993. Salmon Balığı ve Üretim Tekniği . Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Bodrum, s.107.
- Dec, C., P. Angelidis, F. B. Laurencin, 1990. Effects of oral vaccination against vibriosis in turbot *Scophthalmus maximus* (L.) and sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). Journal of Fish Diseases,13, 369-376.
- Değim, Z., Ünal, N., Eşsiz, D., Abbasoğlu, U., 2005. Caco-2 cell Culture as a Model for Farmotidine Absorption, Drug Delivery, 12:27-33.
- Demircan, D., Candan, A., 2006. Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (rpoN Gene) Associated with Vibriosis in Marine Fish in Turkey. Turkish Journal of Veterinarian Animal Science, 30, 305-310.
- Diler,Ö., Kubilay,A., 1996. Gökkuşluğu Alabalıklarında Yüksek Mortaliteye Neden olan Hemorajik Septisemi Etkeni Pseudomonas sp. Üzerinde Bir Çalışma.

İ.Ü. II. International Symposium On Aquatic Products. September. Abstracts, 95s. İstanbul.

- Diler, Ö., 1999. Balık Hastalıkları Ders Notları, Eğirdir.
- Dixon, P.F., 1985. Rapid Detection and Identification of Fish Pathogens by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).In:Fish and Shellfish Pathology.(ELLIS, A.E., ed.) Academic Press,11-16p. London.
- Dos Santos, N.M.S., 2000, Development of Immunity in Sea Bass : A study Towards Vaccination Against Pseudotuberculosis. Cell Biology and Immunology Group, Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen University, PhD thesis, 199p. The Netherlands.
- Ekici, S., Diler, Ö., Altun, S., 2005. Kültürü yapılan balıklarda görülen Vibriosis enfeksiyonları. XIII Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 01-04 Eylül 2005, Çanakkale.
- Ellis, A.E., 1978. The Immunology of Teleosts. In:Fish Pathology. (ROBERTS,R.J.ed.) Bailliere Tindall Adivision of Cassell Ltd., 93-104.
- Ellis, A.E., 1988. General Principles of Fish Vaccination. In:Fish Vaccination, (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press Ltd. 1-19p. London.
- Ellis, A.E., 1989. Use of vaccines in controlling fish diseases. Developmental and Comparative immunology.13(4), 399.
- Ellis,A.E., 1999. Immunity to Bacteria in Fish. Fish and Shellfish Immunology, 9, 291–308.
- Engvall, E., Perlmann, P., 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. The Journal of Immunology, 109, 129-135.
- Ercan, M.D., 2009. Levrek (*Dicentrachus labrax*L.1758) balıklarında *Vibrio anguillarum*'un patogenezi üzerine bir araştırma. İstanbul Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, 93s.İstanbul.
- Ergüven,H.,Soylu,E.,1988. Marmara bölgesinde gökkuşuğu alası (*Salmo gairdneri* R.,1836) yetiştiriciliği yapan üç işletmede görülen bakteriyel solungaç hastalığı. Su Ürünleri Dergisi.2, 2:85-93.
- Esental, Ö.M. 1994. Tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum*'a karşı oluşan antikörlerin çeşitli serolojik yöntemlerle (SPA, HI, AGP, ELISA) saptanması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 41(1),18-47.
- Estevez, J., Leiro, J., Sanmartin, M. L., Ulseira, F. M., 1993. Isolation and partial characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins. Comparative Biochemistry and Physiology,105A, 275-281.
- 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.

- Fuda, H., Soyano, K., Yamazaki, F., Hana, A., 1991. Serum immunoglobulin M (IgM) during early development of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99A, 637-643.
- Fuda, H., Hara, A., Yamazaki, F., Kobayashi, K., 1992. A peculiar immunoglobulin M (IgM) identified in eggs of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Developmental and Comparative Immunology*, 16, 415-423.
- Gravningen, K., Thorarinsson, R., Johansen, L.H., Nissen, B., Rikardsen, K.S., Greger, E., Vigneulle, M., 1998. Bivalent Vaccines for Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Against Vibriosis and Pasteurellosis. *Journal of Applied Ichthyology*, 14, 159–162.
- Grisez L., R. Ceusters F. Oliever, 1991. The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. *Journal of Fish Diseases*, 14, 359-365.
- Grisez, L., Ollevier, F., 1995. Comparative serology of marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 4367-4373.
- Gross, K.A., Carson, J., 2007. Duration Of Protection Against *V. Anguillarum* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Vaccinated By Intraperitoneal Injection with a Water Based Vaccine. The European Association of Fish Pathologists, 13th International Conference of Fish and Shellfish Diseases, 17-22 September 2007. Grado Italy. (Book of Abstracts).
- Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø., 1999. Recent Developments in Fish Vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72, 203-212.
- Guerin Fauble, V., Rosso, L., Vigneulle, M. and Flandrois, P.J., 1995. The effect of incubation temperature and sodium chloride concentration on the growth kinetics of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum* related organisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 621-629.
- Gülmezoğlu, E., 1975. Bağışıklığın Temelleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 176s, Ankara.
- Hayran, M., Özdamar, O., 1995. Bilgisayar istatistik ve Tıp. HYB Medikal Yayın Birimi (MEBAR). 427-450s. Ankara.
- Hilbert, A.K., Fritzsche, U., Kissel, T., 1999. Biodegradable Microspheres Containing Influenza A Vaccine: Immun Response in Mice. *Vaccine*, 17, 1065–1073.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams & Wilkins, 485-487p.
- İlter, Ö., 1975. İmmunoglobuliner, İmmunoloji (II. Ulusal İmmunoloji Kongresi). 45-65s. İstanbul.
- Janeway, C.A., Travers, P., 1996. *Immuno Biology .The Immun System In Health and Disease Second Edition*, Current Biology Ltd. Garland Publishing Inc. New York and London.
- Ji-Yuan, T., Xiu-Qin, S., Xi-Guang, C., 2008. Formation and oral administration of alginate microspheres loaded with pDNA coding for lymphocystis disease

- virus (LCDV) to Japanese flounder. *Fish and Shellfish Immunology*, 24, 592-599.
- Johson, K.A., Amend, D.F., 1983. Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal incubation of salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 6, 473-476.
- Joosten, P.H.M., Trigueros, M.A., Sorgeloos, P., Rombout, J.H.W.M., 1995. Oral Vaccination of Juvenil Carp (*Cyprinus carpio*) and Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) with Bioencapsulated *Vibrio anguillarum* Bacterin. *Fish and Shellfish Immunology*, 5, 289 – 299.
- Joosten, P.H.M., Tiemersma, E., Threels, A., Caumartin-Dhieux, C., Rombout, J. H.W.M., 1997. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish and Shellfish Immunology*, 7, 471–485.
- Kent, M. L. 1982. Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fish using API 20E (Analytab Products) multitube test strips. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 39, 1725-1729.
- Klein, B.U., Siesenop, U., Böhm, K.H., 1996, Investigations on Transferable Antibiotic Resistance Through R-plasmids Between Obligate and Facultative Fish Pathogenic bacteria. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16(4), 138–141.
- Korun, J., Gökoğlu, M., 2007. *Listonella anguillarum* Isolated from Hatchery-Cultured Red Porgy *Pagrus pagrus* in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(6), 823-827.
- 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., 1997. Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) patojen bakterisi *Yersinia ruckeri*'ye Karşı Antikor Üretimi ve Tespiti Üzerinde Bir Araştırma. SDÜ Fen Bilimleri Enst. Su Ürünleri Müh. ABD Doktora Tezi. 117s. Isparta
- Larsen, J.L., Pedersen, K., 1997. Fish Vaccinology. In. (eds. Gudding R. Lillehaug. A., Midtlyng. P.J. Brown F.) *Developments in Biological Standardization*, Karger, 90, 391-400.
- Lavelle, E.C., Jenkins, P.G., Harris, J.E., 1997, Oral immunization of Rainbow trout with Antigen Microencapsulated in Poly(DL-lactide-co-glycolide) Microparticles. *Vaccine*, 15(10), 1070–1078.
- Li, J., Gao, D., Wang, Q., Wang, J., Wang, Q., 2005. Efficacy of *Vibrio anguillarum* antigen administered by intraperitoneal route in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (temminck et schlegel). *Aquaculture Research*, 36, 1104-1111.
- Lillehaug, A., 1989. Oral immunisation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis with vaccines protected against digestive degradation. *Journal of Fish Diseases*, 12, 6, 579-584.

- MacDonell M. T., Singleton, F.L., Hood, M.A., 1982. Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44,423-427.
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Nunez, S., Toranzo, A.E.,1999. Protection of Gilthead Seabream Against Pasteurellosis at The Larval Stages. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19 (4), 159 –161.
- Manfredi, E.T.,1986. Immunodiagnostic Methods for the Detection of Bacterial Kidney Disease in Salmonid Fishes. Doctor of Philosophy, University of Washington, 183p.USA.
- Maugeri T. L., E. Crisafi, L. Genovese, M. E. R. Scoglio, 1983. Identification of *Vibrio anguillarum* with the API 20E system. *Microbiologica*, 1,73-79.
- Mazoy, R., Osorio, C. R., Toranzo, A.E. , Lemos, M.L.,2003. Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Archives of Microbiology*, 179, 329–338.
- Michel, C., Dorson, M., Faivre, B., 1991. Opsonizing activity of anti- *Aeromonas salmonicida* antibodies after inactivation of complement in rainbow trout. *Annals of Veterinary Researces*, 22, 51-58.
- Midtlyng, P.J., 1997. Novel vaccines & New vaccination Strategies for Fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 17 (6), 239–243.
- Mikkelsen, H., Lund, V., Martinsen, L., Gravningen, K.,Schröder, M.B., 2007. Variability among *Vibrio anguillarum* O2 isolates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Characterisation and vaccination studies. *Aquaculture*, 266, 16–25.
- Minbay, A.,1988. İmmunoloji Ders Notları. Uludağ Üniv. Vet. Fak. Yay., 131s. Bursa.
- Moore, J.D., Ototake, M., Nakanishi, T.,1998. Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: the effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish and Shellfish Immunology* , 8, 393-407.
- Morrison, R.N., Nowak, B.F., Carson, J.,2001.The histopathological effects of a levamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Aquaculture*, 195, 23–33.
- Müftüoğlu, E., Bolaman, Z., Bilgin, O., Ertop, Ş., 1993. İmmunoloji. Saray Medikal Yayıncılık, 408s. Bornova-İZMİR.
- Nagae, M., Fuda, H., Hara, A., Kawamura, H., Yamauch, K., 1993. Changes in serum immunoglobulin M (IgM) Concentrations early development of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) Aquaculture determined by sensitive ELISA technique. *Comparative Biochemistry and Physiology*.,106 A, 69- 74.
- Nagae, M., Fuda, H., Una, K., Kawamura, H., Adachi, S. Hara, A., Yamauchi, K., 1994a. The effect of cortisol administration on blood plasma immunoglobulin M(IgM) concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Fish Physiology and Biochemistry*,13, 41-48.

- Nagae, M., Fuda, H., Hara, A., Saneyoshi, M., Yamauchi, K., 1994b. Changes in serum concentrations of immunoglobulin M(IgM), cortisol and thyroxine (T₄) during smoltification in the masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Fisheries of Science*, 60(2), 241-242.
- Nakanishi, T., Kiryu, I., Ototake, M., 2002. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. *Vaccine*, 20, 3764–3769.
- Nakamura, R.M., Voller, A., Bidwell, D.E., 1986. Enzyme immuno assays. heterogenous and homogenous systems. In: *Immunochemistry*. Vol1. (WEIR,D.M.,ed.). Blackwell Scientific Publications.Chapter 27,1-20p. Oxford, London.
- 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 and Shellfish Immunology*, 22, 206-217.
- Noga, E.J., 2000. *Fish Diseases: Diagnosis and Treatment*. Iowa State University Press, p p.367, Ames.
- O'Hagan, D.O., 1998, Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. *L Advanced Drug Delivery Reviews*, 34, 305–320.
- Olesen, N.J., 1991.Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterins by ELISA and passive immunization. *Journal of Applied Ichthyology*,7, 36-43.
- Pazos, F., Santos, Y., Magarinos, B., Bandin, I., Nunez, S., Toranzo, A. E., 1993. Phenotypic Characteristics and Virulence of *Vibrio anguillarum*-Related Organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept.1993, 2969-2976.
- Pedersen, K., Grisez, L., van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F., Larsen, J.L., 1999a. Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current Microbiology*, 38, 183-189.
- Pedersen, K., Kühn, I., Seppanen, J., hellström, A., Tiainen, T., Rimaila-Parnanen, E., Larsen, J.L., 1999b. Clonality of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish from the Scandinavian countries, Sweden, Finland and Denmark. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 337-347.
- Pelczar, M.I., Chan, E.C.S., Krieg, N.R., 1986. *Microbiology*. Bound in Singapura by Forg and Sons Printers Pte. Ltd.,918p.Singapura.
- Peggy, A.R., Francus-Floyd, R., 2002. *Vibrio Infections of Fish*. <http://edis.ifas.ufl.edu>. Erişim Tarihi: 01.06. 2002.
- Plumb, J.A., 1999. *Health maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes*. Iowa State University Press, pp.328, Ames, Iowa.
- Post, G., 1987. *Bacterial Diseases of Fishes*. *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, 41-43p.

- Quentel, C., Ogier de Baulny, M., 1995. Vaccination of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L., against vibriosis. *Aquaculture* 132, 125-131.
- Reed, A.P., Francis-Floyd, R., 1996. *Vibrio* infections of fish. <http://www//edis.ifas.ufl.edu> Erişim Tarihi: 01.06.1996.
- Roberson, B.S., 1993. Bacterial Agglutination. In: *Techniques in Fish Immunology*. (STOKEN, J.S., FLETCHER, T.C., ANDERSON, D.P., ROBERSON, B.S., Van MUISWINKEI, W.B., eds.). SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303, 15-24p. USA.
- Rodkhuma, C., Hironoa, I., Crosab, J.H., Aoki, T., 2005. Four Novel Hemolysin Genes Of *Vibrio anguillarum* And their Virulence To Rainbow Trout. *Microbial Pathogenesis* 39, 109–119.
- Romalde J.L., Toranzo, A.E., 1991. Evaluation of the API 20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 11, 147-149.
- Romalde, J.L., Luzardoalvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A.E., Blanco-Mendez, J., 2004. Oral Immunization using Alginate Microparticles As a Useful Strategy for Booster Vaccination Against Fish Lactococcosis. *Aquaculture*, 236, 119–129.
- Rombout, J.H.W.M., Joosten, E.H.M., 1997. Mucosal Immunity and Oral Vaccination of Fish. *Cell Biology & Immunology Group Wageningen Agricultural University*, 1 – 4.
- Russel Jones, G.J., 2000. Oral Vaccine Delivery. *Journal of Controlled Release*, 65, 49 – 54.
- Sanchez, C., Coll, J., Dominguez, J., 1991. One-step purification of the major rainbow trout. *Immunopathology*, 27, 383-391.
- Schill, W.B., Bullock, G.L., Anderson, D.P., 1989. Serology. In: *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*. (AUSTIN, B. And AUSTIN, D.A., eds.) 98-112.
- Schlotfeldt, H.J., Alderman, D.J., 1995, What Should I do? A Practical Guide for the freshwater, Fish farmer. *Supplied Bullentin, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (EAFP)* ,15(4),60.
- Schröder, M.B., Mikkelsen, H., Bordal, S., Gravningen, K., Lund, V., 2006. Early vaccination and protection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles against classical vibriosis. *Aquaculture*, 254, 46–53.
- Smith ,S.A., Gebhard, D.H., Housmann, J.M., Levy, M.G., Noga, E.J., 1993. Isolation, purification, and molecular-weight determination of serum immunoglobulin from *Oreochromis aereus* .*Journal of Aquatic Animal Health*, 5, 23-35.
- Simon, M., Mathes, A., Blanch, A., Engelhardt, H., 1996. Characterization of a Porin from the Outer Membrane of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, July 1996, 4182–4188.

- Singh, M., O'Hagan, D.O., 1998. The Preparation and Characterization of Polymeric Antigen Delivery Systems for Oral Administration. *Advances Drug Delivery Reviews*, 34, 285 – 304.
- Sommerset, I., Krossoy, 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*, Mar. 1986, 593-597.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Gram, L., 2000. Proliferation and location of *V. anguillarum* during infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 23, 423-427.
- 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.
- Tanrikul, T. T., H. Cagırgan, E. Toksen, (1996). Bacterial Diseases of Fish. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi (Balık Hastalıkları Özel sayı) Cilt: 20 Sayı: 34, Sayfa: 105-127.*
- Tanrikul, T.T., Çağırğan, H., Tokşen, E., 2004. Levrek'lerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) İzole Edilen *Vibrio* Türlerinin API 20E Yöntemiyle İdentifikasyonu. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 21(3-4), 243– 247.
- Tanrikul, T., 2007. Vibriosis as an Epizootik Disease of Rainbow Trout (*Onchorynchus mykiss*) in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(10), 1733-1737.
- Tatner, M.F., Horne, M.T., 1983. Susceptibility and Immunity to *Vibrio anguillarum* In: *Post-Hatching Rainbow Trout Fry, Salmo Gairdneri* Richardson 1836. *Developmental and Comparative Immunology*, 7, 465-472.
- Tatner, M.F., Horne, M.T. 1984. The Effects of Early Exposure to *Vibrio anguillarum* Vaccine on the Immune Response of the Fry of the Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, *Aquaculture*, 193-202.
- Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J., 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, September 2004, p. 403–431.
- Thorburn, M. A., Jansson, E.L.K., 1988. The Effects of Booster Vaccination and Fish Size on Survival and Antibody Production Following *Vibrio* Infection of Bath-Vaccinated Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 71, 285-291.
- Thuvander, A., Hongolo, I., Jansson, E., Sundquist, B., 1987. Duration of protective immunity and antibody titres measured by ELISA after vaccination of rainbow trout, *Salmo gairneri* Richardson, against Vibriosis. *Journal of Fish Diseases*, 10, 479-486.
- Thyssen, A., Ollevier, F., 2001. In vitro Antimicrobial Susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 Different Antimicrobial Agents. *Aquaculture* 200, 259 – 269.

- Tıravoğlu Demirtaş, Y., 2006. Gökkuşuğı Alabalıklarında Enterik Kızılağız Hastalığına Karşı *Yerinia ruckeri* Serotip I ve Saha Suşlarından Hazırlanan Monovalan ve Polivalan Aşuların Bağışıklık Güçlerinin Karşılaştırmalı İncelenmeleri. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi 89s. Aydın.
- 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., Karataş, S., Çolak, S., Akaylı, T., 1996a. Gökkuşuğı Alabalık (*O. mykiss* Wal., 1792) Yavrularında Görülen Frunkulosis Hastalığı Üzerine Bir Çalışma. İ.Ü. II.International Symposium On Aquatic Products. September. Abstracts, 64p. İstanbul.
- Timur, G., Timur, M., Karataş, S., Akaylı, T., 1996b. *Ichtyophonous hoferi* ile Enjekte Olmuş Kültür Levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) Görülen Pasteureollosis Hastalığı Üzerine Bir Çalışma. İ.Ü. II. International Symposium on Aquatic Products. September. Abstracts. 59p. Istanbul.
- Timur, G., Timur, M., 2003. Balık Hastalıkları. İstanbul Üniv. Su Ürünleri Yetiştiricilik Bölümü, 538s. İstanbul.
- 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.
- Toranzo , A.E., Barja, J.L., Hetrick, F.M., 1982. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in Eustarine and Fresh Waters. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 3,43-45.
- Toranzo, A.E., Magarinos, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture, 246, 37-61.
- Trust, T. J., 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. Annual of Review Microbiology,40, 479-502.
- Vervarcke, S., Ollevier, F., Kinget, R.,Michael, A., 2005. Mucosal response in African catfish after administration of *Vibrio anguillarum* O2 antigens via different routes. Fish and Shellfish Immunology, 18, 125-133.
- Vigneulle, M., Baudin Laurencin, F., 1991. Uptake of *V.anguillarum* bacterin in the posterior intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) after oral administration or anal intubation. Diseases of Aquatic Organisms,11, 85-92.
- Vila, A., Sanches, A., Tobio, M., Calvo, P., Alonso, M.J., 2002. Design of Biodegradable Particles for Protein Delivery. Journal of Controlled Release,78, 15 – 24.
- Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A., 1976. Enzyme immunsassays in diagnostic medicine. Bullentin Wold Health Organisation. 53, 55-65.

- Voller, A., Bidwell; D.E., Bartlett, A., 1979. The Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). A Guide With Abstracts of Microplate Applications. Dynatech Europe Broughouse, 123p. London.
- Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M., 2001. Immun Responses of Teleost Fishes. Austurian Veterinary Journal, 79,8.
- Williams, M. A., Hoole, D., 1995. Immunolabelling of fish host molecules on the tegumental surface of *Ligula intestinalis* (cestoda: Pseudophyllidea). International Journal for Parasitology, 25, 249-256.
- Woo, P.T.K., Bruno, D.W., 1999. Fish Diseases and Disorders: Volume 3; Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI publishing, pp.142. Newyork.
- Yardımcı, H., 1989. Koyunlarda *Brucella melitensis* İnfeksiyonlarının Aglutinasyon, Rose Bergal ve ELISA Testleri ile Ortaya Konması ve Bu Testlerin Teşhislerdeki Değişikleri Üzerine Bir Araştırma. Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. Mikrobiyoloji Ana Bil. Dalı. Doktora Tezi. Ankara.
- Yardımcı, H., Diker, S., Akan, M., 1994. Use of ELISA for Detection of *Campylobacter* Antibodies in Sheep. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. TÜBİTAK 18, 129-133.
- Yazıcı, M., 2004. Levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) Pasteurellosis' e karşı alternatif aşılama yöntemleri üzerine bir araştırma. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 78s. İstanbul.
- Yeh, M.K., Liu, Y.T., Chen, J.L., Chiang, C.H., 2002. Oral Immunogenicity of the Inactivate *Vibrio cholera* Wholecell Vaccine Encapsulated in Biodegradable Microparticles. Journal of Controlled Release, 82, 237-247.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Seçil EKİCİ
Doğum Yeri ve Yılı : Fethiye 24.10.1978
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dil : İngilizce



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Fethiye Lisesi 1992-1995
Lisans : Ankara üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü
1995-1999
Yüksek Lisans : S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği
Anabilim Dalı 1999- 2002

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü- 2004-2007
S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi 2007-

YAYINLARI (SCI ve diğer makaleler)

Hakemli Dergilerde Yayımlanan Teknik Not, Editöre Mektup, Tartışma, Vaka Takdimi Ve Özet Türünden Yayınlar Dışındaki Makale

1. Kubilay, A., Diler, Ö., Özen, M.R., Ekici, S., 2000-2001. Kültür Balıkçılığında Mikrobiyal İnfeksiyonlara Karşı Immunostimulantların Önemi ve Kullanımı. SDÜ. Eğirdir Su Ürünleri Fak. Dergisi, 7, 34-55.
2. Diler, Ö., Ekici, S., 2003. Farklı Tuzluluk ve pH Değerlerinin *Yersinia ruckeri* Suşlarının Büyüme Oranı Üzerine Etkisi. SDÜ. Eğirdir Su Ürünleri Fak. Dergisi, 9, 63-70.
3. Didinen, B.I., Diler, Ö., Ekici, S., Altun, S. *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının teşhisinde API ZYM kullanımı ve ATB Vet ile antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi.SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fak. dergisi Cilt 1, Sayı 2,64-70.

SCI, SSCI ve AHCI Dışındaki İndeks ve Özler Tarafından Taranan Dergilerde Yayımlanan Teknik Not, Editöre Mektup, Tartışma, Vaka Takdimi ve Özet Türünden Yayınlar Dışındaki Makale

1. Kubilay A., Altun S, Diler Ö., Ekici,S.2008. Isolation of *Flavobacterium columnare* from Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry in Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 8: 165-169.
2. Kubilay, A., Altun, S., Uluköy, G., Ekici, S., Diler, Ö., 2008. Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) againsts *Lactococcus garviae* using vaccine mixtures. Israeli Journal of Aquaculture, Bamidgheh. 60 (4), 265-270.
3. Kubilay, A., Altun, S., Didinen, B.I., Ekici, S., Diler, Ö., 2009. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* izolasyonu. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 15(5), 709-715.

Ulusal Toplantıda Sunularak Özet Metin Olarak Yayımlanan Bildiri

1. Diler, Ö., Ekici, S., 2003. Farklı Sıcaklık Değerlerinin *Yersinia ruckeri*'nin Büyüme Oranı Etkisi. Su Ürünleri Sempozyumu, Elazığ .
2. Uluköy,G., Kubilay, A., Dididnen, B.I., Ekici, S.,Aybal, N., Altun, S., Diler, Ö.,Mammadov, R., Gökkuşluğu Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)'larının Spesifik Olmayan İmmün Sistemi Üzerine *Urginea maritima* (L.) Baker Ekstraktının Etkilerinin Araştırılması. XIV. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu 4-7 Eylül 2007 Muğla.
3. Altun, S., Kubilay, A., Ekici, S., Didinen, B.I., Diler, Ö., mammadov, R., 2008. Gökkuşluğu Alabalıklarının (*O. mykiss*) polilactide- co glycolide ve sodyum alginate mikropartiküler kullanılarak *Lactococcus garvieae* karşı oral immunizasyonu. I. Alabalık Sempozyumu. SDÜ. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi.
4. Uluköy,G., Kubilay, A., Ekici, S., Altun, S., Kabak, T., Dulluç, A., Didinen, B.I., Diler, Ö., Mammadov, R., 2008. Gökkuşluğu alabalıklarının Spesifik olmayan immun sistemi üzerine *Sternbergia candida* ekstraktının etkilerinin araştırılması. I.Alabalık Sempozyumu. SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi.

Ulusal Toplantıda Poster, Sözlü Sunum ve Gösterim

1. Ekici, S., Diler, Ö., Altun, S., 2005. Kültürü Yapılan Balıklarda Görülen *Vibrio* Enfeksiyonları. XIII. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 01-04 Eylül 2005 Çanakkale.
2. Altun, S., Kubilay, A., Diler, Ö., Uluköy, G., Ekici, S., 2005. Gökkuşluğu Alabalıklarından (*Oncorhyncus mykiss*) İzole Edilen *Lactococcus garvieae* Suşlarının Antijenik Özellikleri ve Balıkların İmmunizasyonu.Ulusal Su Günleri, 28-30 Eylül 2005, Trabzon.
3. Altun, S., Kubilay, A., Diler, Ö., Ekici, S., Türkiye'de Kültürü Yapılan Alabalık (*Oncorhyncus mykiss*) Larvalarında *Flavobacterium columnare*'nin İzolasyonu. Ulusal Su Günleri 28-30 Eylül 2005, Trabzon
4. Kubilay A. , Altun S., Didinen B.I., Ekici S , Diler Ö., Uluköy G. Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhyncus mykiss*) işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* İzolasyonu. XIV. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu.4-7 Eylül 2007, Mugla.

5. Demir, O., Kubilay, A., Ekici, S., Günlü, A., Gümüş, E. Kültür Koşullarına Adapte Edilen Dağ Alabalığı (*Salmo trutta macrostigma* Dumeril, 1858) Larvalarında Ortaya Çıkan Enfeksiyonlar. XIV. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu 4-7 Eylül 2007 Muğla.
6. Diler, Ö., Didinen, B.I., Özkök, R., Ekici, S., Dulluç, A., Erol, G., 2007. Stoklama Yoğunluğunun Kerevit (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823) Yavrularının Gelişimlerine ve Yaşama Oranlarına Etkisi. Ulusal Su Günleri Sempozyumu, Antalya.
7. Ekici, S., Can, Y., Diler, Ö., Didinen, B.I., 2008. Bakteriyel Balık patojenlerine karşı Bazı Bitkisel Yağların Antibakteriyel Etkisi Üzerinde Bir Çalışma. I. Alabalık Sempozyumu. SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta.
8. Bahadır Koca, S., Ekici, S., Didinen, B.I., Diler, Ö., 2008. Gökkuşığı Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) Sindirim Sisteminden İzole Edilmiş Enzim Üreten Bakteriyel Flora. I. Alabalık Sempozyumu. SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta
9. Can, Y., Diler, Ö., Ekici, S., 2009. Akuakültürde İnfeksiyöz Balık Patojenlerine Karşı Bitkisel ürünlerin Kullanılması. XV. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 1-4 Temmuz 2009, Rize.
10. Bahadır Koca, S., Diler, Ö., Didinen, B.I., Ekici, S., Dulluç, A., 2009. Akuakültürde Probiyotiklerin Rolü. XV. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 1-4 Temmuz 2009, Rize.
11. Didinen, B.I., Ekici, S., Diler, Ö., Bahadır Koca, S., Dulluç, A., Astacidae Familyası Tatlı Su İstakozlarının Yetiştiriciliğinde Yavrularda gelişim ve Yaşama Oranlarını Etkileyen Faktörler. XV. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 1-4 Temmuz 2009, Rize.

Uluslararası Toplantıda Sunularak Özet Metin Olarak Yayımlanan Bildiri

1. Uluköy, G., Kubilay, A., Diler, Ö., Didinen, B.I., Altun, S., Mammadov, R., Ekici, S., Dulluç, A. Immunostimulant Effects of *Muscari commosum* (L.) Miller Plant Extract In Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). 13th International Conference of the EAFP 17 - 22 September 2007 diseases of fish and shellfish, Grado Italy.
2. Diler, Ö., Didinen, B.I., Bahadır Koca, S., Ekici, S., Erol, G., Dulluç, A., Koca, H., 2009. The Effects of Using a Commercial Probiotic on The Survival and Growth of freshwater Crayfish, *Astacus leptodactylus* Juveniles. 14th EAFP, International Conference, Prague. September 14-19, 2009. Diseases of Fish and Shell Fish.

Uluslararası Toplantıda Poster, Sözlü Sunum İle Gösterimleri

1. Diler, Ö., Didinen, B.I., Ekici, S., Altun, S., Diler, A. and Kubilay, A. Antagonistic Activities of Bacteria Against The Pathogen of Cold Water Disease, *Flavobacterium psychrophilum*. 13th International Conference of the EAFP. 17-22 September 2007 diseases of fish and shellfish. Grado Italy, Abstract Book.

2. Diler, Ö., Didinen, B. I., Ekici, S., Altun, S. Determination of Phenotypic Characteristics and Antimicrobial Susceptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* Strains Isolated from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) Farms in Turkey. Aquaculture Europe 07, October 24-27, İstanbul, Turkey.
3. Didinen, B. I., Bahadır Koca, S., Diler, Ö., Koca, H. U., Dulluç, A., Ekici, S., Gülle, İ., Özkök, R., 2008. Effect of Dietary Supplementation Commercial Probiotic (Protexin) on Growth and Survival of Narrow-Clawed Crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch.) THE Symposium on Interactions Between Social Economic and Ecological Objectives of Inland Commercial and Recreational Fisheries and Aquaculture.

Ulusal Kuruluşlarca Desteklenen Projede Görev Alma

1. Çipura (*Sparus aurata*), Deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*), ve Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) larının spesifik olmayan immün sistemi üzerine bazı geofit bitki ekstraktlarının etkilerinin araştırılması, TÜBİTAK - TOVAK proje No:104V126
2. Probiyotik Uygulamalarının *Astacus leptodactylus* Yavrularının Büyüme ve Yaşama Oranı Üzerine Etkisi (TÜBİTAK Proje No: 106O353)
3. Gökkuşığı Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) Polilactide-Co-Glycolide ve Sodium Alginate Mikropartiküleri kullanılarak *Lactococcus garvieae*' ye Karşı Oral İmmünizasyonu. (SDÜBAP, 1124-M-05)
4. Akdeniz'den avlanan Su Ürünlerinde *Vibrio* spp.nin Varlığının Belirlenmesi. (SDÜBAP,1123-M-05)
5. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* izalasyonu. (SDÜBAP, 1294-M-06)
6. Deniz Levreğinde Vibriosis'e karşı Aşı uygulamasının Bağışıklık sistemine etkisi. (SDÜBAP, 1386-D-06)
7. Bazı balık patojeni bakterilere fiziksel ve kimyasal çevre faktörlerinin etkisi.

Yüksek Lisans Tezi

1. Ekici, S., 2002. Bazı balık patojeni bakterilere fiziksel ve kimyasal çevre faktörlerinin etkisi. SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 73s, Isparta.