

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

**JAPON BALIKLARI (*Carassius auratus*, L.1758)' nda *Aeromonas hydrophila* ENFEKSİYONUNA KARŞI AŞILAMA
STRATEJİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Alican DEMİR

**Danışman
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2015**

©2015 [Alican DEMİR]

TEZ ONAYI

Alican DEMİR tarafından hazırlanan "**Japon balıkları (*Carassius auratus*, L.1758)' nda *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonuna karşı aşılama stratejilerinin geliştirilmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman	Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY
	Süleyman Demirel Üniversitesi
Jüri Üyesi	Yard.Doç. Dr. Gülşen ULUKÖY
	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Jüri Üyesi	Yrd.Doç. Dr. Seçil METİN
	Süleyman Demirel Üniversitesi

Enstitü Müdürü	Prof. Dr. Ahmet ŞAHİNER
-----------------------	--------------------------------------

TAAHHÜTNAME

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

Alican DEMİR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iiiv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Japon Balığının Sistematikteki Yeri	5
2.2. Japon Balığı Biyolojisi	5
2.3. Japon Balığı Yetiştiriciliği	5
2.4. <i>Aeromonas hydrophila</i> Enfeksiyonları	6
2.5. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'da Virülens Faktörleri ve Çevreyi Algılama	7
2.6. Hareketli Aeromonad Septisemi (MAS, Bakteriyel Hemorajik Septisemi, Kızıl Veba)	8
2.6.1. Hastalığın etiyolojisi	9
2.6.2. Klinik bulgular ve patoloji	10
2.6.3. Histopatoloji	11
2.6.4. Epizootiyoloji	11
2.6.5. Hastalığın kontrolü	11
2.7. Balıklarda Bağışıklık	12
2.7.1. Doğal bağışıklık (Spesifik olmayan savunma)	12
2.7.2. Kazanılmış bağışıklık (Spesifik savunma)	12
2.7.2.1. Humoral bağışıklık	13
2.7.2.2. Selüler bağışıklık	13
2.7.2.3. İmmunoglobulinler (Antikorlar)	14
2.8. Aşı	14
2.9. Balıklarda İmmunizasyon	16
2.10. Balık Aşılamada Temel Kurallar	17
2.11. Aşının Formülasyon Tipleri	17
2.11.1. Bakterinler	17
2.11.2. Zayıflatılmış canlı aşılar	18
2.11.3. DNA aşıları	18
2.11.4. Monovalant ve polivalant aşılar	18
2.12. Balık Aşılarında Kullanılan Adjuvantlar	18
2.12.1. Adjuvanların görevleri	19
2.12.2. Bazı önemli adjuvantlar	19
2.12.2.1. Balık aşılarında kullanılan işaret 1 adjuvantlar	20
2.12.2.2. İşaret 2 adjuvantlar veya immunostimulantlar	20
2.12.2.3. Freund's complete adjuvant (FCA, Freund'un tam adjuvantı)	20
2.12.2.4. Glukan	22
2.13. <i>Aeromonas hydrophila</i> ile İlgili Yapılan Aşı Çalışmaları	25
2.14. Japon Balığı ile İlgili Yapılan Aşı Çalışmaları	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30

3.1.1. Araştırmada kullanılan <i>Aeromonas hydrophila</i> suşları.....	30
3.1.2. Araştırmada kullanılan Japon balığı ve uygulama yeri.....	30
3.1.3. Araştırmada kullanılan su kaynağı ve suyun kalitesi.....	32
3.1.4. Araştırmada kullanılan yem	32
3.1.5. <i>Aeromonas hydrophila</i> aşılarının hazırlandığı kuruluş.....	32
3.1.6. Araştırmada kullanılan adjuvantlar	33
3.2. Yöntem	33
3.2.1. <i>A. hydrophila</i> suşları	33
3.2.1.1. Etken izolasyonu ve saflaştırılması.....	33
3.2.1.2. <i>A. hydrophila</i> suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi.....	33
3.2.1.3. Geleneksel bakteriyolojik testler ve API 20 NE testi	33
3.2.2. Aşının hazırlanması	33
3.2.2.1. Aşı suşunun seçimi... ..	34
3.2.2.2. Aşının üretimi	34
3.2.2.3. Sterilite testi.	35
3.2.2.4. Toksisite denemeleri	35
3.2.3. Aşıların uygulanması	35
3.2.4. Aşı etkinliğinin değerlendirilmesi.....	37
3.2.5. Epruvasyon uygulamaları	37
3.2.6. Bağışıklığın değerlendirilmesi	38
3.2.6.1. Aşılı balıklarda antikor seviyelerinin tespiti	38
3.2.7. Serum elde edilmesi	38
3.2.8. Aglutinasyon testi..	39
3.2.8.1. Antijen hazırlanması	39
3.2.8.2. Lam aglutinasyon testinin uygulanması.....	39
3.2.8.3. Mikro- aglutinasyon testinin uygulanması.....	39
3.2.9. İstatistiksel Hesaplamalar.....	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1. <i>Aeromonas hydrophila</i> Suşlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular	41
4.2. Aşı Suşunun Seçimi Amacıyla Yapılan Virülens Çalışmalarına Ait Bulgular	43
4.3. LD ₇₀ Dozunun Belirlenmesinde Kullanılan Testlerin Sonuçlarıyla İlgili Bulgular.....	44
4.4. Hazırlanan Aşının Toksitesinin Belirlenmesi Amacıyla Yapılan Denemelerin Sonuçları ile İlgili Bulgular.....	45
4.5. Deneysel Aşıların Sağladığı Bağışıklık Seviyesinin Sonuçlarıyla İlgili Bulgular.....	45
4.6. Deneysel Epruvasyon Uygulanan Balıkların Semptomları ve Kümülatif Mortalite Oranları.....	47
4.7. Lam Aglutinasyon Testi ile İlgili Bulgular.....	50
4.8. Mikroaglutinasyon Testi ile İlgili Bulguları	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ.	74

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

JAPON BALIKLARI (*Carassius auratus*, L.1758)' nda *Aeromonas hydrophila* ENFEKSİYONUNA KARŞI AŞILAMA STRATEJİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Alican DEMİR

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Bu çalışmada, *A. hydrophila* karşı aşılmasının Japon balığında (*Carassius auratus*, L.1758) oluşturduğu koruyucu etki araştırılmıştır. Bu amaçla monovalan aşı (*A. hydrophila*, AHS) immersiyon (im), intraperitoneal (ip) enjeksiyon; polivalan (*A. hydrophila* AHS, AHJ, AH1) aşı ip enjeksiyon ve monovalan aşı - glukan (100 µg/ml) ip enjeksiyon, Monovalan aşı - Freund's complete adjuvant (FCA) (1:1) ip enjeksiyon aşılırları ile Japon balıkları aşılanmıştır. Adjuvantsız aşılrlarla aşılanan balıklara 30. günde aşı tekrarı yapılmıştır. *A. hydrophila* karşı aşılamadan sonra 50. günde aşılanan gruplara ve kontrol gurubuna LD₇₀ doz (1 x 10⁵ cfu / ml) *A. hydrophila* ip enjeksiyonla verilerek epruvasyon uygulanmıştır. Aşılanan deneme grubu balıklarda 50. günde RPS değrleri polivalanla (%100), monovalan - FCA'la (%78.6), monovalan - glukanla (%67.9) ve monovalanla (%32) olarak tespit edilmiştir. Japon balığında en fazla virölense sahip olan 3 suştan hazırlanan karma aşının balıklarda çok iyi bir koruma sağladığı gözlenmiştir. *A. hydrophila* bakterisi kullanılarak farklı yöntemlerle immunize edilen balıklarda mikroaglutinasyon testinde antikor titresi; monovalan - FCA 1/32, polivalan 1/8, Monovalan ve Monovalan - glukan uygulanan gruplarda 1/4 dilüsyonunda aglutinasyon oluştuğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Carassius auratus*, *Aeromonas hydrophila*, Aşı, Mikroaglutinasyon, Epruvasyon, Freund's complete adjuvant (FCA), Glukan

2015, 74 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

THE DEVELOPMENT OF VACCINATION STRATEGIES AGAINST *Aeromonas hydrophila* INFECTION IN GOLDFISH (*Carassius auratus*, L.1758)

Alican DEMİR

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

Supervisor: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

In this study, the protective effect of vaccines against *A. hydrophila* was investigated in goldfish (*Carassius auratus*, L.1758). For this purpose, goldfish was inoculated with monovalent vaccine (one strain *A. hydrophila*, AHS) immersion, intraperitoneal (ip) injection, polyvalent (three strains *A. hydrophilic* AHS, AHJ, AH1) vaccine ip injection and monovalent - glucan (100 µg/ml) ip injection, Monovalent - FCA (1: 1) vaccines ip. Adjuvantless of vaccine used in the fish groups was carried out again booster vaccination in the 30 days. The control group and vaccinated fish groups were challenged by ip injection of LD₇₀ doses (1×10^5 cfu / ml) against *A. hydrophila* pathogen at the day 50 post-vaccination. RPS value of vaccinated fish groups were determined as the polyvalent (%100), monovalent - FCA (%78.6) to the monovalent - glucan (% 67.9), monovalent (% 32). Three different strains of the most virulence of *A. hydrophila* were prepared for the mix vaccine to fish which were observed very well in the protection of goldfish. *A. hydrophila* bacteria with using different methods to immunize the fish in antibody titer to test in microagglutination. Serum microagglutination test antibody titre was seen monovalent - FCA to 1/32, polyvalent 1/8, monovalent and Monovalent - glucan groups 1/4 dilution agglutination.

Keywords: *Carassius auratus*, *Aeromonas hydrophila*, Vaccine, Microagglutination, Challenge, Freund's complete adjuvant, Glucan

2015, 74 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırmada beni yönlendiren, bilgi ve tecrübesi ile karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Prof. Dr.Ayşegül KUBİLAY' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalar süresince yardım ve katkıları için Su Ürünleri Mühendisi Pınar Yıldırım' a teşekkür ederim.

3904-YL1-14 No' lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Eğitim ve öğrenim hayatımda hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan ve destekleyen aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Alican DEMİR
ISPARTA, 2015

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Denemede kullanılan Japon balıkları.....	31
Şekil 3.2. Deneme akvaryumlar	31
Şekil 3.3. Sterilite kontrolü yapılan steril aşılar	35
Şekil 3.4. Japon balıklarında kaudal venadan kan alımı	38
Şekil 4.1. Aeromonas izolet agarda yeşil renkli <i>A. hydrophila</i> kolonileri	42
Şekil 4.2. Hızlı teşhis kiti API 20NE ile yapılan <i>A. hydrophila</i> identifikasyonu.....	42
Şekil 4.3. Japon balıklarında <i>A. hydrophila</i> patojenine karşı aşı uygulamalarının epruvasyon (50. günden) sonrası ölen ve yaşayanların yüzde oranları.....	47
Şekil 4.4. Japon balıklarında <i>A. hydrophila</i> patojenine karşı aşı uygulamalarının epruvasyonu (50. günden) sonrası nispi hayatta kalma yüzdeleri (RPS)...	47
Şekil 4.5. Aşılamada 50. günden sonra deneme gruplarında kümülatif mortalite	49
Şekil 4.6. Deneysel enfeksiyon sonrası balıklarda a) abdomibal dropsi ve pulların kabarması, b) Abdomende hemoroji c) Kuyrukta hemoraji, d) Viseral organlarda erime.....	49
Şekil 4.7. Lam aglutinasyon testindeantikör ve antijenin oluşturduğu kümeler a) Çıplak gözle b) Işık mikroskobunda	50
Şekil 4.8. Mikroaglutinasyon test sonuçları.....	51
Şekil 4.9. Farklı aşılama yöntemleri uygulanarak immunize edilen Japon balıklarının kan serumunda oluşan aglutinin titrelerinin (Log2) günlük dağılımı	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>A. hydrophila</i> , <i>A. cavie</i> ve <i>A. sobria</i> türlerinin birbirinden karakteristik ayrımı	7
Çizelge 2.2. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın biyokimyasal özellikleri.....	10
Çizelge 2.3. Tıpta, ticari ve deneysel aşılar da kullanılan başlıca adjuvantlar.....	21
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>Aeromonas hydrophila</i> suşları.	30
Çizelge 3.2. Deneme süresince kullanılan Japon balığı ticari yemin kimyasal besin bileşenleri	32
Çizelge 3.3. Aşı deneme grupları ve uygulama şekilleri	37
Çizelge 4.1. <i>A. hydrophila</i> suşlarının klasik yöntemler ve API 20NE hızlı teşhis kitlerine göre fenotipik özellikleri ile ilgili bulgular (22 °C' de 24 saatlik inkübasyon)	43
Çizelge 4.2. <i>A. hydrophila</i> suşlarının virülens durumlarının belirlenmesi	44
Çizelge 4.3. LD ₇₀ oranının tespitinde deneysel enfeksiyon sonuçları	44
Çizelge 4.4. Hazırlanan aşıların toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçları	45
Çizelge 4.5. Japon balığında <i>A. hydrophila</i> patojenine karşı aşı uygulamalarının 50 günden sonra epruvasyonda ölen ve yaşayanların yüzde oranları, transforme edilmiş değerleri ve RPS oranları	46
Çizelge 4.6. Aşılama sonrası 50.günde deneysel epruvasyon sonucu deneme gruplarında kümülatif ölüm oranı (mortalite)	48
Çizelge 4.7. Farklı aşılama yöntemleri uygulanarak immunize edilen balıkların immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreler	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

cfu	koloni oluşturan birim(kob)
dk	dakika
FCA	Freund's complete adjuvant
g	gram
IU	internatiol unit
i.p.	periton içi
Kcal	kilokalori
kg	kilogram
l	litre
log	logaritma
m ³	metreküp
mg	miligram
ml	mililitre
nm	nanometre
O ₂	oksijen
PBS	phosphate buffered saline
pH	hidrojen iyonu konsantrasyonu
s	saat
sn	saniye
%	yüzde
°C	derece santigrat
µg	mikrogram (1/1.000.000g)
µm	mikrometre (10 ⁻³ mm)
USI	ultra sound irradiation (ultra ses ışınlama)

1. GİRİŞ

Akvaryumlar doğal ortamlarda görme olanağı bulamadığımız sualtı dünyasını izlememize olanak sağlayan sistemlerdir. Bitki, balık ve diğer koşulları kontrollü ve dengeli olarak tutulan akvaryumlar uzun bir süre sorun yaratmadan hizmet verirler (Hekimoğlu, 2006).

Akvaryumlar, saydam malzemelerden yapılan ve genellikle içerisine başta balık türleri olmak üzere omurgasızlar, kurbağalar, deniz memelileri ve sürüngenler gibi suda yaşayan hayvanlar ve bitkilerin sergilenmesi amacıyla kullanılan içi su (tatlı veya tuzlu su) dolu, boyutları küçük bir kavanozdan büyük su tanklarına kadar değişen cam yada yüksek dirençli plastik gibi yapılardır. Akvaryum kelimesi Latince su anlamına gelen “aqua” sözcüğü ile yer, bina anlamına gelen “-rium” son ekinin birleştirilmesiyle oluşmuştur (Alpbaz, 1993).

Süs balıkları yetiştiriciliği, su ürünleri sektörü açısından pek önemli görünmese de son yıllarda hızla gelişen bir sektör konumundadır (Alpbaz, 1993). Yılda 15 milyar Amerikan doları (USD \$) ticaret hacmi ve yıllık % 14 büyüme oranı ile tropik ve subtropik bölgelerdeki az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin ekonomik gelişimine önemli oranda katkıda bulunmaktadır (Tlusty, 2002; Anonim, 2011).

Uluslararası pazarda 30-35 tür piyasanın en önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Bunların başında Japon balıkları, canlı doğuranlar, neon tetra, zebra balığı ve diskus balıkları gelmektedir (Hekimoğlu, 2006).

Ülkemizde, iklim koşulları nedeniyle en fazla üretimi yapılan süs balığı türü, dış ülkelerde altın balık olarak tanınan Japon balığı olup, yetiştiriciliğinde yarı kontrollü üretim yöntemi kullanılmaktadır. İşletmelerdeki bu üretim artışına artışa paralel olarak tesislerde bakteriyel ve diğer balık hastalıklar nedeniyle önemli düzeyde verim ve ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır.

Türkiye’de akvaryum konusu 40-50 yıllık bir geçmişe sahiptir. Popüler anlamda akvaryum merakının 1980’li yıllardan sonra endüstriyel olarak gelişmeye başlamış ve su ürünleri üretimi içerisinde ekonomik önemi olan bir iş kolu haline gelmiştir. Ancak akvaryum balıklarının yurtiçi tesislerden ziyade genellikle ithalata yoluyla teminin edildiği gözlenmektedir. Bununla birlikte yurtiçi ve yurtdışı balık

transferlerinin en riskli yanının hastalık etkenlerinin beraberinde naklettiği bildirilmektedir (Alpbaz, 1993; 2000; Hekimoğlu, 1997; Çağırğan, vd., 1996).

Son yıllarda, uluslararası akvaryum balıkçılığının ticaret hacmine bakıldığında tahmin edilenden daha çok önem kazandığı bildirilmektedir. Akvaryum konusuna ülkemizde genel olarak bir hobi gözüyle bakılsa da günümüzde su ürünleri yetiştiriciliği açısından önemli bir sektör konumunda olduğu görülmektedir. Ülkemizde ise üretimi ve satışı en fazla yapılan akvaryum balığı Japon balıklarıdır.

Bu kayıpların ortadan kaldırılmasında hastalıkların tespiti ve mücadelelerinin etkin ve doğru yapılması şarttır. Bu bağlamda hastalıklarla mücadelede en etkin yollardan biri hastalıklar ortaya çıkmadan önce aşı uygulamalarının yapılmasıdır. Ülkemizde sıklıkla görülen *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonları Japon balıklarında da son yıllarda ciddi seviyede ölümlere yol açmaktadır. *A. hydrophila*'ya karşı iyi bir koruma sağlanması ve bu aşının ticari ürün halinde ülkeye sunulması önem taşımaktadır.

Japon balıkları, Avustralya kıtası dışında bütün dünyaya dağılmış bulunan sazangiller ailesi içinde yer alır. Günümüzde pek çok ülkede bu balıkların altın parlaklığında olmaları nedeniyle “Goldfish” denmektedir. Japon balıkları Avrupa ve ülkemizde yavaş akan sularda, göllerde bulunmaktadır (Demirsoy, 1993). Genellikle ılık suları tercih etmekle birlikte 5-30°C su sıcaklığı aralığına tolerans gösterirler (Altınköprü, 1983; Alpbaz, 1984).

Akvaryumlarda yetiştirilen balıkların, kendi doğasına uygun çevresel koşullar tutulmasına özen gösterilmesi gerekmektedir. Akvaryumlarda balıkların çok yoğun bulunması, akvaryum suyunun çabuk bozulmasına neden olduğu gibi suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerin değişmesine koşulların bozulmasına yol açar. Böyle akvaryumlarda hastalıklar kolayca ortaya çıkarak yayılır ve diğer duyarlı balıklarında hastalanmasına ve hatta ölümlere neden olur (Arda vd., 1995).

Akvaryum balıkları yetiştiriciliğinde zaman zaman ölümlere ve ekonomik kayıplara neden olan bakteriyel ve paraziter hastalıkların klinik belirtilerinin tanımlanması, sağaltımlarının yapılması oldukça önem taşıyan titiz uğraşı gerektiren bir konudur.

Akvaryum balıkları üretimi ve pazarlaması çok hızlı gelişen bir sektör haline gelmiştir. Birçok gelişmiş ülkede balıkların akvaryum faaliyetleri yaygın olarak

yapılmaktadır. Bu nedenle başarılı bir akvaryum balığı yetiştiriciliği ve üretiminde hastalıklar büyük bir tehlike oluşturur. Çoğu bakteriyel hastalığın kontrolünde antibiyotik kullanımının yararlı olması ile birlikte antibiyotik dirençliliğinin gelişmesi, hastalıkların nükset etmesi gibi durumlar karşısında ilave uygulamalar gerekmektedir. Bu nedenle akvaryum balıklarının hastalıklarında da profilaksi amacı ile aşılar gelecekte büyük bir önem arz edecektir.

Kültür balıklarında uygulanan bazı profilaktik kurallar akvaryum balıkları içinde geçerlidir. Su kalitesinin bozulması, uygun olmayan yemleme, akvaryuma fazla sayıda balık konulması gibi olumsuz koşullar vücut direncinin azalmasına neden olur. Hastalık çıksın veya çıkmasın, akvaryumlar belli periyotlarda iyi bir şekilde dezenfeksiyona tabi tutulmalıdır. Akvaryum balığı yetiştiren işletmelerdeki hijyen kültür balığı yetiştiren işletmelere göre daha önemlidir. Hijyenik koşulların tam olarak yerine getirilememesi akvaryum balıklarına önemli zararlar verir. Özellikle, büyük akvaryum balığı yetiştiricileri devamlı sağlık kontrolleri için özel bölümler kurarak, hastalıklara karşı gerekli önlemleri almalıdır. Akvaryum balıklarında sık rastlanan, balıkların sağlıklarını olumsuz etkileyen, yüksek ölümlere ve ekonomik kayıplara neden olan bakteriyel hastalıklar sıkça görülmektedir. En önemli bakteriyel hastalıklar *Columnaris*, *Aeromonas* ve *Pseudomonas* enfeksiyonları, bakteriyel solungaç hastalığı, ülser hastalığı ve balık tüberkülozudur (Arda vd., 1995).

Antalya da ticari akvaryum balığı yetiştiriciliği yapan bir işletmeden hasta Japon balıklarından (*Carassius auratus*), *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* bakterileri izole ve identifiye edilmiştir (Korun ve Toprak, 2007).

Farklı balık türlerinde *A. hydrophila* tarafından meydana gelen enfeksiyonları önlemek için deneysel aşı incelenmiş olmasına rağmen uygun bir ticari aşı geliştirilmesi grup içinde mevcut mezofilik hareketli *Aeromonas* türlerinin büyük fenotipik ve serolojik heterojenite göstermeleri nedeniyle engellenmektedir. Aslında yaklaşık 100 serotip hareketli *Aeromonas* grubu içinde profilaktik önlemler; iyi bir hijyen, yüksek stok yoğunluğundan kaçınma, elle müdahaleyi en aza indirmek gibi iyi korumayı sağlamıştır.

Aeromonas hydrophila yıllardır su ürünleri sektöründe kayıplara neden olan önemli bir patojendir. Tatlı sularda fırsatçı bir patojen olarak bilinmesi nedeni ile akuakültürde yaygın olarak hastalıklara sebep olabildiği gibi tatlısu akvaryum

sistemlerinde de bu patojenden kaynaklanan hastalıklara sıkça raslanmaktadır. Akuakültürde *A. hydrophila*'ya karşı geliştirilen deneysel aşılar çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Lamers vd., 1985; Baba vd., 1988; Leung vd., 1997; Rahman ve Kawai, 2000). Ancak akvaryum balıklarında kullanılan aşılar ile ilgili çalışmalar oldukça az sayıdadır (Navot vd., 2011; Thanga vd.,2013).

Japon balıklarının hızlı adaptasyon yeteneği, dayanıklı yapısı ve su sıcaklığı değişimine toleranslı olması gibi nedenlerle akvaryum sektöründe önemli ve popüler bir yeri olan türdür. Japon balıklarının başlıca problemlerinden biri *A. hydrophila*'nın sebep olduğu hareketli aeromonas sepsisemi hastalığıdır.

Bu araştırmada, Japon (*Carassius auratus*), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve sazan (*Cyprinus carpio*) balıklardan izole edilen *A. hydrophila* suşları ile adjuvantlı ve adjuvantsız deneysel aşılar hazırlanarak Japon balığına immersiye ve enjeksiyon aşılama yöntemleriyle aşılanmış ve aşının etkinliği hesaplanmıştır. Ayrıca hazırlanan aşılardan etkinliği nispi hayatta kalma yüzdesiyle (RPS) ve immunize edilen balıkların kan serumlarında antikor varlığı mikroaglutinasyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Böylece bu çalışmada hazırlanan aşılardan balıkta koruyucu etki oluşturabilmesi konusu araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Japon Balığının Sistematikteki Yeri

Japon balığı bilimsel olarak isimlendirilmesi ilk olarak 1758 yılında Linnaeus tarafından yapılmıştır. Japon havuz balığı olarak isimlendirilen *Carassius auratus*'un sistematikteki yeri aşağıda belirtildiği gibidir (Ekingen, 1988).

Alt Sınıf	: Actinopterygii
Takım	: Cypriniformes
Familya	: Cyprinidae
Cins	: <i>Carassius</i>
Tür	: <i>Carassius auratus</i>

2.2. Japon Balığı Biyolojisi

Japon balığı 4-24°C arasındaki farklı su sıcaklıklarında yaşamlarını sürdürerek bildikleri tespit edilmiştir (Hunnam, 1983). Bu balıkların havuzlarda buzun altında dahi yaşadıkları ve kötü şartlara dayanıklı oldukları saptanmıştır (Sweeney, 1990; Mills vd.,1993). Japon balığının doğal olarak bulunduğu göllerde yapılan incelemelerde çözünmüş oksijen miktarının 8.7 mg/l, pH değerinin ise 7.1-9.7 olduğu belirtilmiştir (Wang, 1989). Düşük pH şartlarının bu balıkların hareketlerinde olumsuzluklar meydana getirdiği tespit edilmiştir (Garg vd., 1992). Japon balığının 2-4 yaşında eşeyssel olgunluğa ulaştığı fakat bu balıkların en verimli dönemlerinin 3-4 yaşları arasında olduğu bildirilmiştir (Altınköprü, 1987; Mertlich, 1987; Çelikkale, 1988; Demirsoy, 1993). Kaliteli yemlerle günde 1-2 defa beslemenin yeterli olduğu (Mertlich, 1987; 1989), verimli yumurta alımı içinse çok iyi yemleme yapılmasının gerekli olduğu belirlenmiştir (Mertlich, 1989).

2.3. Japon Balığı Yetiştiriciliği

Japon balıklarının üretiminde 2x2 m veya 2x3 m ebatlarında derinliği 30-40 cm olan bitkilendirilmiş toprak havuzlar kullanılabilir (Alpbaz, 1991). Tarihi Çin kayıtlarına göre kırmızı renkli ilk Japon balığı M.S. 2. yüzyılda keşfedilmiştir. Onbeşinci yüzyılda ise kavanoz tipi kaplarda evlere alındığı kabul edilmektedir. Buradan da anlaşıldığı gibi bir süs balığı olarak en eski ele alınan balık türlerinden biri olduğu

rapor edilmiştir. Son 2-3 yüzyılda yapılan ıslah çalışmaları sonucu pek çok varyete geliştirilmiştir (Alpbaz, 2000).

Akvaryumda bulunan balıklardan bazılarının karınlarının aşırı şekilde şişmiş olması bu balığın yumurtalı olduğunu gösterir. Bu balıklarda anüs içe doğru çökük olur. Cinsel olgunluğa erişmeleri akvaryum koşullarına göre değişir. Isısı sabit tutulan ve 22-25 °C olan akvaryumlarda yıl boyu, dışarıda açık havuzlarda ise ilkbahar aylarında üretilirler. Bazı başarılı Japon balığı üreticileri balıklara kondisyon kazandırmak için balık eti verilmesini önermektedir. (Alpbaz, 2000).

2.4. *Aeromonas hydrophila* Enfeksiyonu

Aeromonas hydrophila genellikle çeşitli nedenlerle stres altında kalan balıklarda hemorajik septisemi ile seyreden sistemik bir hastalıktır. *A. hydrophila*'nın hemorajik septisemi hastalığının etkeni olarak ilk keşfinden bu yana, *A. hydrophila* çok çeşitli tatlı su balığından patojen olarak izole edilmiştir. Bu bakteri birçok tatlı su balığından ve ara sıra deniz balıklarından, sürüngenlerden ve insanlardan izole edilmiştir. Bununla birlikte en önemli hastalık kültür tatlı su balıklarında meydana gelir. Bakteri, tatlı sulara yayılmış bir biçimde, organik materyal içeren dip sedimentlerinde ve balığın bağırsaklarında bulunur (Snieszko ve Axelrod, 1971; Shotts vd., 1980; Roberts ve Shepherd, 1986; Austin ve Austin, 1987; Roberts, 1993; Bruno ve Poppe, 1996; Camus vd., 1998; Aoki, 1999; Cipriano, 2001; Timur ve Timur, 2003). Bununla birlikte, Hazen vd., (1978) tatlı suyun denize karıştığı acı su sistemlerinde ve çok tuzlu sular hariç her tuzlulukta *A. hydrophila*'nın bulunduğunu bildirmişlerdir. Birçok kültür ve doğadaki tatlı su balıkları *A. hydrophila*'nın neden olduğu enfeksiyona duyarlıdır: kahverengi alabalık (*Salmo trutta*), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), ayu balığı (*Plecoglossus altivelis*), sazan balığı (*Cyprinus carpio*), kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*), Japon yılan balığı (*Anguilla japonica*), Amerikan yılan balığı (*Anguilla rostrata*), Japon balığı (*Carassius auratus*) ve tilapia (*Oreochromis nilotica*) (Snieszko ve Axelrod, 1971; Austin ve Austin, 1987; Roberts, 1993; Aoki, 1999; Timur ve Timur, 2003). Bakteriyel septiseminin klinik bulgularını gösteren balıklarda *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* patojenleri izole edilmiştir. Fakat bu türlerden en çok izole edilen *A. hydrophila* olmuştur (Roberts, 1993; Aoki, 1999; Cipriano, 2001; Timur ve Timur, 2003). Genellikle türler arasındaki ayrım

karbonhidratlar ve diğer biyokimyasal reaksiyonlar temel alınarak yapılır. *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* çeşitli ayırım faktörleri temel alınarak kolaylıkla birbirinden ayırt edilir. *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* türlerinin birbirinden ayırımı Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir (Koneman vd., 1992; Roberts, 1993).

Çizelge 2.1. *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* türlerinin birbirinden karakteristik ayırımı (Koneman vd., 1992, Roberts, 1993).

Karakteristik	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A.sobria</i>
Hareket	+	+	+
Eskulin hidrolizi	+	+	-
KCN broth'da üreme	+	+	-
Arginin dihidrolizi	+	+	-
Lizin dekarboksilaz	+	-	+
Arabinoz kullanımı	+	+	-
Salicin fermantasyonu	+	+	-
Asetoin üretimi (VP test)	+	-	+
Glukozdan gaz üretimi	+	-	+
Sistinden H ₂ S üretimi	+	-	+
B-hemoliz	+	-	+
(+: pozitif, (-): negatif			

Hareketli aeromonadlar balık patojeni olarak bilinse de bu bakterilerin sağlıklı balıkların normal bağırsak mikroflorasında ve vücudun dış yüzeyinde de bulunduğu ve izole edilebilmektedir (Sanders ve Fryer, 1988; Roberts, 1993, Aoki, 1999; Karatas ve Candan, 2003). Bu nedenle bu bakterilerin varlığı kendi başına hastalık etkeni değildir ve çoğunlukla bu bakterilerin neden olduğu hastalık çıkışlarına etki eden faktör stres olarak düşünülür (Snieszko ve Axelrod, 1971; Shotts vd., 1980; Austin ve Austin, 1987; Roberts, 1993; Camus vd., 1998; Aoki, 1999; Noga, 2000; Cipriano, 2001; Timur ve Timur, 2003). Bu stres faktörleri genellikle, intensif yetiştiriciliği yapılan balıklarda kötü çevresel ve fizyolojik parametreler olarak bildirilir. Manipülasyon, yüksek sıcaklık, su sıcaklığındaki ani değişiklikler, nakil, düşük çözünmüş oksijen, yüksek amonyak ve nitrit seviyesi, besin tuzlarının azlığı gibi stres faktörleri ve mantar veya parazitik enfeksiyonlarına karşı duyarlılığı artırır.

Hastalığın şiddetini, bakteriyel virulans, bir balık popülasyonundaki stres çeşidi ve derecesi, konakçının fizyolojik durumu ve spesifik balık popülasyonu içindeki doğal

genetik direnç gibi bir takım faktörler etkiler (Roberts, 1993; Aoki, 1999; Cipriano, 2001).

Aeromonas enfeksiyonları her yaştaki balıkta görülür fakat kayıplar genellikle yavru balıklarda daha şiddetlidir. Hastalık çıkışı genellikle ilkbaharda su sıcaklığının yükseldiği dönemde gerçekleşir (Roberts, 1993; Camus vd., 1998; Aoki, 1999; Timur ve Timur, 2003). Kontrollü laboratuvar şartları altında De Figueredo ve Plumb (1977) hasta balıklardan izole edilen hareketli aeromonad suşlarının, sudan izole edilen suşlardan daha virulent olduğunu bulmuşlardır.

2.5. *Aeromonas hydrophila*'da Virülens Faktörleri ve Çevreyi Algılama

Aeromonas spp. gram negatif çubuk şeklinde *Vibrionaceae* ailesine mensup olup, memeliler ve balıkların önemli ve fırsatçı patojenlerinden birisidir. Bakteri fosfolipid kolesterol açıltransferaz (MacIntyre ve Buckley, 1978), lipaz (Anguita vd., 1993) ve serine proteaz (Whitby vd., 1992) içeren bir dizi virülens mekanizmalarına sahiptir.

Aeromonas'ların değişik virülens faktörleri ve toksijenik mekanizmaları vardır. Bunlar arasında, enterotoksinler, hemolizinler, hemagglutininler, endotoksinler, yüzey adezinleri (fimbria) ve çeşitli proteazlar bulunmaktadır (Baylan ve Yılmaz, 2004). *A. hydrophila* ekzoproteaz aktivitelerinden serine proteaz ve metalloproteaz aktivitelerinin her ikisini de oluşturabildiği gibi hem moleküldeki azot kökü taşıyan kazeini parçalama hem de jelatini eritme kabiliyetine sahiptir (Swift vd., 1999).

2.6. Hareketli Aeromonad Septisemi (MAS, Bakteriyel Hemorajik Septisemi, Kızıl Veba)

Tatlı, tuzlu, ılık ve soğuk sularda bulunan bütün balıklar bu hastalığa hassastır. Tüm dünyada yaygın olarak görülür. Havuzlarda kültürü yapılan sazan, Japon balığı, yayın balıklarının bir hastalığıdır.

Aeromonas hydrophila onun sinonimleri olan *A. formicans*, *A. liquefasciens*, *A. punctata* balıklarda hemorajik septiseminin etkeni olarak tanınmıştır. Buna ek olarak hareketli aeromonadlar kurbağalar, kaplumbağalar ve yılanlarda hastalık oluşturur. Bunun ötesinde, hareketli aeromonadlar insanlarda gastro-enteritis, yara enfeksiyonları ve septisemi vakalarında rol alırlar.

Tatlı sular özellikle organik maddece zengin sular normal olarak *A. hydrophila*'nın habitatı olarak kabul edilmektedir. Fakat son zamanlardaki bulgular balıklarda barsak florasında da bulunabileceğini göstermektedir.

Hareketli aeromonadlardan *Aeromonas caviae* ve *Aeromonas sobria*'nın da arasına hasta balıklardan izole edildiği bildirilmektedir. Eski ve spesifik bir isim olmayan bakteriyel hemorajik sepsisemi adı bugün bütün Gram negatif bakterilerin balıklarda neden olduğu sistemik enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Hareketli aeromonad sepsisemi adı, yakın bir geçmişte ilk olarak 1982 yılında kültür yayın balıklarında (*Ictalurus punctatus*) kullanılmıştır. Bu isim genel olmayıp, kesin ve tarif edici bir isim olmuştur.

Bakteriyel sepsiseminin klinik bulgularını gösteren balıklarda *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* ve *Aeromonas sobria* izole edilmiştir. Fakat bunlardan en çok izole edilen *A. hydrophila* olmuştur. Bu organizma *Rhabdovirus carpio* enfeksiyonundan veya parazitik enfestasyona uğramış sazan balıklarında ve üreme döneminde ölen salmonid balıklarda sekonder enfeksiyon etkeni olarak bulunmuştur. Bu nedenle motile aeromonadların primer patojen olup olmadıkları konusunda şüphe edilmektedir. Ancak, bu enfeksiyon etkeni hangi sebeple olursa olsun primer viral veya primer parazitik enfeksiyondan sonra konakçıyı istila edip şartları derhal kötüye götürerek ölümün baş sorumlusu olmaktadır (Arda vd., 2002; Candan ve Karataş, 2010).

2.6.1. Hastalığın etiyolojisi

Aeromonas hydrophila Gram-negatif, 0.3-1.0 X 1.0-3.5 µm boyutunda fermantatif, tek polar flagellaları sayesinde hareketli çubuklardır. TSA besiyerinde 20-25 °C de 24-48 saat inkübe edildiklerinde krem rengi, yuvarlak, hafif kabarık koloniler geliştirirler. Sitokrom oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitifdir. *Aeromonas hydrophila* O/129 vibriostat testine karşı dirençlidir, nitratları nitrite indirger, %6 sodyum klorid (NaCl) içeren besiyerinde üremez ve genellikle amfisilin ve karbenisilin'e karşı dirençlidir. DNA'nın Guanin+Sitozin (G+C) oranı %57-63'tür. Diğer karakteristik özellikleri Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Sanders ve Fryer, 1988; Roberts, 1993; Aoki, 1999; Austin ve Austin, 1999; Timur ve Timur, 2003).

Çizelge 2.2. *Aeromonas hydrophila*'nın biyokimyasal özellikleri (Austin ve Austin, 1987, Sanders ve Fryer, 1988, Roberts, 1993, Aoki, 1999, Austin, 1999)

Özellik	Cevap	Özellik	Cevap
Gram	-	Sitrat kullanımı	D
Hareket	+	Nişasta hidrolizi	+
Oksidaz	+	Asit üretimi	
Katalaz	+	Arabinoz	+
MR	-	Fruktoz	+
VP	+	Galaktoz	+
İndol	+	Glukoz	+
Arginin dihidrolaz	+	Gliserol	D
Lizin dekarboksilaz	D	İnositol	-
Ornitin dekarboksilaz	-	Laktoz	D
B-galaktosidaz	+	Maltoz	+
H ₂ S	+	Mannitol	+
5-37°C'de üreme	+	Ramnoz	-
%6 tuzlulukta üreme	-	Salicin	+
B-Hemoliz	+	Sorbitol	-
Eskulin hidrolizi	+	Sukroz	+
Jelatin hidrolizi	+	Trehaloz	+
Üreaz	-	Ksiloz	-
(+: pozitif reaksiyon, (-): negatif reaksiyon, D: değişken			

2.6.2. Klinik bulgular ve patoloji

Hasta balıkların yüzgeçlerinde ve vücut yüzeyinde deride yaygın hemorajik odaklar görülür ve bu nedenle bu hastalık genellikle kırmızı yüzgeç hastalığı olarak isimlendirilir. Ülseratif deri ve kas lezyonları, yüzgeçlerde nekrotik lezyonlar, ekzoftalmus, yüzgeç ve kuyrukta erime görülür. Pullar gevşeyerek düşebilir. İç organlarda hemoraji ve karın boşluğunda kanlı sıvı bulunur. Dalak ve böbrek genişlemiştir (Snieszko ve Axelrod, 1971; Shotts vd., 1980; Austin ve Austin, 1987; Roberts, 1993; Bruno ve Poppe, 1996; Camus vd., 1998; Aoki, 1999; Noga, 2000; Cipriano, 2001; Timur ve Timur, 2003; Timur vd., 2003; Güvener ve Timur, 2005).

Birçok vakada ölüm sonrasında görülen başlıca bulgu iç organlarda hiperemi, mesenteriumda, visceral ve parietal peritonda hemorajidir. Hastalığın şiddetli görüldüğü vakalarda tüm iç organlar parlak kırmızı renkte olabilir. Dalak genişlemiş ve kiraz kırmızısı rengindedir. Genişlemiş böbrekte genellikle nekroz görülür (Snieszko ve Axelrod, 1971; Roberts, 1993; Aoki, 1999; Timur ve Timur, 2003).

Lokal olarak kas nekrozu (myonecrosis) görülebilir. Genellikle kas nekrozu yüzeyseldir ve ülserlerle ilişkilidir veya rektal prolapsus sonucunda anüs etrafında görülür. Deri lezyonları dermisde ödem şeklinde başlar. Daha sonra epidermiste ülserasyon ve en son olarak da kasa kadar inen hemorajik nekroz görülür (Snieszko ve Axelrod, 1971; Roberts, 1993; Aoki, 1999; Timur ve Timur, 2003).

2.6.3. Histopatoloji

Histolojik olarak bu durum yaygın fokal nekrotik lezyonlara neden olan septisemi şeklinde karakterizedir. Hiperemi ve kapillar hemoraji ve çok sayıda makrofajın ve diğer lökositlerin kapillar damarlardan dokulara göçü görülür. Lezyonlar genellikle akut fokal nekroz odakları veya zonları şeklindedir ve özellikle hemopoietik dokunun tamamen tahrip olduğu dalak ve böbreğin yanı sıra karaciğerde de görülürler. Böbreklerde tübül epitelyum hücreleri genellikle lumene dökülür ve böbrek dokusunda çoğunlukla nekrotik tübüller ve hemopoietik doku ile sarılmış glomeruluslar kalır. Bağırsakları örten mukoza genellikle nekrotik olup geniş bir alanda sindirim kanalı lumenine dökülmüştür (Snieszko ve Axelrod, 1971; Roberts, 1993; Aoki, 1999; Timur ve Timur, 2003; Timur vd., 2003; Güvener ve Timur, 2005).

2.6.4. Epizootiyoloji

Etkenin tatlı sularda yaygın bir şekilde bulunduğu bildirilmektedir. Böyle sulardaki akuatik bitki ve balıklarda her an hastalık için hazır bulunmaktadırlar. Hareketli aeromonadlara bağlı olarak gelişen çeşitli sendromlar hastalığı başlatan uyarıcıya bağlı çok değişiklik gösterirler. Sazanlarda genel tablo ister havuzlarda yetiştirilen sazan olsun, isterse süs balığı olan Japon balığı olsun, hastalık çıkışı ilkbaharda su sıcaklığının yükseldiği, balık metabolizmasının hızlandığı ve sudaki besin maddesi seviyesinin ve dolayısıyla balığın beslenmesinin arttığı dönemde gerçekleşir.

2.6.5. Hastalığın Kontrolü

Aeromonas hydrophila enfeksiyonunun kontrolü bakterinin konakçıya invazyonun kolaylaştıran faktörlerin kontrol altına alınmasıyla sağlanabilir. Hastalık çıktığında özellikle havuz balıklarında çoğu kez hastalığın çıkışına neden olan stres faktörlerini veya primer enfeksiyonu belirlemek mümkün olmadığı gibi su akıntısını, stoklama yoğunluğunu kolayca değiştirmek çoğu zaman mümkün olmaz. Hastalık çıkışından sonra tedavi oral antibiyotik tedavisi şeklinde uygulanmaktadır. Kullanılan antibiyotikler arasında Kloramfenikol, nufirpirinol, oksitetrasiklin ve sulfamerazin sayılabilir. Balıklar hastalık döneminde yem alıyorsa ilaçlar genellikle etkilidir (Timur ve Timur, 2003).

A. hydrophila'nın antibiyotik tedavisinde birçok diğer bakteriyel enfeksiyonlarda olduğu gibi en büyük problem hemen antibiyotiklere karşı direncin oluşmasıdır. Antibiyotikler sazan kültüründe koruyucu (profilaktif) olarak hemorajik septiseminin gerek çevresel problemlerden gerekse yetiştiricilik uygulamasındaki değişikliklerin balıklarda oluşturduğu strese kaynaklandığı için yılın belli dönemlerinde kullanılmaktadır. Sazanlarda dropsi görüldüğünde ölü balık veya çok hasta olanlar toplanmalı, sayılmalı ve derin bir çukura gömülmeli veya yakılmalıdır. Hasta balıkların havuzları boşaltıldıktan sonra kireçlenmeli ve kış döneminde kurumaya terk edilmelidir. Profilaksi için aşılama başka bir alternatif oluşturur. Bu amaçla polivalan ticari aşılarda geliştirilmesi gerekir. Aşı yapımı ile ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır. Bununla beraber ticari ürünler henüz ortaya çıkmamıştır (Timur ve Timur, 2003).

2.7. Balıklarda Bağışıklık

Omurgalıların bağışıklık; doğal (primer) ve kazanılmış (adaptive) bağışıklık olmak üzere iki tiptir. 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.

2.7.1. Doğal bağışıklık (Spesifik olmayan savunma)

Primer bağışıklık, doğuştan savunma mekanizmalarına dayanır ve vücuda girebilecek her türlü yabancı maddeye karşı non - spesifik olarak çalışır. Bu savunma mekanizması (spesifik olmayan bağışıklık sistemi) fagositik hücreleri, interferonları ve vücutta bulunan lizozim, C-reaktive protein, aglutinin ve lizin gibi maddeleri içerir (Ellis,1978; 1988; 1989; Busch, 1981; Pelczar vd., 1986; Trust, 1986; Janeway ve Travers,1996).

2.7.2. Kazanılmış bağışıklık (Spesifik savunma)

Kazanılmış bağışıklık canlıda sonradan kazanılan bir durum olup ve vücudun tepkime verme yeteneğine bağlı olarak patojene karşı, spesifik reaktif lenfosit (sellüler bağışıklık) veya serum antikorlarının (humoral bağışıklık) oluşmasıdır (Ellis,1978; 1988; 1989; Busch, 1981; Pelczar vd., 1986; Trust, 1986; Janeway ve Travers, 1996). Kazanılmış bağışıklıkta savunma mekanizmasının merkezi

lenfosittir. Lenfositler kazanılmış bağışıklığın, humoral, sellüler ve bellek gibi üç aşamasının başlatılmasından ve yürütülmesinden sorumludur. Humoral cevap “Homolog veya spesifik antijene karşı antikor sentezinin uyarılması” olarak tanımlanmaktadır. Bu serum protein molekülleri (globulinler) antikorlar olarak isimlendirilir. Bu nedenle patojenlerin avirulent suşları, öldürülmüş patojenler veya bunlardan elde edilmiş antijenler, konakçıya verilecek patojen tarafından, konakçının hasta edilmesinin önlenmesiyle kazanılmış bağışıklık oluşturulur (Post, 1987).

2.7.2.1. 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 uyaran 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 aşılardan uygulanmasını takiben dikkate değer artan bir direnç oluşturur (Ellis, 1988).

2.7.2.2. Selüler bağışıklık

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 vücudu istila eden mikroorganizmaları fagosite ederek sindirmek suretiyle vücudun spesifik olmayan koruma mekanizmasını oluşturan makrofajların teminini sağlar (Ellis, 1988; Arda vd., 1994). Primer antijen stimülasyonunda 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).

2.7.2.3. 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 bunarlarda reaksiyon verirler. Antikorlar çeşitli maddelerle (FITC, izotop, enzim) konjuge edilerek serolojik reaksiyonlarda (FAT, RIA, ELISA) başarı ile kullanılmaktadır (Schill vd.,1989 ; Arda vd., 1994 ; Janeway vd., Travers, 1996 ; Kubilay, 1997 ; Austin ve Austin, 1999).

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 vd.,1991; Michel vd., 1991; Sanchezvd., 1991; Buchman vd.,1992; Al-Harbi ve Austin, 1993; Estevez vd., 1993; Smith vd., 1993; Nagae vd., 1993; 1994 a,b; Williams ve 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).

2.8. Aşı

Aşılar, hastalık etkeni mikroorganizmalar ve onların antijen unsurlarından hazırlanmış olan, bir hayvana verildiği zaman hastalık meydana getirmeden bağışıklık kazandıran maddelerdir. Belli bir enfeksiyöz etkene karşı, verildikleri canlıdan immun sistemi uyararak aktif bağışık hale getirirler.

Aşının Balıklara Verilme Yolları;

1.Yem içerisinde

2. İnjektasyon

3. Banyo:

3.a. Kısa süreli

3.b. Uzun süreli

4. Püskürtme
5. Anal intubasyon
6. Hiperozmotik infiltrasyon

Oral aşılamadaki en önemli problem bakterinin mide ve barsağın ön kısmında sindirim sıvılarının etkisiyle sindirilmesidir. Bu nedenle oral aşılarından iyi sonuç alınabilmesi için aşının kapsülasyonu ile mide ve bağırsakta sindirimine engel olunması gerekmektedir (Ellis, 1988). Oral aşılama, strese neden olmaması ve uygulama kolaylığı yönünden diğer aşı uygulama yöntemlerinden üstündür. Ancak oral aşılayanın en olumsuz yönü sağladığı bağışıklık süresinin kısa olmasıdır.

Enjeksiyon yöntemiyle aşılama genellikle i.p. yolla uygulanmakta olup, balıklarda uzun süreli ve yüksek seviyede bağışıklık elde edilmesine olanak sağlar (Ellis, 1988; Anderson, 1992;1993).

Ancak uygulamada aşağıda belirtilen sakıncaları bulunmaktadır.

- Balıklarda tek tek uygulama zorunluluğunun olması.
- Küçük boydaki balıklara uygulanamaması.
- Uygulama için anesteziye gerek olması.
- İşgücü ve maliyetin fazla olması.

Banyo yöntemi, bir dakikadan daha kısa sürede uygulanabilmesi nedeniyle iş gücünü kolaylaştırması, uygun koşullar sağlandığında enjeksiyon yöntemine yakın bir immunizasyon elde edilmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Aşılama sırasında strese neden olması büyük balıklarda kullanımının ekonomik olmaması ise banyo yönteminin olumsuzluklarıdır. Ayrıca bu yöntemde; balığın immunizasyona uygun ağırlıkta olmasına ve aşının sulandırma oranına dikkat edilmesi gerekmektedir (Bush, 1982; Ellis, 1988; Tanrikul, 1994).

Püskürtme yönteminde ise balığın ağırlığından çok aşının balıklara ne oranda temas ettiği önemlidir (Johnson ve Amend, 1983 a,b; Bullock ve Anderson, 1984). Püskürtme yöntemiyle balığın ağırlığına göre dozun ayarlanması zor olurken, aşılama süresinin uzatılması bağışıklığın artırılmasında etkili olmaktadır (Johnson ve Amend, 1983a,b).

Aşının inaktive edilme ve uygulama yöntemlerinin dışında immunizasyonda etkili olan faktörler 9 bölümde toplanabilir;

- Balığın büyüklüğü
- Su sıcaklığı
- Aşının sulandırılma (dilüsyon) oranı
- Aşı suşu ve serotipinin önemi
- Aşılarda rappel
- Antijenin yapısı
- Antijenik rekabet
- İmmunostimulanlar ve adjuvantlar
- İmmun sistemin baskılanması

2.9. Balıklarda İmmunizasyon

Balık hastalıklarındaki sürecin gelişimi patojen, çevre ve konak arasındaki etkileşimin bir sonucudur. Bu nedenle tek multidisipliner çalışmalar balık potansiyel patojenik mikroorganizmalarının özellikleri hakkında bilgi içeren konakçı balığın biyolojik yönlerinin yanı sıra bunları etkileyen çevresel faktörlerin daha iyi anlaşılması, yeterli önlemlerin uygulanması, tatlı su ve deniz balıklarının üretimini sınırlayan temel hastalıkların önlenmesi ve kontrolünü sağlayacaktır (Lamers vd., 1985; Baba vd., 1988; Leong vd., 1997; Rahman ve Kawai, 2000).

Bakterilerin neden olduğu bulaşıcı balık hastalıkları ile ilgili olarak, patojenik türler mevcut taksonomik gruplar olarak tarif edilmiş olmasına rağmen, sadece bakteri dünya çapında geniş kültürlerde önemli ekonomik kayıplardan sorumludur. Farklı hastalıklarla tehdit eden etkenlere karşı sektörel açıdan maliyet kontrolü önemli olduğu için, aşılama su ürünlerinin giderek daha önemli bir parçası haline gelmektedir (Lamers vd., 1985; Baba vd., 1988; Leong vd., 1997; Rahman ve Kawai, 2000).

Farklı balık türlerinde *A. hydrophila* tarafından meydana gelen enfeksiyonları önlemek için deneysel aşı incelenmiş olmasına rağmen uygun bir ticari aşı geliştirilmesi grup içinde mevcut mezofilik hareketli *Aeromonas* türlerinin büyük fenotipik ve serolojik heterojenite göstermeleri nedeniyle engellenmektedir. Aslında yaklaşık 100 serotip hareketli *Aeromonas* grubu içinde profilaktik önlemler; iyi bir

hijyen, yüksek stok yoğunluğundan kaçınma, elle müdahaleyi en aza indirmek gibi iyi korumayı sağlamıştır (Lamers vd., 1985; Baba vd., 1988; Leong vd., 1997; Rahman ve Kawai, 2000).

2.10. Balık Aşılama Temel Kurallar

- Aşının yetiştiricilikte bütün sorunları çözmesini beklenemez. Aşırı stok yoğunluğu, kötü su kalitesi, aşırı stres gibi durumlar aşının uygulamadaki etkinliğini azaltabilir.
- Aşılar sadece sağlıklı hayvanlara uygulanır. Aşıların performansı balığa aşılama zamanında balığın sağlık durumuna bağlıdır.
- Aşının karşı bağışıklık göstermesi için zaman tanınmalıdır. Bağışıklık gelişimi zaman alır buyüzden aşı balıkta hemen koruma sağlamaz. Bağışıklık gelişmesi esas olarak suyun sıcaklığına bağlıdır (10°C’de 15-20 gün).
- Balık aşılarırken kesinlikle aşı kullanım önerileri okunmalıdır. Aşılamada önerilen süreyi kısaltmak için uğraşmayın, önerilen seyreltme veya dozda değişiklik yapmayın, daldırma aşı uygulamasında fazla balık kullanmayın, aşı sulandırmak için kullanılan su balığın bulunduğu su ile aynı özellikte olmalıdır, son kullanım tarihi geçmiş aşılar kullanılmamalıdır.
- Aşı hastalığın ortadan kalkması sağlamaz. Bir çiftlikte belirli bir hastalığa karşı kullanılan aşı o çiftlikte rutin olarak kullanıldığı takdirde bu hastalığın bulguları büyük ölçüde ortadan kalkacaktır. Fakat bu durum bu hastalığa neden olan organizmanın ortadan kalktığını göstermez. Aslında bu etken hala mevcut ve aşılanmamış, duyarlı balıkları enfekte etme özelliğine sahiptir.

2.11. Aşının Formülasyon Tipleri

2.11.1. Bakterinler

Bugüne kadar yetiştiricilikte kullanılan aşıların çoğunluğu broth kültüründe elde edilen spesifik suş yada suşların formalinde inaktive edilmesiyle oluşturulmuştur (Toranzo vd., 1987 ; Newman, 1993). En iyi sonuç; bakteriyel hücre ve hücre dışı ürünün her ikisinde dahil olduğu bakterinler ile elde edilir.. Kabul edilebilir bir seviyede koruma ise sadece enjeksiyon yoluyla verilen yağ-adjuvat- bakterin ile aşılamada elde edilebilir.

2.11.2. Zayıflatılmış canlı aşılar

Bu aşı tipi potansiyel olarak yetiştiricilikte birçok avantaja sahiptir. Fakat canlı bir aşı ile aşılama gerçekte potansiyel bir enfeksiyon kaynağıdır. Eğer aşı suşu su içinde dağılmazsa popülasyonda antijenlerin etkili bir şekilde yayılması uzun bir süre içinde gerçekleşir. Deneysel olarak bazı canlı aşılar test edilmiştir bunlar; *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, *Ph. damsela subsp. piscicida* dır. Canlı aşılar ile ilgili olarak en önemli nokta güvenliği ile ilgili sorunlar yani; balıkta ve çevrede direnme, virulans revizyonu, hedef olmayan doğal balıklara ve diğer canlılara yayılma riski gibi sorunlar kullanım öncesi çözülmelidir. Şu anda sadece *E. ictaluri* patojenine karşı zayıflatılmış canlı aşısının ABD’de ruhsatı alınmıştır.

2.11.3. DNA aşıları

DNA aşılarının teorik olarak geleneksel metotlara göre avantajları vardır; memelilerde DNA aşılama sonrası antikorlar spesifik immun yanıtı, yardımcı T hücreleri ve veteriner ilaçlarında ve aşılarında kullanılan 157 sitotoksik hücreleri kapsar. DNA aşıları yetiştiricilikte önce ticari işletmelerde uygulanabilir, balıkların güvenliği, çevre ve tüketicinin ele alınması önemli bir unsurdur. DNA dizisi tek bir mikrobiyal gen kodu olduğu için virulens olarak değişme olasılığı yoktur, bu durumda su ürünleri için kritik bir durum olan çevre güvenliği kesindir.

2.11.4. Monovalant ve polivalant aşılar

İdeal aşı formülasyonu belirli bir balık türünün duyarlı olduğu hastalıkların çoğunluğuna karşı eş zamanlı olarak koruma sağlayan bir polivalan aşıdır. Ayrıca bu polivalan aşılar belirli bir coğrafik alandaki mevcut her patojenin tüm ana serotiplerini kapsamalıdır. Polivalan aşılarının etkinlik örnekleri salmonidlerde ve kalkanlarda olduğu gibi monovalan aşılardan daha üstün bir koruma sağlayacak şekilde olmalıdır. Bu aşılar enjeksiyon yoluyla verilir ancak polivalan aşı formülasyonunda antijen rekabeti söz konusu olabilir.

2.12. Balık Aşılarında Kullanılan Adjuvantlar

Adjuvant Latince kökenli bir kelime olup: Adjuvare kelime anlamı olarak desteklemek veya yardım etmek demektir. Adjuvant; antijen ile birlikte organizmaya verildiğinde o antijene karşı gelişecek immun yanıtı artırıcı maddelerdir. Aşılarda

antijen olarak kullanılan inaktif mikroorganizmaların vücutta çok hızlı şekilde katabolize olmaları, immun yanıtı yeterince uzun süre uyaramamalarına neden olur. Bu nedenle inaktif aşılarda etkinliğini arttırmak için, vücutta daha uzun süre kalmalarını sağlayacak ve immunolojik belleği uyaracak şekilde verilmeleri gerekir. Bu amaçla aşının etkinliğini arttırmak için kullanılan maddelere adjuvant denir. Adjuvantlar genelde, antijenlerin injekte edildikleri yerde uzun süre kalmalarını, immun sistem hücreleri ile daha iyi temas etmelerini ve hücredeki ek uyarıcı moleküllerin artışı sağlarlar (Aydın, 1994 b,c; Candan ve Karataş, 2010). Mineral yağlardan oluşan geleneksel adjuvantlar ticari balık aşılarda kullanılmaktadır. Ancak bu tür adjuvantların yan etkileri özellikle enjeksiyon bölgesinde yangısal reaksiyonlar oluşabilmektedir. Bu nedenle spesifik hücre yanıtı ve spesifik patojeni hedef alan yan etkisi çok az yada hiç olmayan adjuvantların araştırılmasına ihtiyaç vardır (Tafalla vd., 2013).

2.12.1. Adjuvanların görevleri

- Antijenlerin depolanmalarını sağlar ve emilimlerini güçleştirir, böylece uzun süreli bir antijenik uyarıya neden olurlar.
- Antijenlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirirler.
- Lenfoid hücrelerin uyarımı ve işleyişini sağlarlar.
- Humoral yanıtın yanı sıra hücreli bağışıklıkta uyarırlar (Aydın 1994, Tafalla vd., 2013)

2.12.2. Bazı önemli adjuvantlar

Tip	Adjuvant
Alüminyum tuzları	Alüminyum fosfat, alüminyum hidroksit, alum
Su-Yağ emülsiyonları	Freund inkomplet adjuvantı

Balık aşılarda kullanılan adjuvantlar: Adjuvantlar işaret 1 ve işaret 2 olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. İşaret 1 adjuvantlar antijeni aktive edenler, işaret 2 adjuvantlar ise spesifik T ve B lenfositlerini yani adaptif immunitenin hücrelerini aktive ederler (Tafalla vd., 2013) .

2.12.2.1.Balık aşılarında kullanılan işaret 1 adjuvantlar

1-Yağ emülsiyonları

Freund's complete adjuvant (FCA), Freund's incomplete adjuvant (FIA), Montanide (mineral yağ adjuvantın ticari ismi), diğer mineral yağ adjuvantlar

2-Nano/ mikropartiküler adjuvantlar

Poli-lactide-co-glycolide (PLGA) partikülleri, immun bağışıklık artırıcı kompleksler (ISCOMs)

2.12.2.2 İşaret 2 adjuvantlar veya immunostimulantlar

- a) Alüminyum içeren adjuvantlar
- b) Beta-Glukanlar
- c) Saponinler
- d) Polyinosinic polycytidylic acid (Poly 1:C)
- e) Lipopeptidler
- f) Flagellinler, (Gram negatif Kamçılar)
- g) Bakterial DNA ve sentetik oligodeoxynükleotidler (ODNs)
- h) Sitokinler

2.12.2.3. Freund's complete adjuvant (FCA, Freund'un tam adjuvantı)

FCA, mineral yağ ve ısı ile öldürülmüş tüberküloz basili (Mycobacteria) karışımıdır. Aşılar su ve yağ emülsiyonunu içerir. Antijenin içinde bulunduğu su ve mikobakterilerin içinde bulunduğu yağlı fazdır. FCA humoral ve hücrel bağışıklığı uyarmasından dolayı güçlü bir adjuvandır. Aşılar FCA ile verildiğinde kısa sürede antikor oluşumu ve uzun süre koruma etkisi olmaktadır. FCA, deneysel amaçla kullanılan en yaygın ve etkili bir adjuvandır. İnsan ve veteriner hekimliği alanında FCA uygulamasından sonra şiddetli yangısal yanıt oluşması ve tüberküloz hassasiyetine sebep olmasından dolayı sadece deney hayvanlarında kullanımı ile sınırlı kalmıştır (Aydın, 1994a, b,c; Candan ve Karataş, 2010; Tafalla vd., 2013).

FCA enjeksiyondan önce aşı antijenle eşit miktarda çok iyi bir şekilde karıştırılır. FCA'nın enjeksiyon bölgesinde granuloma gibi yan etkilerinden dolayı hayvanlarda araştırmalarda kullanımı sınırlanmaktadır. Bunun yanı sıra FCA kullanımı her zaman balıklarda immunojenitenin yada korumanın artmasına sağlayamamaktadır (Tafalla vd.,2013). Sarıkuyruk balıklarında (*Seriola quinqueradiata*) Pasteurellosis hastalığına karşı *Photobacterium damsela* aşısı ile FCA'nın birlikte kullanımında korumada belirgin bir artış olmadığı belirtilmiştir (Kawakami vd., 1998). Yine gökkuşağı alabalıklarında formalinle öldürülmüş inaktif *Streptococcus iniae* ile iyi bir koruma sağlanırken aşıda FCA'nın birlikte verilmesi halinde korumada belirgin bir etki oluşturmadığı bildirilmiştir (Soltanivd., 2007). Guramilerde (*Trichogaster trichopterus*) *A. hydrophila*'nın dış zar proteini FCA içinde aşı olarak kullanılmış ve balıklara intraperitoneal olarak enjekte edildikten üç hafta sonra FCA olmadan sadece aşı ile bir rapel uygulanmıştır. Rapel uygulamasından iki hafta sonra *A. hydrophila* ile yapılan epruvasyonda FCA'lı aşı ile rapel uygulanan FCA'sız aşının aynı korumayı sağladığı bildirilmiştir (Fang vd., 2004).

Çizelge 2.3. Tıpta, ticari ve deneysel aşılarla kullanılan başlıca adjuvantlar
(Tafalla vd.,2013).

Adjuvant	Merkez immunostimulator bileşeni	Ortaya çıkan bağışıklık yanıtı
Alum	Alüminyum tuzları	Ab, Th2 (insanlarda +Th1)
MF59 ve AS03	Su emilistiyonunda skualen	Ab, Th1 ve Th2
AS04	MPL + Alum	Ab ve Th1
Poly I:C	sentetik dsRNA	Ab, Th1, CTL
MPL ve farklı formülasyonlarda		Ab, Th1
Flagellin, Flagellin-AG füzyon proteinleri	Bakterilerden rekombinant flagellin	Ab, Th1 + Th2
Imiquimodlar	Imidazoquinoline Türevleri	Ab, Th1, CTL (birleştirildiklerinde)
CpG ve farklı formülasyonlar	Sentetik fosforotioat-bağlanmış DNA Optimize CpG motifleri ile oligonükleotitleri	Ab, Th1, CTL (birleştirildiklerinde)
ISCOMS	Saponinler	Ab, Th1 + Th2, CTL
IFA (Montanide formülasyonları)	Mineral ya da parafin yağı + surfactant	Ab, TH1 + Th2
CFA	IFA + peptidoglukan, trehaloz dimikolat	Ab, Th1, Th17

MF59 Skualen, polioksietilen sorbitan monooleat ve sorbitan trioleat içeren Novartis tescilli MF59 adjuvant), AS03(GlaxoSmithKline) squalene içeren, DL-a-tokoferol, polisorbitat, AS04 (Alüminyum hidroksit, ve monofosforil lipid A (MPL), ISCOMs(bağışıklık-uyarıcı kompleks: kolesterol nano yapısı, fosfolipidler ve Quil-A saponinler), IFA eksik Freund adjuvantları), Ab: antikorlar

Oncorhynchus kisutch’larda yapılan bir çalışmada, formalin öldürülmüş *Aeromonas salmonicida* ip olarak FCA ve FCA’sız enjekte edilmiştir. En iyi koruma FCA + aşı için bulunmuştur. Ayrıca antijen olmadan FCA enjekte edilen balıklarda da 90 gün korumanın meydana geldiği rapor edilmiştir (Olivier vd., 1985). Brenek vd., (2002) havuz balıklarında (*Carassius carassius*) *Trypanosoma danilewskyi* aşısı ile birlikte FCA enjekte etmiş ve karşı koruyucu bir etki olduğunu bildirmişlerdir (Grabowski vd., 2004). *Flavobacterium columnare*’nin formalinle öldürülmüş sonike edilmiş tümhücre antijeni ile FCA’nın birlikte ip yoldan verildiğinde 2 hafta içinde mukus ve plazmada antikor belirlendiği 2. immunizasyondan sonra antikor seviyesinin arttığı ve immunizasyon sonrası 10’ ununcu hafta ya kadar yüksek kaldığı bildirilmiştir. Högfors vd., (2008) Gökkuşığı alabalıklarında *Flavobacterium psychrophilum*’dan elde edilen protein antijeni ile FCA birlikte enjeksiyonla balıklara verildiğinde antijen tek verildiğinde koruma oluşturmazken, FCA ile birlikte verilmesi durumunda koruyucu etkisi olduğunu kaydetmişlerdir. Chettri vd. (2009) *Poecilia reticulata*’da *Tetrahymena* sp. ile FCA’nın birlikte immunizasyonu sonucunda patojene karşı koruyuculuğun arttığını ve buna bağlı olarak balıklarda mortalite oranının %15 civarında düştüğünü bildirmişlerdir.

A. hydrophila aşılarının antijenik çeşitliliğinin yüksek olmasından dolayı etkili aşılarda geliştirilmesi oldukça güç olmaktadır. Son zamanlarda *A. hydrophila* karşı koruma oluşturan aşılarda hazırlanmıştır. LaPatra vd., (2010) *A. hydrophila* FCA ile ip olarak verilmesi ile iyi bir korumanın olduğu bildirilmiştir. Kato vd., (2012), belirttiği gibi Japon pisi balıklarında (*Paralichthys olivaceus*) Nocardiosis’e karşı *Mycobacterium bovis* heterolog patojenlere karşı spesifik olmayan immunitiyi uyarması sonucu korumanın artmış olabileceği belirtilmiştir.

2.12.2.4. Glukan

β -glukanlar hem memelilerde hemde balıkta spesifik olmayan immun sistemi uyaran maddelerdir (Candan ve Karataş, 2010; Ergönül vd., 2012; Tafalla vd., 2013). Çeşitli mantar ve mayalardan elde edilen glukanlar özellikle de balık sağlığı yönetiminde en sık kullanılan immunostimulanlardır. Glukan maya ve miselli mantarların ve bazı bitkilerin hücre duvarlarında bulunan uzun zincirli polisakkaritlerdir. β -1,3 ve β -1,6 olmak üzere iki gruba ayrılır. Hayvanlarda ve balıklarda glukana karşı nötrofiller üzerinde çeşitli tanıma mekanizmaları vardır. Glukan spesifik olmayan savunma

mekanizmasını uyarır. Dalak böbrek ve bağırsaktaki endositik hücreler tarafından tutularak bu organlarda birikirler. β -glukan, 1940'lı yıllarda keşfedilen ve zymosan olarak isimlendirilen bir immunostimulanttır. 1960'lı yıllarda spesifik olmayan immun sistemi uyaran bir etkisi olduğu bulunmuştur. Glukanın bağışıklık sistemini nasıl uyardığı 1980'li yıllarda bulunmuştur. Piyasada çeşitli oranlarda glukan içeren pek çok ticari ürün bulunmaktadır. Örneğin *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen glukan içeren preparasyon piyasada Macrogard ismiyle satılmaktadır. Benzer şekilde *Lentinus edodes*'den elde edilen Lentinan, *Schizophyllum commune*'den elde edilen Schizophyllan, *Sclerotium glaucum*'dan elde edilen ise Scleroglucan adıyla bilinen ticari glukan preparasyonları balıklarda immunostimulan olarak kullanılmaktadır. Bunlardan en fazla kullanılan ve deneysel çalışmaya konu olan ise *S. Cerevisiae*'den elde edilen maya glukanıdır (Peddie ve Secombes, 2005). Pek çok çalışmada maya glukanı ile beslenen balıklarda bakteriyel (Raa, 1996), protozoonal (Peddie ve Secombes, 2005) ve viral (LaPatra vd., 1998) hastalıklara karşı direnç artışı gözlenmiştir. Yapılan in vitro çalışmalarda da fagositik faaliyetlerin ve serum bakterisidal aktivitesinin arttığı saptanmıştır. Lentinan ile yapılan çalışmalarda ise lentinan enjekte edilen (2-10 mg/kg vücut ağırlığı) sazan balıklarında (*C. carpio*) deneysel *Edwardsiella tarda* enfeksiyonuna karşı direncin ve balıklar fagositik aktivitenin arttığı gösterilmiştir (Yano vd., 1991). Matsuyama vd. (1992) yılında schizophyllan enjekte ettiği sarıkuyruk balıklarında (*Seriola quinqueradiata*) kompleman sisteminin aktive olduğunu ve serum lizozim seviyesinin arttığını göstermiştir. *S. glaucum*'dan elde edilen Scleroglucan'ın ise sazan (*C. carpio*) (Yano vd., 1991), ot sazanı (*Ctenopharyngodon idella*) ve tilapyada (*Tilapia* sp.) (Wang ve Wang, 1997) hastalık direncini arttırdığı gözlenmiştir. Wang ve Wang (1997) yılında ayrıca scleroglucan'ın ot sazanı ve tilapyada, nötrofil sayısını arttırdığını ve NBT-pozitif hücre sayısında artışa yol açtığını saptamışlardır. Kumari ve Sahoo (2006 a,b) yılında *Clarias batrachus*'a besin yolu ile β -glukan verilmesi durumunda respiratory burst aktivitesinin ve fagositik indeksin arttığını tespit etmişlerdir. Ancak bazı çalışmalarda glukanın 0,1-1,0 μ g/mL'si makrofajlarda respiratory burst etkisini artırırken, 10 μ g/mL'lik dozun etkisiz olduğu hatta 50 μ g/mL'lik dozun inhibitor etkisinin olduğu belirlenmiştir (Smith vd., 2003). β -glukan, immun sistemi aktif hale getiren bir polisakkarit olup, oral olarak verildiğinde etkili olan ve toksik etkisi olmayan maddelerdir. β -glukanlar memelilerdeki antitümör mekanizmasını uyarmasının yanında fungal bakteriyel ve viral hastalıklara karşı konak direncinin

artırır. Ayrıca besinleri yoğunlaştırmak için kolesterolün düşürülmesinde aşılardan ve antibiyotiklerin etkisinin artırılmasında adjuvant olarak, yemlere ilave edilerek immunostimulant ve doğal antibiyotik olarak kullanılmışlardır (Candan ve Karataş, 2010).

Hastalıklara karşı kısa zamanlı korumada olsa ip enjeksiyonla verilen glukandan dozada bağı olarak koruyucu etkileri elde edilmiştir. Buna ek olarak β -glukandan birçok araştırmacı adjuvant olarak etkili olduğunu bildirmişlerdir (Niki vd., 1991; Chen ve Ainsworth, 1992 ; Rorstad vd., 1993 ; DeBaulney vd., 1996 ; Midtlyng vd., 1996 ; Figureas vd., 1998 ; Midtlyng vd., 1998; Ashida vd., 1999; Kamilya vd, 2006; Selvaraj vd., 2005).

DeBaulney vd., (1996) kalkan balıklarına Vibriozise karşı oral aşı ile 5 gün beslemiş ve aşılardan 28 gün sonra epruvasyon uygulamışlardır. Aşı ve β -glukandan birlikte kullanılmasıyla % 61 RPS, yalnız aşı verilen balıklarda ise % 52 bir RPS elde etmişlerdir. Figureas vd., (1998) yılında, *Vibrio damsela* karşı β -glukandan ile *V. damsela* O-antijen i.p. enjekte en yüksek bağışıklık yanıtı elde etmişlerdir. Aşı etkinliğinde bir fagositik indeksi geliştirdiği, aynı zamanda benzer sonuçlar antikor titrelerinde de elde edilmiştir.

Rorstad vd, (1993) *A. salmonicida* ve *Vibrio salmonicida* formalinle öldürülmüş aşılardan β -glukandan ile veya glukansız ip enjeksiyonla salmon balıklarına verilmiştir. Aşılardan sonra 3-4 hafta sonra yapılan epruvasyon sonuçlarında frunküloz ise karşı β -glukandan ilave aşının önemli ölçüde yüksek bir koruma gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ancak β -glukandan tek başına verildiğinde 11 hafta sonra koruma oluşturmamıştır. Bir başka çalışmada tek başına fronkülozise karşı β -glukandan ile adjuvanlanmış aşılardan ile 6 hafta koruma sağlanırken 3. ve 6. ayda koruma tespit etmemişlerdir. Bir yan etkisi olarak adjuvant olarak β -glukandan kullanılan grubun ortalama ağırlığı kontrollere göre anlamlı derecede düşük bulunduğundan, ancak yağ-adjuvant verilen balıkların ağırlığı da β -glukandan adjuvanlanmamış gruptan daha düşük olduğundan bildirilmiştir (Midtlyng vd., 1996, 1998). Bir başka çalışmada, Niki vd., (1991) yılında coho salmonlarına formalin uygulanmış *A. salmonicida* bakterini ile aşılama sonrası koruma incelendiğinde, Vitastim-Taito ve lentinan gibi β -glukandan içeren grup üzerinde hayatta kalma oranı istatistiksel olarak anlamlı olduğunu

belirtmişlerdir. Ancak, aglutinin düzeyleri anlamlı bakterin verilen grupta yüksek iken immunostimulantlı gruplarda daha düşük bulunmuştur.

Hint sazanlarına formalinle inaktive *A. hydrophila* aşısı β -glukan ile birlikte verildiğinde RPS % 67.7 glukansız grupta ise % 58.0 olarak tespit edilmiş ancak istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Kamilya vd., 2006). Ancak β -glukan mevcudiyetinde ölüm oranında bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. *A. hydrophila* ile β -glukan aşılama öncesi ip verildiğinde yüksek bir antikor titresi görülürken, aşılama öncesi β -glukan ile banyo ve oral uygulama yapılan grupta antikor gelişmemiştir (Selvaraj vd., 2005). Selvaraj vd., 2006 yılında yaptıkları bir başka çalışmada, sazan β -glukan farklı konsantrasyonları LPS *A. hydrophila* karşı aşılanmış ve i.p., oral ve banyo gibi çeşitli yoldan uygulanmıştır. RPS i.p. enjeksiyonda anlamlı derecede yüksek olduğu hatta LPS ve karışımı belirli bir β -glukan ve balık en düşük konsantrasyonda uygulanan gruplarda β -glukan oral kontroller ile karşılaştırıldığında koruma oluşturmamış ve antikorda saptanmamıştır.

2.13. *Aeromonas hydrophila* ile İlgili Yapılan Aşı Çalışmaları

Aeromonas hydrophila yıllardır su ürünleri sektöründe kayıplara neden olan önemli bir patojendir. Bu nedenle *A. hydrophila*'ya karşı aşı geliştirmek için birçok girişim yapılmıştır (Lamers vd., 1985; Baba vd., 1988; Leong vd., 1997; Rahman ve Kawai, 2000).

İnaktive Whole cell, tüm hücre (WC) aşılarda etkileri bildirilmiştir. Örneğin Lamers vd. (1985) yılında sazanlara uyguladıkları, ısıyla inaktif edilmiş daldırma *A. hydrophila* aşısının sonucunda serum antikor düzeylerinde bir artış gözlemlenmiştir (Lamers vd., 1985). Daha sonra Kusuda vd., (1987) yılında sazanlara uygulanan formalinle inaktif edilmiş *A. hydrophila* aşısı sonucunda total serum protein konsantrasyonlarında bir artışa yol açtığı tespit etmişlerdir (Kusuda vd., 1987).

Gökkuşığı alabalıklarında enjeksiyon, immersiye ve oral olarak uygulanan *A. hydrophila* aşısı ile serumdaki antikor üretiminde artış gözlemlenmiştir (Loghothetis ve Austin, 1994). Hint sazanları kullanılan bir çalışmada biyofilmli serbest hücre aşısı daha uzun süre bağırsak, dalak ve böbrek dokularında koruyabilmek için kullanılmıştır (Azad vd., 2000).

A. hydrophila'ya karşı hazırlanan bir Outer Membrane Protein-Dış Membran Proteinleri (OMP) aşısı ile yapılan epruvasyondan sonra *A. hydrophila*'ya karşı yüksek bir koruma görülmüş ve seçilen OMP antijenlerinden hazırlanan aşının etkili olduğu düşünülmüştür (Rahman ve Kawai, 2000).

Yine başka bir çalışmada ısı ile inaktif Whole cell, tüm hücre (WC) ve formalinle inaktif ECP (ekstrasellüler protein) ile oluşturulmuş polivalan aşısı hazırlanmış ve iki tür hint sazan türünde denenmiş fakat bu uygulama bakteriyel hastalığa karşı balıkları korumada başarısız olmuştur (Chandran vd., 2002).

Başka bir çalışmada biyofilmlili serbest hücre aşısıyla beslenen kanal yayın balıklarında *A. hydrophila* ile yapılan epruvasyon sonucunda yüksek bir serum aglütinasyon antikor titresi ve RPS değeri gözlemlenmiştir (Nayak vd., 2004).

Sazanlara karşı yapılan bir çalışmada koruma sağlamak için virulent 6 *Aeromonas hydrophila* suşu ile S-layer protein üretilmiş ve koruma kabiliyeti değerlendirilmiştir. 30-40g ağırlığında 120 adet sazana balık başına 0.1ml adjuvant olacak şekilde ayarlanmış i.p. aşısı uygulanmış ve her gruptan 20 balık virulent 6 adet *A. hydrophila* ile oluşturulmuş aşısı ile aşılamadan 35 gün sonra epruvasyona tabi tutulmuştur. Epruvasyon sonucunda RPS %56-87 arasında bulunmuştur. Sonuçlar ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve anlamlı bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda yazarlar kullandıkları 6 farklı virulent suş için adjuvantlı aşısı koruma sağlayabilir ve kullanılabilir olarak değerlendirmişlerdir (Poobalan vd., 2010).

Bastardo vd. 2012 yılında yaptıkları çalışmada, *L. garvieae* ve *A. hydrophila* karşı bu iki bivalent aşının gökkuşağı alabalığında koruyucu etkinliği değerlendirilmiştir. Formalin ile inaktive edilmiş bivalent aşısı yanı sıra ISA-763'ü içeren adjuvant ile aşısı hazırlanmıştır. Aşılamadan 30 ve 90 gün sonra *L. garvieae* ve *A. hydrophila* karşı koruma test edilmiştir. Sulandırılmış ver adjuvantlı aşılar 30 gün sonrasında *L.garvieae* patojenine karşı %100 ve % 95.3 RPS ve *A. hydrophila* patojenine karşıda % 100 ve % 95.3' lük bir RPS ile yüksek koruma seviyesi elde etmişlerdir. Aşılamadan 30. ve 90. günler sonrası nispi koruma (RPS) oranları arasındaki farklılıklar önemli bulunmuş, bu sürelerden sonra suyla hazırlanan bivalent aşılarının RPS oranları *L. garvieae* için % 76 *A. hydrophila* karşı % 85 RPS oranında. Adjuvantlı aşıda RPS'nin *L.garvieae* karşı % 90 ve *A. hydrophila* karşı % 95 RPS oranı elde edilmiştir. Buna ek olarak her iki aşının ilk uygulamasından 15 gün sonra

balıklarda yüksek düzeyde antikor ve bağışıklık kazandığı belirtilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda gökkuşağı alabalığında *L. garvieae* ve *A. hydrophila* karşı bu bivalent aşılardan etkili bir şekilde koruyabileceği ve alabalık işletmelerinde bu patojenlerden kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi içinde uygun bir aşı olarak önerilebileceğini belirtmişlerdir.

Şu anda, *L. garvieae* karşı gökkuşağı alabalığını koruyacak uygun ticari aşılardan mevcut ve çeşitli çalışmalarla lactococcus'un kontrol altına alınmasına yönelik aşı formülasyonlarının etkinliğini gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda çeşitli aşı formülasyonlarının koruma sağlayabilirliği kanıtlanmış olmasına rağmen yetiştirilen balıkların *A. hydrophila* enfeksiyonlarına karşı korunması için uygun ticari bir aşı bulunmamaktadır. Ticari aşılardan eksikliğinin nedeni *A. hydrophila* sero gruplarının farklı izolatlarına karşı aşılardan etkinliğinin azalmasının sonucu bu bakterinin yüksek heterojenitesi ile ilgili olabileceği ifade edilmiştir.

Polivalent aşılardan balıkları çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri suşlarının geniş "mikro organizma" yelpazesine karşı koruma avantajı sağladığı iyi bilinmektedir

2.14. Japon Balığı ile İlgili Yapılan Aşı Çalışmaları

Süs balıkları dünyada ticari değeri önemli bir sektör haline gelmiştir. Tatlı su akvaryumlarında bulunan süs balıkları arasında Cyprinid türlerden: Koi sazan (*C. carpio*) ve Japon balıkları (*C. auratus*) önemli türlerdir. Akvaryumculuk sektörünün hızlı gelişmesi ve büyümesi ile paralel olarak bulaşıcı ve paraziter hastalıklarda da artış görülür. Yapılan araştırmalarda Japon balıkları ile ilgili aşı çalışmalarının daha çok *Ichthyophthirius multifiliis* ve *A. hydrophila* patojenine karşıdır.

Ling vd., (1993) yılında *Ichthyophthirius multifiliis* ve *Tetrahymena pyriformis* karşı koruma amaçlı immersiyon ve İ.p. enjeksiyonla aşı hazırlamışlar sonuçta iyi bir koruma oluşturduğunu bildirmişlerdir. *A. hydrophila* yıllardır su ürünleri sektöründe kayıplara neden olan önemli bir patojendir. Bu nedenle birçok girişim *A. hydrophila*'ya karşı aşı geliştirmek için yapılmıştır (Lamers vd., 1985; Baba vd., 1988; Leuong vd., 1997; Rahman ve Kawai, 2000).

Guttvik vd.,(2002) yılında yaptıkları çalışmada Japon balıklarında da görülebilen *A. salmonicida*'ya müdahale olarak aşılama uygulanabilmektedir. Bu uygulamalar Japon balıklarında daldırma aşısı, oral ve enjeksiyon yolu ile olur. Navot vd., (2011) Japon balıklarında ülser hastalığına karşı aşıda ultra ses uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir. Japon balıklarında *Aeromonas salmonicida* eriyik A-layer protein (AP) ultrases immersiyon (USI) ve formalinle öldürülmüş bakterinin enjeksiyon yolu ile aşılanmışlardır. Enjeksiyonda incomplete Freund's Adjuvantı (IFA) kullanılırken USI da adjuvant kullanılmamıştır. Japon balıklarında USI uygulamasında antikor ölçülememesine rağmen homolog *A.salmonicida* virulent patojene karşı yapılan eprüvasyon uygulamasında AP nin uyarımı ile çok iyi bir koruma sağlandığı belirtilmiştir.

Thanga vd., (2013) yılında Japon balıklarında *A. hydrophila*' ya karşı adjuvantlı aşı çeşitleri denemiş ve etkinliğinin üzerinde araştırma yapmışlardır. Enfekte Japon balıklarından izole edilen *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı Japon balıklarında aşılama stratejileri geliştirmişlerdir. Hazırlanan aşılar Süs balıklarında virulent *A. hydrophila* (AHV1; GenBank HQ331525.1) kullanmışlardır. Aşılar adjuvantlı ve adjuvantsız aşılar hazırlanmıştır. Adjuvant olarak Kuşkonmaz (*Asparagus racemosus*) kullanılmıştır. Araştırmalarında wholecell-bütün aşıları (WC), Extracellular Products - hücre dışı ürünler (ECP), Outer Membrane Protein - diğer mebran proteinleri (OMP), Biofilm - Bakteri biyofilm (BF) aşıları Japon balıklarında denenmiştir. Whole Cell (WC) aşılar, *A. hydrophila*, AHV1 suşu tryptic soy broth (TSB) ta 20°C de 20 saat inkübe edilmiş, daha sonra 24 saat % 0.6 formalinle 20°C de 20 saat inaktive etilmişlerdir. Formaldehiti uzaklaştırmak için 1500 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek % 0.86 tuzla 35 mg ml⁻¹ süspanse ederek aşıyı hazırlamışlardır. ECP aşılar AHV1 50 ml TSB'de 20°C 110 rpm de çalkalanarak 18 saat inkübe edildikten sonra kültür 18.000 devirde 28°C 10 dk santrifüj edilerek üst kısmında ki sıvı uzaklaştırıldı bu supernatant tekrar 28°C, 25.000 devirde 30 dakika santrifüj edildi ve daha sonra 0.22 µm filtreden geçirilerek ECP elde etmişlerdir. Daha sonra buradaki protein miktarı hesaplanmış ve sonra % 0.6 formaldehitte bir saat bekletilmiştir. 2 kez % 0.85 tuzlu su solüsyonu ile yıkandıktan sonra 28°C, 25.000 devirde santrifüj edilmiş, sonunda ECP tuzlu su içerisinde yeniden süspansiyon haline getirilerek ilerideki aşı çalışmaları için kullanılmak üzere -20°C saklanmıştır. Outer Membrane Protein (OMP), 24 saat TSB'de inkübe edilen AHV1

suşu 25°C’de, 3.000 devirde 20 dk santrifüj edilerek hücreler toplanmıştır. Bu bakteri peletleri fosfat tamponlu tuz ile (PBS) de 2 kez yıkandı ve 10 mM Tris-hidroklorür (pH:7.5) ile 1 kez yıkandı. Hücreler tekrar Tris-hidroklorür ile süspense edilip buzlu su içinde 50 Watt ta 4 kez sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyonu takiben bu süspansiyon Sarkosyl (sodyum bazlı ve protein yapısını yıkar) ile karıştırıldı ve 25°C, 30 dk boyunca inkube edildimiştir. Daha sonra 4.000 devirde 30 dk santrifuj edildikten sonra üstteki supernatant kısım toplandı sonra 4.500 devirde 45 dk boyunca santrifujlendi peletler toplanıp 20°C de muhafaza edildi. Biofilm (BF) aşıları, kısaca AHV1 suju TSB’de cam levhalar üzerinde üretilip ve BF toplanarak ve 90°C de 30 dk boyunca ısı ile in aktivite edilmiştir elde edilen aşı -20 °C de muhafaza edilmiştir. Japon balıklarında yapılan aşılama denemelerinin sonuçları incelendiğinde aşılammamış balık gruplarında gün içinde %100 mortalite görülürken aşıli gruplarda ise 25-50 gün sonra istatistik olarak hayatta kalma oranını artırmıştır. Kuşkonmaz kullanılan advujantlı aşılaların aeromonas’a karşı etkili bir koruma sağladığı bildirilmiştir. OMP ve BF aşı grupları hayatta kalma dahil olmak üzere yüksek bir bağışıklık gösterme açısından ECP grubuna göre kıyaslandığında daha yüksek bir orana sahip olduğunu görmüşlerdir. BF immuno adjuvantları ise diğer aşı adjuvantlar’ına göre daha yüksek immuno genetik etkiye sahiptir. Genel anlamda bu çalışmada adjuvantlı aşı uygulamasının aşının etki süresinin artırdığı belirtilmiştir. Kuşkonmaz OMP ve BF aşıları ile birlikte bağışıklık güçlendirmeye yardımcı olur. Kuşkonmaz *A. hydrophila*’ya karşı düşük maliyetli, güvenli ve de kuvvetli advujant olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmada kullanılan *Aeromonas hydrophila* suşları

Araştırmada 6 adet *Aeromonas hydrophila* suşu kullanılmış olup, bu suşlardan bir tanesi referans (ATCC 7966) suş diğerleri ise hasta balıklardan izole edilmiştir. Bu suşların kökenleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Aeromonas hydrophila* suşları

No	Balık Türü	Köken
1	Sazan Balığı	Antalya (AHS)
2	Japon Balığı	Antalya (AHJ)
3	Gökkuşluğu alabalığı	Muğla (AHG1)
4	Gökkuşluğu alabalığı	Karadeniz (AHG2)
5	Gökkuşluğu alabalığı	Muğla (AHG3)
6	Süt	ATCC 7966

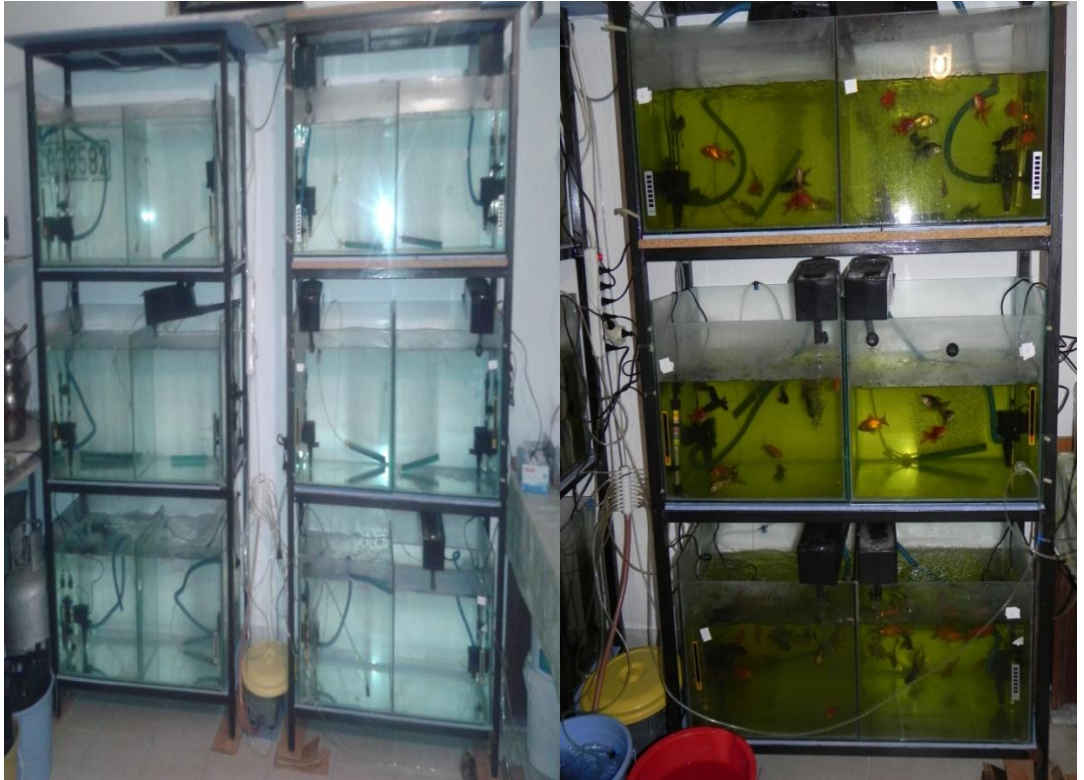
3.1.2. Araştırmada kullanılan Japon balığı ve uygulama yeri

Araştırmada virülens çalışmaları için 100 adet, toksitide denemeleri için 120 adet, immersiyon aşı uygulaması için yaklaşık 40 adet (yaklaşık ağırlıkları 3-4g civarı) , ayrıca i.p. enjeksiyon yoluyla aşı denemesi (canlı ağırlık ortalaması $20,4 \pm 0,108$ g). Tam boy ortalaması $9,98 \pm 0,151$ cm olan 240 adet olmak üzere, toplam olarak 500 adet sağlıklı Japon balığı kullanılmıştır. Japon balıkları Antalya'da bulunan özel bir akvaryum işletmesinden temin edilmiştir. Balıklar iki katlı naylon poşetlere 1/2 su konularak ve oksijen takviye edilerek nakledilmiştir. Getirilen balıklar %2'lik tuzlu su ile dezenfekte edilerek akvaryumlara yerleştirilmiştir. Araştırmaya başlamadan rastgele seçilen 10 adet balıkta parazitolojik ve fungal enfeksiyon yönünden mikroskopik inceleme yapılmış bakteriyolojik muayene için ön böbrekten TSA ya ekimler yapılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda mikrobiyolojik yönden (bakteri,

mantar, parazit) herhangi bir enfeksiyon taşımadığı görülmüştür (Şekil 3.1). Denemede 98x43x40cm boyutlarında yaklaşık 80 litre olan 12 adet akvaryum kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Deneme’de kullanılan Japon balıkları



Şekil 3.2. Deneme akvaryumları

3.1.3. Araştırmada Kullanılan Su Kaynağı ve Suyun Kalitesi

Araştırma süresince dinlendirilmiş çeşme suyu kullanılmıştır. Suyun sıcaklığı termostatlı ısıtıcılar ile ortalama 20 °C, pH'sı 7.2 ve suda çözünmüş oksijen miktarı ortalama 7.4 mg/l olarak ölçülmüştür.

3.1.4. Araştırmada Kullanılan Yem

Deneme balıklarının adaptasyonu ve deneme süresince ticari akvaryum balığı yemi (Ekol balık yemi, Pondstick TM) ile günde bir kez doyuncaya kadar beslenmişlerdir. Yemin yapısında balık unu, karides unu, buğday unu, darı irmiğı, kepek, fındık küspesi, ayçiçeğı küspesi, melas, vitamin karışımı ve mineral karışımı maddelerin kullanıldığı etiketinde bildirilmiştir. Mineral karması kalsiyum (en az- en çok) 0.7-1.3, fosfor (en az- en çok) 1.3-1.5, sodyum (en az- en çok) 0.6-0.7, mangan (en az) 30, çinko 23.0 mg/kg. Vitamin karması Vitamin-A en az 9000 IU/kg, Vitamin-D₃ en az 1500 IU/kg, Vitamin-E en az 30mg/kg (Çizelge 3.2) dir.

Çizelge 3.2. Deneme süresince kullanılan ticari Japon balığı yeminin kimyasal besin bileşenleri

Besin maddesi	Değerler
Nem (su)	% 4.5
Hamprotein (en az)	% 16.0
Ham yağ (en az-en çok)	% 2.5-5.0
Ham selüloz (en çok)	% 4.2
Ham kül (en çok)	% 8.0
HCl'de çözülmeyen kül (en çok)	% 1.0
NaCl (en çok)	% 1.0
Metabolik Enerji (en az Kcal/kg)	2200

3.1.5. *Aeromonas hydrophila* Aşılarının Hazırlandığı Kuruluş

Bu araştırmada, immersiyon ve enjeksiyon uygulaması için *A. hydrophila* aşıları SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında hazırlanmıştır.

3.1.6. Araştırmada Kullanılan Adjuvantlar

Araştırmada adjuvant olarak gluklan ve Freund's Complete Adjuvant (FCA sigma) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. *A. hydrophila* suşları

3.2.1.1. Etken izolasyonu ve saflaştırılması.

Yapılan alışmalar sonucunda deneysel aşı üretiminde kullanılmak üzere seçimi yapılan bakteri suşları stok kùltürden triptik soy agar (TSA) besiyerine alınarak 22°C'de 48 saat inkùbe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda üreyen bakterilerin saflık kontrolleri yapılmıştır. İzole ettiğimiz suşlar saflaştırılarak genel bakteriyolojik testleri ve API testleri yapılarak etkenin özellikleri belirlenmiştir (Austin ve Austin, 2007).

3.2.1.2. *A. hydrophila* suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi

A. hydrophila suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde geleneksel bakteriyolojik testler (Collins ve Lyne, 1976; Holt vd., 1994) ve API 20 NE (Bio Meriux) hızlı teşhis kiti kullanılmıştır (Austin ve Austin, 2007).

3.2.1.3. Geleneksel bakteriyolojik testler ve API 20 NE testi

A. hydrophila suşlarında Gram boyama, oksidasyon-fermentasyon (O/F), hareket testi (asılı damla metodu), sitokram oksidaz, katalaz, O/129 geleneksel bakteriyolojik testler yapılmış ayrıca tüm suşlarında genç kùltürleri kullanılmıştır (Arda vd., 2002; Austin and Austin, 2007). API 20 NE teşhis kitinin kullanımı sırasında, üretici firmanın (Biomérieux, 20 100) vermiş olduğu talimatlara uygun olacak şekilde, aseptik koşullarda ekimler yapılmıştır. Ekim sonrası kùltürler 22°C'de 24 saat süreyle inkùbe edilerek, test sonuçları değerlendirilmiştir (Austin ve Austin, 2007).

3.2.2. Aşının Hazırlanması

3.2.2.1. Aşı suşunun seçimi

Aşı suşlarının seçiminde virulens testleri sonuçları değerlendirilerek yapılmıştır (Ellis, 1988; Larsen ve Pedersen, 1997).

Araştırmada 5 farklı *A. hydrophila* suşu üzerinde virülens çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla 10^8 bakteri/ml yoğunluğundaki *A. hydrophila* suşları 20 adet gökkuşağı alabalığına intraperitoneal yolla 0,1 ml verilerek deneysel enfeksiyon oluşturulmuş ve balıklar 21 gün süreyle takip edilmiştir. Ölen balıklardan bakterinin reizolasyon amacı ile TSA'ya ekimler yapılmıştır. Ayrıca kontrol amacı ile 20 balığada 0,1 ml PBS i.p. olarak verilmiştir. Ekim yapılan petrilerde üreyen bakterinin Gram negatif, Sitokram oksidaz, katalaz, hareketlilik ve O/129 (Vibriostat testi) testine duyarlı olup olmadığı belirlenmiştir. Böylelikle ölümlerin gökkuşağı alabalıklarına verilen *A. hydrophila* suşlarından kaynaklandığı teyit edilmiştir. Suşlar arasında virülensi yüksek olanlar ve farklı balık türlerinden izole edilen AHS, AHJ ve AH1 suşları aşı suşu olarak seçilmiştir. Bu tez çalışmasında, hasta sazan balıklardan izole edilen *A. hydrophila* suşu monovalan aşıda kullanılmış, polivalan aşıda ise sazan izolatu AHS, Japon balıklarından izole edilen AHJ ve alabalık izolatu AH1 suşları kullanılmıştır.

3.2.2.2. Aşının üretimi

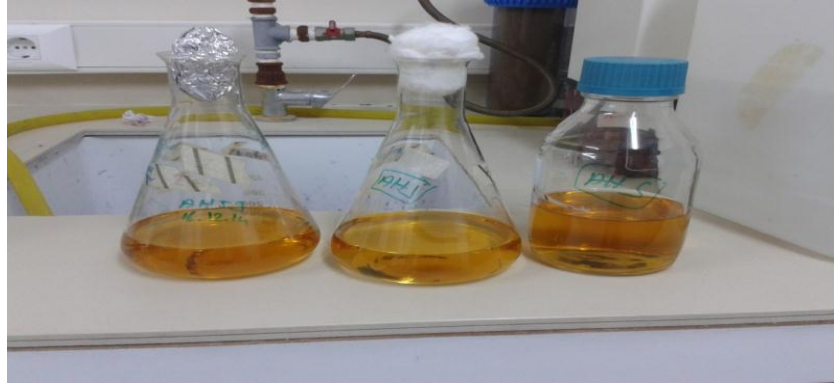
Aşı üretimi için AHS, AHJ ve AH1 suşları ayrı ayrı Tryptic Soy Broth (TSB) içerisinde 22°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üreyen kültür soğutmalı santrifüj (SİGMA 2-16K)'de 5000 devirde 20 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen bakteri çökeleği Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.2) ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra süspansiyon % 0.6'lık 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 ile yıkanmış ve son konsantrasyon 12×10^8 hücre/ml (625 nm dalga boyunda Optik Dansite Değeri 0.80) PBS ile yeniden sulandırılarak aşılar hazırlanmıştır. Aşılar uygulama yapılacak zamana kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir. Hazırlanan deneysel aşı, immersiyon ve i.p. enjeksiyon yolu ile immunizasyonda kullanılmıştır.

Monovalan aşılar AHS suşundan hazırlanmış, polivalan aşılar ise AHS, AHJ ve AH1 suşları kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.2.3. Sterilite testi

Üretilen aşılar da herhangi bir mikrobiyal kontaminasyonu' nun varlığının tespiti için sterilite kontrolleri yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan Brain Heart İnfusion agar (BHI), Tirptic Soy agar (TSA), sıvı thioglycolate medium, MacConky agar (MCA), kanlı agar, saporaraude dextrose agar ve TSB besiyerine 2 paralel olacak şekilde ekilerek 22 ve 36 °C de 21 gün süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Sterilite kontrolü yapılmış (Şekil 3.3) olan aşılar +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Ellis, 1988).



Şekil 3.3. Sterilite kontrolü yapılan steril aşılar

3.2.2.4. Toksisite denemeleri

Aşının toksit (öldürücü) etkisi olup olmadığını araştırmak amacı ile. Toksisite denemelerinde; hazırlanmış olan aşıdan 20'şer adet Japon balığına 0.1 ml i.p. yolla enjekte edilmiştir. Kontrol grubuna ise 0.1 ml PBS intraperitoneal enjeksiyon uygulanmış ve balıklar deneme akvaryumları içerisinde 21 gün boyunca izlenmiştir (Amend vd., 1983; Ellis, 1988).

3.2.3. Aşıların Uygulanması

Çalışmamızda, ülkemizden izole edilmiş *A. hydrophila* suşları ile hazırlanan aşılar immersiyon ve enjeksiyon yoluyla Japon balıklarına uygulanmıştır. Kontrol grubu balıklara 0,1 ml PBS i.p. olarak verilmiştir. Çalışmada immersiyon aşılar 1:10 oranında sulandırılarak 1 dk süreyle banyo yaptırılmak suretiyle, enjeksiyon aşılar ise i.p. enjeksiyon yöntemiyle 0.1 ml olacak şekilde balıklara aşılama yapılmıştır.

Denemede toplam 6 grup kullanılmış ve deneme 2 paralel yapılmıştır. Denemede monovalan aşı ile immersiyon ve enjeksiyon; polivalan aşı ile enjeksiyon monovalan aşı ile glukun ve FCA adjuvantlı aşilar enjeksiyon uygulanmıştır. Glukun ml de 100 µg ilave edilmiştir. FCA aşı ile 1:1 oranında kullanılmıştır. Adjuvant kullanılan gruplara rapel (booster, aşı tekrarı) yapılmamıştır. Balıklara rapel 1 ay sonra uygulanmıştır.

Denemede 6 farklı grup oluşturulmuştur;

1 grup; ortalama 3 g ağırlığında 40 adet Japon balığına monovalan aşı immersiyon yöntemi ile 1:10 oranında sulandırılarak 1dk süreyle uygulanmıştır. Aşılanmış balıklara 30 gün sonra aynı yöntemle rapel uygulanmıştır.

2 grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet Japon balığına monovalan aşı 0.1 ml i.p. enjeksiyon yöntemi uygulanmıştır. Aşılanmış balıklara 30 gün sonra aynı yöntemle rapel uygulanmıştır.

3 grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet Japon balığına monovalan aşı FCA adjuvantı ile 0.1 ml i.p. yöntemi uygulanmış.

4 grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet Japon balığına monovalan aşı glukun adjuvantı ile 0.1 ml i.p. yöntemi uygulanmış.

5 grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet Japon balığına polivalan aşı ile 0.1 ml i.p. yöntemi uygulanmış. Aşılanmış balıklara 30 gün sonra balıklara 0.1 ml i.p. monovalan aşı ile rapel uygulanmıştır.

6 grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet Japon balığına PBS 0.1 ml i.p. yöntemi uygulanmış.

Çizelge 3.3. Aşı deneme grupları ve uygulama şekilleri

Deney Grupları	Uygulama Metodu ve Miktarı	Hayvan Sayısı/Grup	Tekrar Sayısı
Mono - im	1:10 oranında sulandırılarak 1dk immersiyon	40(20x2)	2
Mono - i.p.	Enjeksiyon i.p. , 0.1 ml , mono rapel	40(20x2)	2
Mono - FCA	Enjeksiyon i.p. , 0.1 ml	40(20x2)	2
Mono - glukon	Enjeksiyon i.p. , 0.1 ml	40(20x2)	2
Poli - i.p.	Enjeksiyon i.p. , 0.1 ml , mono rapel	40(20x2)	2
Kontrol	Enjeksiyon i.p. , 0.1 ml	40(20x2)	2

3.2.4. Aşı Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Aşının etkinliği değerlendirilmesinde eprüvasyon ve balıkların kan serumunda oluşan antikor titresi nin belirlenmesi ile değerlendirilmiştir (Ellis 1997).

3.2.5. Eprüvasyon Uygulamaları

Öncelikle homolog ve virülensi en yüksek bir *A. hydrophila* suşu AHS ile % 70 mortalite yapan (LD₇₀) bakteri sayısı belirlenmiştir. LD₇₀ dozunun belirlenmesinde her grupta 20'şer adet Japon balığı (ortalama ağırlığı 20g olan) kullanılmıştır. *A. hydrophila* 10³-10⁵-10⁷cfu/ml aralığında hazırlanan konsantrasyonlarda denenerek LD₇₀ 10⁵ olarak belirlenmiştir.

Aşılardan sonra balıklara 50. günde, eprüvasyon uygulan. Eprüvasyon uygulanacak balıklar karanfil yağı ile bayıltılarak tüm gruplara i.p. enjeksiyonla LD₇₀ oranındaki bakterinin 0.1ml miktarda verilmiştir. Eprüvasyon uygulanan balıklar 21 gün boyunca izlenerek, ölen balıkların iç organlarından da reizolasyon için ekimler yapılmıştır. Böbreklerinden *A. hydrophila* izole edilen balıklar spesifik mortalite olarak kaydedilmiştir (Johnson ve Amend, 1983a; Erdal, 1989; Bastardo vd., 2012).

$$RPS = [1 - \% \text{ Aşılı balıklarda ölüm miktarı} / \% \text{ Kontrol grubunda ölüm miktarı}] \times 100$$

3.2.6. Başışıklığın Değerlendirilmesi

3.2.6.1. Aşılı balıklarda antikor seviyelerinin tespiti

Aşılı ve kontrol grubu balıklarından, 30. günde her gruptan rastgele seçilen 5 balıktan kaudal venadan kan örneği (Şekil 3.4) alınarak serumları elde edilmiş ve derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Japon balıklarında kaudal venadan kan alımı

3.2.7. Serum Elde Edilmesi

Balıklardan alınan kan 1 saat oda sıcaklığında ve daha sonra gece boyunca +4 °C de tutulmuştur. Daha sonra santrifüjde 3000 devirde 15 dakika süre ile santrifüj edilerek üstte kalan sıvı kısım otomatik pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde alınmıştır. Elde edilen serumlar serolojik testlerde kullanılmak üzere -20 °C de derin dondurucuda saklanmıştır (Strand vd., 1977; Thuvander, 1987; Aakre vd.,1994). Antikor titreleri belirlenmesi amacıyla lam ve mikro-aglutinasyon testi kullanılmıştır (Arkoosh ve Kaattari, 1993; Kubilay ve Timur, 2001).

3.2.8. Aglutinasyon Testi

3.2.8.1. Antijen hazırlanması

Antijen hazırlamak için *A. hydrophila* suşunun saflığı kontrol edildikten sonra TSB'ye ekilerek 22°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. Sulandırma sonucu oluşan süspansiyon yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0.8 Optik Dansiteye (OD) ayarlanmıştır. Böylece hazırlanan antijen somatik O antijeni olarak mikroaglutinasyon testinde kullanılmak üzere +4 °C saklanmıştır (Sorensen ve Larsen, 1986).

3.2.8.2. Lam aglutinasyon testinin uygulanması

Temiz bir lam üzerine bir damla test serumundan ve bir damla da önceden hazırlanmış aglutinasyon antijeninden damlatılarak lamın sağa sola hareket ettirilmesiyle iyi bir şekilde karışmaları sağlanmıştır. Test sonuçları 2-3 dk içerisinde değerlendirilmiş ve 5 dk sonra oluşan zayıf aglutinasyon negatif olarak kabul edilmiştir. Testin kontrolü immunize edilmemiş balık serumları ve PBS ile yapılmıştır (Kubilay, 1997).

3.2.8.3. Mikro - aglutinasyon testinin uygulanması

Japon balıklarının serumunda antikor titrelerinin belirlenmesi amacıyla mikro-aglutinasyon testi kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan yuvarlak tabanlı polyester mikroyağlı 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. Çukurların tümüne çoklu pipetle önceden hazırlanmış aglutinasyon antijeninden 50 µl ilave edilerek vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Playtler iki saat oda sıcaklığında ve tüm gece boyunca +4 °C de inkübe edilmiştir (Sorensen ve Larsen, 1986; Kubilay, 1997; Boesen vd., 1999, Bailone, 2010). Testin kontrolü için negatif serumlar çalışılan her mikroyağlının sondan bir ve ikinci gözlerine konulmuştur.

Aglutinasyon titresi olarak en yüksek aglutinasyonu veren serum dilüsyonu kaydedilerek, bu değerler $\log_2$ tabanına göre değerlendirilmiştir (Sorensen ve Larsen, 1986; Boesen vd., 1999)

3.2.9. İstatiksel Hesaplamalar

Denemede aşılardan sağladığı bağışıklık, ölümler ve RPS verileri Ki-kare, Varyans Analizleri ve tukey çoklu karşılaştırma testi SPSS 16.0 istatistik programıyla yapılmıştır. Önem düzeyi olarak $p < 0.05$ seçilmiştir (Hayran ve Özdamar, 1995).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *Aeromonas hydrophila* Suşlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular

Araştırmada 6 adet *Aeromonas hydrophila* suşu kullanılmış olup, bu suşlardan bir tanesi referans (ATCC 7966) diğerleri ise hasta balıklardan izole edilmiştir. İzolatların fenotipik özellikleri referans bakterinin (ATCC 7966) özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Bu suşların TSA da 22 °C’ de 24 saat inkübasyondan sonra düz, hafif kabarık, yuvarlak, krem renginde 2-3 mm çapında koloniler oluşturdıkları gözlenmiştir.

A. hydrophila suşlarının Aeromonas Isolated Agar (Base, Sigma, Fluka 17118) besiyerinde yeşil renkli koloniler oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.1). Mikroskopik morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için kolonilerden hazırlanan preparatlara yapılan Gram boyama sonucunda. Gram negatif çubuk şeklinde oldukları gözlenmiştir. Çukur lamda asılı damla yöntemi ile yapılan hareket muayenesinde bakterilerin aktif flagella hareketi gösterdikleri belirlenmiştir. Bakterinin kesin tanısı için biyokimyasal testler yapılmıştır. Sitokram oksidaz ve katalaz testinde pozitif reaksiyon verdiği, O/F testinde fermantatif olduğu tespit edilmiştir. Yapılan 2,4 - Diamino 6,7 - Diisopropil pteridin fosfat testine (O/129,Vibriostat) ise dirençli oldukları görülmüştür. Sadece AHS ve AHJ suşunda sitrat testinde pozitif iken diğerleri negatif sonuç vermiştir. Literatürlerde de bu testin *A. hydrophila* için değişken olduğu görülmektedir. *A. hydrophila* suşların konvansiyonal testler ve API 20 NE (Şekil 4.2) ile yapılan testlerden elde edilen fenotipik özellikleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Aeromonas izolet agarda yeşil renkli *A. hydrophila* kolonileri



Şekil 4.2. Hızlı teşhis kiti API 20NE ile yapılan *A. hydrophila* identifikasyonu

Çizelge 4.1. *A. hydrophila* suşlarının klasik yöntemler ve Api 20NE hızlı teşhis kitlerine göre fenotipik özellikleri ile ilgili bulgular (22 °C 24 saatlik inkübasyon)

	AHS (Sazan)	AHJ (Japon Balığı)	AHG1 (Alabalık)	AHG2 (Alabalık)	AHG3 (Alabalık)	ATCC 7666
Aeromonas izolasyon agarda üreme	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Yeşil
Gram boyama	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk
S.O.	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+
Hareket	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F
O/129 (50µg)	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
Arginin dihidrolaz	+	+	+	+	+	+
Üre	-	-	-	-	-	-
NO ₃	+	+	+	+	+	+
Triptofan	+	+	+	+	+	+
Eskülin	+	+	+	+	+	+
β Galaktosidaz	+	+	+	+	+	+
Glukoz	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Arabinoz	+	+	+	+	+	+
Mannoz	+	+	+	+	+	+
N-asetil glukozamin	+	+	+	+	+	+
Potasyum glukonat	+	+	+	+	+	+
Kaprik asit	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+
Malik asit	+	+	+	+	+	+
Adipik asit	-	-	-	-	-	-
Trisodyum sitrat	+	+	-	-	-	-
Fenilasetik asit	-	-	-	-	-	-
Jelatin hidrolizasyonu	+	+	+	+	+	+

4.2. Aşı Suşunun Seçimi Amacıyla Yapılan Virülens Çalışmalarına Ait Bulgular

A. hydrophila'nın serolojik ve genotipik olarak çok heterojen bir yapı sergilemesi nedeni ile aşı suşunun seçiminde virülens denemeleri göz önüne alınmış ve virülensi yüksek olan suş seçilmiştir. *A. hydrophila* suşlarının virülens durumlarının belirlenmesi süresinde suşların hepsi balıklara 10⁸ cfu/ml olarak verilmiştir. Suşların

sayımı önceden koloni sayım yöntemi ile yapılmış ve spektrofotometrede 600 nm dalga boyuna karşılık gelen değerde 0,8 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. *A. hydrophila* suşlarının virülens durumlarının belirlenmesi

Suş No	Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Ölüm Oranı (%)	cfu/ml	O.D. (600 nm)
AHS	20	18	%90	1x10 ⁸	0.869
AHJ	20	8	%40	1x10 ⁸	0.880
AHG1	20	-	%25	1x10 ⁸	0.862
AHG2	20	4	%0	1x10 ⁸	0.877
AHG3	20	-	%20	1x10 ⁸	0.860

En yüksek mortalite AHS suşunda, bunu takiben AHJ suşu ve AHG1 suşu takip etmiştir. Bu nedenle *A. hydrophila* suşlarından AHS, AHJ ve AHG1 suşları aşı suşu olarak değerlendirilmiştir. Eprüvasyonlarda da en yüksek virülense sahip olan homolog AHS suşu kullanılmıştır. Bu amaçlarda AHS suşunun LD₇₀ dozu belirlenmiştir.

4.3. LD₇₀ Dozunun Belirlenmesinde Kullanılan Testlerin Sonuçlarıyla İlgili Bulgular

LD₇₀ dozunu tespit edilirken oluşturulan deneysel enfeksiyon sonuçları çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. LD₇₀ oranının tespitinde deneysel enfeksiyon sonuçları

Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Ölüm Oranı (%)	cfu/ml	LD ₇₀ **
20	16	80	1x10 ⁷	
20	14	70	1x10 ⁵	1x10 ⁵
20	7	35	1x10 ³	

* cfu/ml: Mililitredeki canlı bakteri sayısı, ** LD₇₀: Bir balık popülasyonunun %70'ini öldürebilen doz.

Ortalama ağırlıkları 20 g olan balıklara uygulanan 1×10^5 *A. hydrophila* bakterisi (i.p. yolla, 0.1 ml miktarda enjekte edilen) nedeniyle % 70 ölüm meydana gelmiştir. Bu doz (1×10^5 cfu/ml) LD₇₀ değeri olarak balıkların eprüvasyonunda kullanılmıştır.

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

Hazırlanan inaktif aşılarda Japon bağına enjeksiyonundan sonra balıklarda herhangi bir olumsuzluk ve ölüm görülmemiştir. Böylece hazırlanan aşılarda balıklar üzerinde toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Hazırlanan aşılarda toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçları

Aşı	Balık Adedi	Mortalite	Yaşama Oranı (%)
Mono	20	0	100
Mono- FCA	20	0	100
Mono- Glukan	20	0	100
Poli	20	0	100

4.5. Deneysel Aşıların Sağladığı Bağışıklık Seviyesinin Sonuçlarıyla İlgili Bulgular

Deneysel aşılarda etkinliğini değerlendirmek için, çalışmada kullanılan balık grupları LD₇₀ oranında *A. hydrophila* suşuna (1×10^5 kob/ml) maruz bırakılmıştır. Poli – i.p. ile aşılanan balıklarda 50.günde % 100 RPS değeri ile diğer aşı gruplarına göre istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Mono – im aşı grubu istatistiki olarak kontrol grubu ile farklılık göstermemiştir. Poli – i.p. grubunda en yüksek koruma takiben mono – FCA ve glukan adjuvantlı aşı gruplarında elde edilmiştir. Poli – i.p. grubu adjuvantlı gruplardan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p > 0.05$) (Çizelge 4.5, Şekil 4.4).

Yapılan varyans analiz sonuçlarına göre Japon balıklarında *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı yapılan aşı uygulamaları sonucunda deneme gruplarındaki ölen ve yaşayanları sayısı yüzde oranları ve transforme edilmiş değer ortalamaları arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur ($P < 0,05$), (Çizelge 4.5). Ayrıca grup

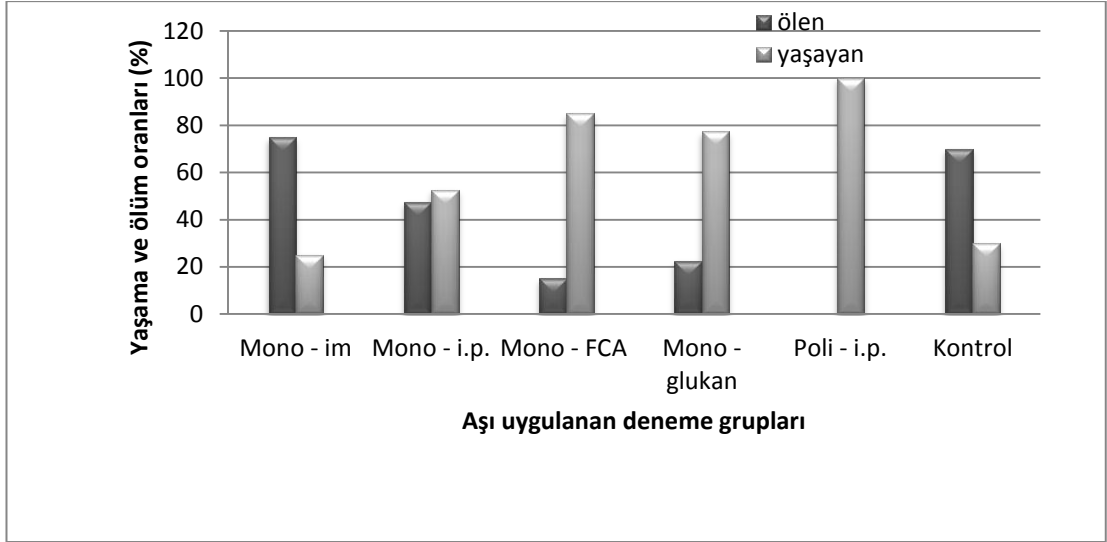
ortalamlarının karşılaştırılması tukey çoklu karşılaştırma yöntemiyle test edilmiştir ($\alpha=0,05$). Aşı uygulamasında kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm gruplarda ölüm oranı ortalamları arasındaki farklılıkların önemli olduğu saptanmıştır ($P<0,05$). Çalışmada mono - FCA ve poli - i.p. 'in uygulandığı grupların ölüm oranı ortalamlarının benzer olduğu ($P>0,05$), bununla birlikte poli – i.p. grubun da hiçbir ölümün olmadığı belirlenmiştir. En yüksek ölüm oranı ortalaması kontrol ve mono – im uygulamalarında tespit edilmiştir. Oransal bir değer olan ölüm oranı gibi değerler normal dağılım göstermezler bu nedenle bu veriler açı (arcsin) transformasyonu yapılarak normal dağılıma dönüştürülmüş ve parametrik yöntemlerden varyans analiziyle hesaplamaları yapılmıştır. Bu uygulamalar sonucunda mono – i.p. ve mono - gluklan uygulamalarının ortalama değerlerinin benzer olduğu görülmektedir ($P>0,05$). Yüzde yaşama oranı ile transforme edilmiş arcsin yaşama oranı analiz değerleri aynı sonuçları vermiştir (Çizelge 4.5. ve şekil 4.3).

Yapılan aşı uygulamaları sonucu en iyi RPS değeri poli - i.p. grubunda elde edilmiş bu grubu sırası ile mono - FCA, mono - gluklan ve mono – i.p. uygulamaları izlemiştir. Mono – im grubunda ise RPS oranı çok düşük bulunmuştur. Hatta bu grupta kontrol grubundan daha fazla ölüm görülmüştür (Çizelge 4.5 ve şekil 4.4). Aşı uygulamalarının deneme grubu bireylerin ölüm ve yaşamaları üzerine etkileri nonparametrik yöntemlerden ki-kare ile analiz edilmiş ve uygulamalar arasındaki farklılığın anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0,05$), (Çizelge 4.5; şekil 4.3-4)

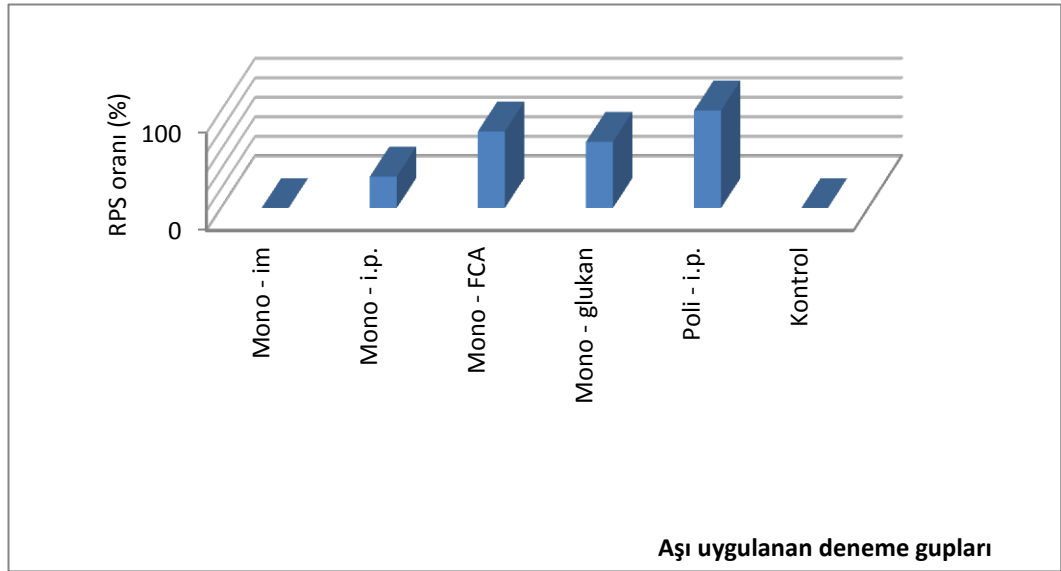
Çizelge 4.5. Japon balığında *A. hydrophila* patojenine karşı aşı uygulamaları 50. günden sonra epruvasyonda ölen ve yaşayanların yüzde oranları, transforme edilmiş değerleri ve RPS oranları

Aşı Uygulama Grupları	Ölüm oranı (%)	ArcSin ölüm Oran(%)	Yaşama oranı(%)	Arcsi Yaşama oran(%)	RPS (%)
	Ort±S.H*				
1 Mono - im	0,750±0,05 ^d	0,851 ±0,07 ^c	0,25±0,05 ^a	0,25±0,05 ^a	0>
2 Mono – i.p.	0,475±0,02 ^c	0,495±0,028 ^b	0,53±0,01 ^b	0,56±0,01 ^b	32,2±0,03 ^a
3 Mono - FCA	0,150±0,05 ^{ab}	0,15±0,05 ^a	0,85±0,05 ^{cd}	1,02±0,09 ^{cd}	78,6±0,7 ^b
4 Mono - gluklan	0,225±0,02 ^b	0,227±0,02 ^{ab}	0,77±0,02 ^c	0,88±0,03 ^c	67,9±0,03 ^b
5 Poli – i.p.	0,000±0,00 ^a	0,000±0,00 ^a	1,00±0,00 ^d	1,57±0,0 ^d	100±0,0 ^c
6 Kontrol	0,700±0,05 ^d	0,777±0,07 ^c	0,30±0,05 ^a	0,30±0,05 ^a	0>

*Ort:ortalama, S.H.: Standart hata, her bir özelliğe ait (sutunlar) değerler üzerindeki aynı harfler grup ortalamları arası farklılığın olmadığını ($P>0,05$) göstermektedir.



Şekil 4.3. Japon balıklarında *A. hydrophila* patojenine karşı aşı uygulamalarının eprüvasyon (50. günden) sonrası ölen ve yaşayanların yüzde oranları



Şekil 4.4. Japon balıklarında *A. hydrophila* patojenine karşı aşı uygulamalarının eprüvasyon (50.günden) sonrası nispi hayatta kalma yüzdeleri (RPS)

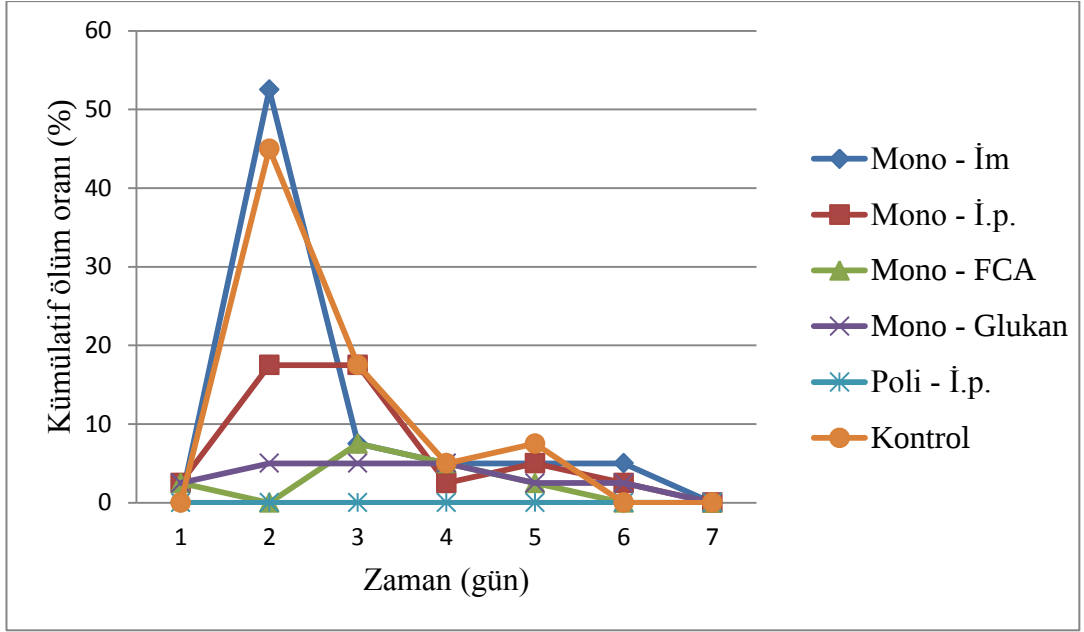
4.6. Deneysel Eprüvasyon Uygulanan Balıkların Semptomları ve Kümülatif Mortalite Oranları

Aşılamanın 50. gününden sonra yapılan patojen uygulamasından yaklaşık 26-27 saatten sonra mono – i.p. , kontrol ve mono – im gruplarında ölümler başlamış ve bu ölümlerde 2 ile 5. günler arasında yoğunlaşmıştır. Beşinci günden itibaren ölümler azalmış ve balıklar 21. güne kadar izlenmiştir. Eprüvasyon sonrası günlere göre

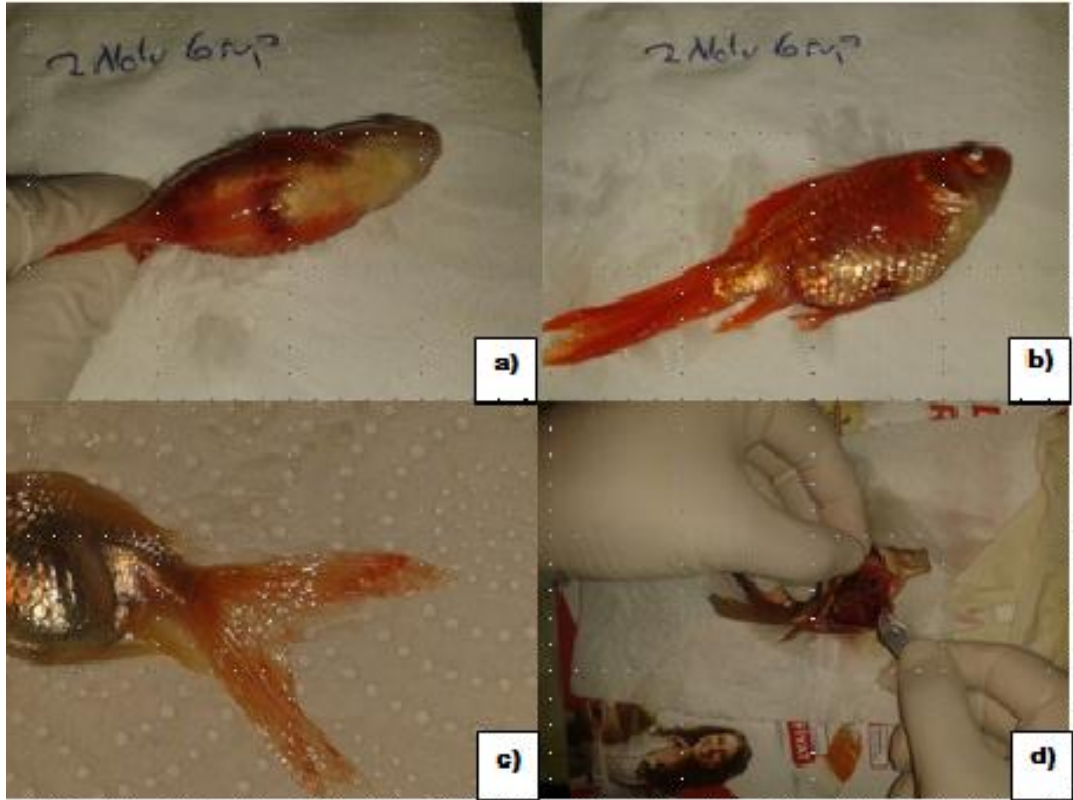
kümülatif mortalite çizelge 4.6 ve şekil 4.5’de verilmiştir. Patojen uygulamasından sonra yeni ölmüş balıklarda re-izolasyonlarda spesifik patojen izole edilmiştir. Patojen verildikten sonra deneysel enfeksiyon sırasında özellikle kontrol grubunda balıklarda yeme ilgi azalmış canlı aktivitelerinde yavaş yavaş değişimler gözlenmiştir. Balıklar karın yüzgecinin biraz üzerinde göğüs yüzgecinin bitiş noktasına yakınında 3-4mm çapında pul dökülmesi ve açık yaraya benzer oluşumlar gözlenmiştir. Hasta ve yeni ölmüş balıklarda tipik abdominal dropsi, vücutta hemorajiler, pulların dikleşmesi ve otopside viseral organlarda hiperemi ve hemorajilerle birlikte iç organların tamamen erimiş bir halde olması en belirgin belirtilerdir (Şekil 4.5).

Çizelge 4.6. Aşılama sonrası 50.günde deneysel eprüvasyon sonucu deneme gruplarında kümülatif ölüm oranı (mortalite)

Zaman (günler)	Mono – im Ö.O (%)	Mono – i.p. Ö.O (%)	Mono - FCA Ö.O (%)	Mono - glukan Ö.O (%)	Poli – i.p. Ö.O (%)	Kontrol Ö.O (%)
1	0	2,5	2,5	2,5	0	0
2	52,5	17,5	0	5	0	45
3	7,5	17,5	7,5	5	0	17,5
4	5	2,5	5	5	0	5
5	5	5	2,5	2,5	0	7,5
6	5	2,5	0	2,5	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
Toplam	75	47,5	15	22,5	0	70



Şekil 4.5. Aşılamada 50. günden sonra deneme gruplarında kümülatif ölüm oranı (%)



Şekil 4.6. Deneysel enfeksiyon sonrası balıklarda a) abdomibal dropsi ve pulların kabarması, b) Abdomende hemoroji, c) Kuyrukta hemoraji d) Viseral organlarda erime

4.7. Lam Aglutinasyon Testi ile İlgili bulgular

Aglutinasyon antijeni ile immun test serumunun lam üzerinde karıştırılması halinde aşılı gruplarda aglütinasyon görülmüştür (Şekil 4.7. a ve b). Aglutinasyonun olduğu lamların ışık mikroskobu altında incelenmesi halinde bakterilerle antikorun oluşturduğu kümeleşmeler gözlenmiştir (Şekil 4.7. a ve b). Lam aglutinasyonda immersiyon yapılan grupta balıklar küçük olduğu için kan alınamamıştır. Kontrol grubunda aglutinasyon oluşmamıştır. Lam aglutinasyon testinde en kuvvetli aglutinasyon mono - FCA adjuvanlı grupta görülmüş bunu sırasıyla poli - i.p. grubu ve mono - im , mono - glukon takip etmiştir.



Şekil 4.7. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antijenin oluşturduğu kümeler
a) Çıplak gözle, b) Işık mikroskobunda

4.8. Mikroaglutinasyon Testi ile İlgili Bulgular

Aglutinasyon antikoru içeren test serumlarının polyester yuvarlak tabanlı mikroparka çukurlarında antijen ile karıştırılması sonucunda gözle görülebilen aglutinasyon çökelekleri oluşmuştur (Şekil 4.8.).

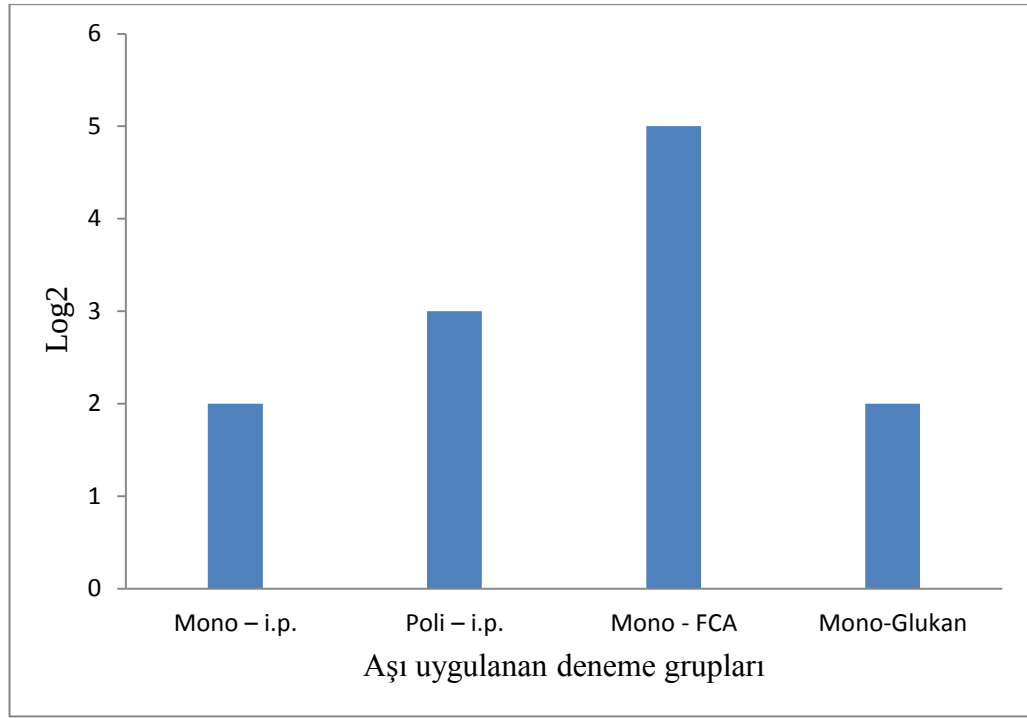
A. hydrophila bakterini ile farklı metotlarla immunize edilen balıklarda 50. günde elde edilen serumlardan hazırlanan mikroaglutinasyon testine ait antikor titre sonuçları Çizelge 4.7. ve Şekil 4.8.' de verilmiştir. Çizelge 4.6.'nin incelenmesinden anlaşılabileceği üzere 50. günde i.p. enjeksiyon yolu ile aşılanan mono - FCA 1/32, poli - i.p. 1/8, mono - i.p. ve mono - glukon uygulanan gruplarda 1/4 dilüsyonunda aglütinasyon görülmüştür.



Şekil 4.8. Mikroaglutinasyon test sonuçları

Çizelge 4.7. Farklı aşılama yöntemleri uygulanarak immunize edilen balıkların immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri

İmmünizasyon sonrası günler	Deneme grupları							
	Mono – i.p.		Poli – i.p.		Mono - FCA		Mono- Glukan	
		Log ₂		Log ₂		Log ₂		Log ₂
50	1/4	2	1/8	3	1/32	5	1/4	2



Şekil 4.9. Farklı aşılama yöntemleri uygulanarak immunize edilen Japon balıklarının kan serumunda oluşan aglutinin titrelerinin (Log_2)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanlarda ve balıklar dahil olmak üzere diğer hayvanlarda aşılama bulaşıcı hastalıkların önlenmesi açısından önemli bir metottur. Enfeksiyonlar sırasında karşılaşılan patojenlere karşı aşılama konakçının bağışıklık sistemini harekete geçirir (Thompson ve Adams, 2004). Akuakültür sektöründe aşılama çalışmaları hastalığın yol açtığı ekonomik kayıpların azaltılmasında çok önemli bir basamak olarak kabul edilmiştir (Ellis vd., 1997; Rahman ve Kawai, 2000; Ebanks vd., 2004). Şu anda *A. hydrophila*'ya herhangi bir ticari aşı bulunmamasına rağmen deneysel olarak tüm hücre (WC), dış membran proteinleri (OMP), ekstrasellüler proteinler (ECP), LPS ve biofilmlı aşılar değişik adjuvantlarla birlikte denenmektedir.

Farklı balık türlerinde *A. hydrophila* tarafından oluşan enfeksiyonları önlemek amacıyla deneysel aşılar yapılmış olmasına rağmen, uygun ticari aşı mezofilik, hareketli *Aeromonas* türlerinin büyük fenotipik ve serolojik heterojenite (hareketli *Aeromonas* grubu içinde yaklaşık 100 serotipin varlığı bildirilmiştir) göstermesinden dolayı gerçekleştirilememiştir.

Araştırmaların sonuçları değerlendirildiğinde *A. hydrophila* patojenine karşı belli bir bölgeden izole edilen bakterilerle hazırlanacak aşılarda o bölge için koruyuculuk sağlayacağı söylenebilir.

Ayrıca yapılan çalışmalar araştırmacıların ülkelerinde ki ekonomik öneme sahip türler üzerinde yoğunlaşmıştır. Akuakültürde önemli türlerden biri olan gökkuşağı alabalığının son dönemlerde *A. hydrophila* enfeksiyonuna sıkça maruz kalması da göz önünde bulundurularak aşı çalışmaları daha çok bu balık türü üzerinde olmakla birlikte, Japon balıklarında da hareketli aeromonad septisemi sıklıkla görülmesi nedeni ile Japon balıkları üzerinde de az sayıda olsa çalışmalar mevcuttur. Japon balıkları için önemli bir patojen olan *A. hydrophila* karşı aşılarda denenmesi büyük önem arz etmektedir.

Aeromonas'a karşı en iyi koruma yöntemi; iyi bir hijyen, yüksek stok yoğunluğundan kaçınma, elle müdahaleyi en aza indirmek gibi önlemlerle birlikte etkin aşılarda geliştirmektir. Süs balıklarında da aşı çalışmaları önümüzdeki yıllarda önem kazanacak ve bu sektörde de aşılama programları oluşacaktır.

Balıklarda aşılama yöntemleri; immersiyon, oral ve enjeksiyon olmak üzere 3 temel uygulama yöntemi vardır. İmmersiyonla aşılama küçük balıklarda uygulama kolaylığı nedeni ile özellikle ilk aşılama tercih edilmektedir.

İmmersiyon günümüzde birçok bakteriyel enfeksiyona (Yersiniozis, Vibriozis, Frunkulozis) karşı kullanılmaktadır. İmmersiyon uygulamalarında daha az stres, maliyetin azlığı, kısa sürede birçok balığın aşılınması gibi avantajları vardır. Ancak etkisi ve etki süresi enjeksiyona göre daha az ve daha kısa sürelidir (Ellis 1998; Kav ve Erganiş, 2007). Navot vd. (2011), Japon balıklarında ülser hastalığına karşı yaptıkları çalışmada *A. salmonicida* bakteri süşun parçalamak için ultra ses ışınlama (Ultrasou irradiation; USI) yöntemini ile eriyik A-layer proteinler (AP) ve formalinle inaktif ederek hazırladıkları aşılari kullanmıştır. Eriyik antijenin immersiyon yönteminden deriden alınıın kapasitesinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar USI tekniğinin immersiyon aşılarda iyi bir koruma sağladığını belirtmişlerdir. Yaptığımız araştırmada, 3g'lık Japon balıklarına *A. hydrophila* karşı imersiyon aşısı uygulanmış 30. günde tekrar immersiyon uygulaması yapılmış ve 50. günde spesifik patojen i.p. enjeksiyonla verildiğinde %75 ölüm gözlenmiştir. Ölüm oranı kontrol grubunda daha yüksek seyretmiştir. Navot vd. (2011) yaptıkları çalışmada eriyik antijen kullanmışlar, biz ise bu çalışmada formaldehitte öldürölmüş tüm hücre antijenleri kullandık. Yapılan çalışmalar eriyik antijenin banyo yöntemi aşılarda antijen alımını çok iyi sağladığı humoral immunité yanı sıra hücresel bağışıklığın etkili olduğu söylenebilir. Yaptığımız çalışmada *A. hydrophila*' ya karşı immersiyon aşıda koruyuculuk olmadığı görölmüş ve balıklar küçük olduğu için serumda antikor varlığına bakılamamıştır. İmmersiyon gurubunda ölüm oranının kontrol grubundaki balıklardan fazla olmasının nedeni immersiyon la aşılanan balıkların küçük olmasından dolayı eprüvasyonda yapılan enjeksiyon uygulamasına bağlı olabileceğı düşünölmektedir.

Bastardo vd., (2012)' de yaptıkları çalışmada gökkuşağı alabalıklarında *A. hydrophila* ve *L. garvieae* karşı farklı aşılama yöntemlerinin etkinliğini incelemişlerdir. Bu çalışmada her iki patojenlere karşı koruması gözlenmiş, tüm aşılınmış balıklarda RPS oranı %76'dan daha bulunmuştur. Koruma seviyesi özellikle sulu bivalent aşı (AqBV) ile aşılınmış balıklarda 90. günden sonra *A. hydrophila* ve *L. garviae* karşı sırasıyla % 85.1 ve % 76.2 oranında elde edilmiştir. Monovalan aşının gökkuşağı alabalığında *L. garviae* ve *A. hydrophila* karşı

kullanılan monovalan sulu aşılar da daha yüksek koruma sağladığı tespit edilmiştir. Bu çalışma gökkuşağı alabalığının direncinin hem sulu hem de adjuvanlı iki değerlikli aşı ile aşılama dan sonra serum antikor üretiminin yüksek olması ile göstermiştir. Bu sonuçlar, mineral yağ bazlı olmayan adjuvanlı maddelerin aşı ile birlikte kullanılması diğer çalışmalar ile uyumlu olarak gökkuşağı alabalığında *A. hydrophila* ve *L. garviae* bakterilerine karşı başarılı bir koruma sağladığı ve koruma süresini uzattığı belirtilmektedir (Anderson, 1997; Romalde vd., 2005; Ravelo vd., 2006). Bu mineral yağ bazlı olmayan adjuvanların vücutta depo etkisi yaparak antijenin yavaş bir şekilde doku veya kana girmesini–karışmasını–serbest bırakılmasını sağladığı ve ayrıca humoral immun tepkiyi uzatıp artırmasından kaynaklanmaktadır.

Loghothetis ve Austin (1994), yaptıkları çalışmada gökkuşağı alabalığına injeksiyon, immersiyo n ve oral olarak uygulanan *A. hydrophila* aşısı sonucu serumdaki antikor üretiminde artış gözlemlemişlerdir.

Areechon vd., (1992), balıklarda bağışıklığa verilen tepkinin kullanılan aşı tipine bağlı olarak değiştiğini belirtmiştir. *A. hydrophila* karşı aşılama ile balıklarda oluşan direnç çeşitliliği izolatlar arasında yüksek heterojenite göstermesinde dolayı *A. hydrophila* için başarılı aşı gelişiminde büyük bir sorun ortaya çıkmıştır. Swain vd. (2007), *Labeo rohita* balığında *A. hydrophila* karşı polivalan ve monovalan aşılama dan sonra balıklarda 30. günde serumda aglütinasyon titresinin maksimum değerde olduğunu tespit etmişlerdir. Bastardo vd. (2012), gökkuşağı alabalığında *A. hydrophila* karşı aşılama nın balıklarda yüksek antikor titresi tespit edildiği rapor edilmiştir. Bu sonuçlar başka türde '*Oreochromis niloticus*'un' *A. hydrophila* patojenine karşı oluşan doğal antikor seviyeleri ile benzer olduğu bildirilmiştir (Ahmed vd., 2010).

Yaptığımız çalışmada, farklı metotlarla *A. hydrophila* bakterisi ile immunize edilen balıklardan 50. günde elde edilen serum örneklerinden hazırlanan mikroaglutinasyon testine ait antikor titreleri; mono - FCA 1/32, poli – i.p. 1/8, Mono - ip ve Mono - glukan uygulanan gruplarda 1/4 dilüsyonunda aglütinasyon görülmüştür. Lam aglutinasyon testinde de gruplarda kuvvetli bir aglutinasyon oluşmuştur. Koruma yüzdesi en yüksek olan polivalanlı aşıya göre mono – FCA grupta daha iyi bir aglutinasyon oluştuğu tespit edilmiştir. Aglutinasyon titresinde yüksek titrasyon

görülmesinin nedeni adjuvantın antijeni depolaması ve yavaş sunumu sonucu olabileceği kanısı oluşmuştur. Bazı balık patojenlerinde koruma oluşmasına rağmen antikor oluşmadığı bildirilmektedir.

Araştırmacılar da aşının koruyuculuğunu belirlerken sadece antikor varlığının koruyuculuğu belirlemediği üzerinde durmaktadırlar. Yapılan bu çalışmada *A. hydrophila* aşılara karşı diğer araştırmacıların belirlediği gibi antikor tespit edilmiştir (Swain vd., 2007; Ahmed vd., 2010; Bastardo vd., 2012). Bu sonuç, *A. hydrophila*'nın immünojenik doğasının yüksek olduğunun bir göstergesi olarak desteklemektedir.

Lamers vd. (1985) yılında sazanlara uyguladıkları, ısıyla inaktif edilmiş daldırma *A. hydrophila* aşısının serum antikor düzeylerinde bir artış sağladığını gözlemlemişlerdir.

Kusuda vd., (1987) yılında sazanlarda uygulanan formalinle inaktif edilmiş *A. hydrophila* aşısı sonucunda total serum protein konsantrasyonlarında bir artış gözlemlediğini tespit etmişlerdir.

Rahman ve Kawai (2000) yılında Japon balığında *A. hydrophila*'ya karşı hazırlanan aşılarda *A. hydrophila*'ya karşı yüksek bir koruma sağladığı ve aşının etkin olduğunu belirtmişlerdir.

Chandran vd., (2002) yaptıkları çalışmada ısı ile inaktif ve formalinle inaktif ECP (ekstrasellüler protein) ile oluşturulmuş polivalan aşı ve iki tür hint sazan türünde denenmiş fakat *A. hydrophila* karşı korumada sağlanamamıştır.

Nayak vd., (2004) biyofilmli serbest hücre aşılıyla beslenen kanal yayın balıklarında *A. hydrophila* ile yapılan epruvasyon sonucunda yüksek bir serum aglütinasyon antikor titresi ve RPS değeri gözlemlemişlerdir.

Poobalan vd., (2010) sazanlara karşı 6 virulent *A. hydrophila* suşu ile adjuvant ile birlikte i.p. enjeksiyon yolu ile verilmiştir. Yapılan aşılamada sonucunda % 56-87 oranında RPS bulunmuştur. Bu çalışmada sonuçlar ki-kare testine göre değerlendirilmiş ve anlamlı bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda kullandıkları 6 farklı virulent suş için adjuvantlı aşığı koruma sağlayabilir ve kullanılabilir olarak değerlendirmişlerdir.

Thanga vd., (2013), Japon balıklarında *A. hydrophila* karşı hazırlanan farklı aşilar ile aşılanmıştır. OMP ve BF aşı grupları hayatta kalma oranının ECP grubuna göre daha yüksek ve daha iyi bir koruma elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada adjuvant olarak kullanılan Kuşkonmaz OMP ve BF aşilar ile birlikte bağışıklık güçlendirmeye yardımcı olduğu, balık üzerinde güvenli ve kuvvetli adjuvant olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırma, mono - im, Poli - i.p., mono - i.p., mono - glukan, mono - FCA enjeksiyon gruplarından oluşmuştur. Aşılanan balıklarda 50.günde yapılan epruvasyonda poli - i.p. % 100, mono - FCA'da % 78,6, mono - glukanda % 67,9, mono - im %32 RPS değeri tespit edilmiştir. İmmersiyon yolla aşılanan balıklarda 50. günde sağlanan koruma istatistiki olarak kontrol grubu ile farklılık göstermemiştir. Japon balıklarında 3 farklı tür balıktan izole edilen ve mevcut suşlar arasında en fazla virülense sahip olan suşlarla hazırlanan karma aşının balıklarda çok iyi bir koruma oluşturduğu gözlenmiştir. Polivalan aşilar balıklarda çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri suşlarının geniş “mikro organizma” yelpazesine karşı koruma avantajı sağladığı gibi, Gram negatif bakteriler ve aynı türün farklı suşlarından oluşan karma aşilarında etkili olduğu görülmektedir. Bir polivalan aşının başarısı genellikle başlangıç antijene konsantrasyonu ile çapraz reaktivite ve farklı antijen arasındaki rekabet ile ilgilidir. Bu çalışmada, *A. hydrophila* karşı farklı izolatlardan oluşan karma aşı koruması sağlanmıştır, bu da bakteri patojenleri arasında antijenik kompetisyon olmadığı ve heterojen bir yapı gösteren *A. hydrophila*'nın antijenite özelliğinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Adjuvant kullanılarak aşılanan balık gruplarında aşılanan grupta 50. günde elde edilen koruma kontrol grubundan istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Yapılan aşı uygulamaları sonucu en iyi RPS değeri Poli - i.p. grubunda elde edilmiş bu grubu adjuvant aşı içeren mono - FCA izlemiştir. FCA, deneysel amaçla kullanılan en yaygın ve etkili bir adjuvanttır. Ancak balık ve diğer canlılarda enjeksiyon bölgesinde guroculoma oluşturmakta ve yangısal reaksiyonlar gibi yan etkileri olduğu bildirilmiştir (Aydın, 1994c; Candan ve Karataş 2010; Tafalla vd., 2013). Bu çalışmada ise Japon balıklarında enjeksiyon bölgesinde herhangi bir yangısal reaksiyona rastlanmamıştır. Ayrıca FCA kullanımı her zaman balıklarda immunojenitenin yada korumanın artmasına sağlayamadığı rapor edilmiştir. Kawakami vd., (1998) sarıkuyruk balıklarında (*Seriola quinqueradiata*) Pasteurellosis hastalığına karşı *Photobacterium damsela* aşısı ile FCA'nın birlikte kullanımını sonucu korumada belirgin bir artış olmadığı belirtmiştir. Soltani vd. (2007), gökkuşığı alabalıklarında formalinle

öldürülmüş inaktif *Streptococcus iniae* ile iyi bir koruma sağlanırken, aşıda FCA' nın varlığında belirgin bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Fang vd. (2004), gurami'lerde (*Trichogaster trichopterus*) *A. hydrophila*'nın, dış zar proteini FCA içinde aşı olarak kullanılmış ve balıklara i.p. olarak enjekte edildikten 3 hafta sonra FCA olmaksızın bir rapel aşı uygulaması yapılmıştır. Bu uygulamadan iki hafta sonra yapılan eprüvasyondan sonra FCA'lı aşı ile rapel uygulanan FCA'sız aşının aynı korumayı sağladığı bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise yukarıdaki araştırmacılardan farklı olarak FCA' nın Japon balıklarında *A. hydrophila* patojenine karşı istatistiki olarak iyi bir koruma sağladığı gözlenmiştir. Benzer bulgular *Oncorhynchus kisutch* 'yla yapılan bir çalışmada, formalinle öldürülmüş *Aeromonas salmonicida* i.p. olarak FCA ve FCA'sız enjekte edilmiştir. En iyi koruma FCA adjuvantlanmış aşı için bulunmuştur. Ayrıca antijen olmadan FCA enjekte edilen balıklarda da 90 gün korumanın meydana geldiği rapor edilmiştir (Olivier vd., 1985). Brenek vd. 2002, havuz balıklarına (*Carassius carassius*) *Trypanosoma danilewskyi* aşısı ile birlikte FCA enjekte etmiş ve bu enfeksiyonuna karşı koruyucu bir etki sağladığını bildirmişlerdir. Grabowski vd., (2004), *Flavobacterium columnare* 'nin formalinle öldürülmüş sonike edilmiş tüm hücre antijeni ile FCA nın birlikte i.p. yoldan verildiğinde 2 hafta içinde mukus ve plazmada antikor belirlendiği 2. immunizasyondan sonra antikor seviyesinin arttığı ve immunizasyondan sonra 10 hafta kadar yüksek kaldığı bildirilmiştir. Högfors vd. (2008), gökkuşağı alabalıklarında *Flavobacterium psychrophilum* 'dan elde edilen protein antijeni ile FCA birlikte enjeksiyonla balıklara verildiğinde antijen tek verildiğinde koruma oluşturmazken, FCA ile birlikte verilmesi durumunda koruyucu etkisi olduğunu kaydetmişlerdir. Chettri vd., (2009) *Poecilia reticulata* 'da *Tetrahymena* sp. ile FCA nın birlikte immunizasyonu sonucunda patojene karşı koruyuculuğun arttığını ve buna bağlı olarak balıklarda mortalite oranının %15 civarında düştüğünü bildirmişlerdir. LaPatra vd., (2010), *A. hydrophila* aşısı ile FCA' nın ip olarak verilmesi ile iyi bir korumanın oluştuğu bildirilmiştir. Kato vd., (2012) Japon pisi balıklarında (*Paralichthys olivaceus*) Nocardiosis'e karşı *Mycobacterium bovis* heterolog patojenlere karşı spesifik olmayan immunitiyi uyarması sonucu korumanın artmış olabileceği belirtilmiştir.

Monovalan + Glukan ilave edilen adjuvantlı grupta Monovalan + Rapel uygulamalarından daha iyi koruma tespit edilmiştir. Ancak RPS % 70 i geçememiş

ve korumanın yeterince iyi olmadığı görülmüştür. Buna ek olarak, β -glukan birçok araştırmacı adjuvant olarak etkili olduğunu bildirmişlerdir (Niki vd., 1991 ; Chen ve Ainsworth, 1992 ; Rorstad vd., 1993 ; DeBaulney vd., 1996 ; Midtlyng vd., 1996; Figureas vd., 1998; Midtlyng vd., 1998; Ashida vd., 1999; Kamilya vd., 2006; Selvaraj vd., 2005).

DeBaulney vd. (1996) yılında kalkan balıklarına vibriosis karşı bir oral aşı hazırlayarak 5 gün aşılı yem ile beslememişler aşılı balıklar 28 gün sonra epruvasyon uygulamışlardır. Aşı ve β -glukan kullanılan aşıda % 61 RPS, yalnız aşı verilen balıklarda % 52 oranında RPS elde etmişlerdir. Glukanlı grup daha yüksek RPS ye sahip olmasına karşın istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Figureas vd., (1998) *Vibrio damsela* ' ya karşı β -glukan ile *V. damsela* O-antijen i.p. enjekte ettiklerinde en yüksek bağışıklık yanıtı elde etmişlerdir. Aşı etkinliğinde bir fagositik indeksi geliştirdiği, aynı zamanda benzer sonuçlar, antikor titrelerinde de elde edilmiştir. Rorstad vd., (1993), maya glukan (β -1,3-D-glukan) *A. salmonicida* ve *Vibrio salmonicida* formalinle öldürülmüş aşılar β -glukan ile veya glukansız ip enjeksiyonla salmon balıklarına verilmiştir. Aşılamadan sonra 3-4 hafta sonra yapılan epruvasyon sonuçlarında frunkulozise karşı β -glukan önemli ölçüde glukansız gruba göre yüksek bir koruma göstermiştir. Ancak β -glukan tek başına verildiğinde 11 hafta sonra koruma oluşturmamıştır. Bir başka çalışmada, tek başına frunkulozise karşı β -glukan ile adjuvanlanmış aşılar ile 6 hafta koruma sağlanırken 3.ve 6. ayda koruma tespit etmemişlerdir (Midtlyng vd., 1996; 1998). Bir başka çalışmada Niki vd., (1991) yılında coho salmonlarına formalin uygulanmış *A. salmonicida* bakterini ile aşılama sonrası koruma incelendiğinde, Vitastim-Taito ve lentinan gibi β -glukan içeren grup üzerinde hayatta kalma oranı istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmişlerdir. Ancak, aglutinin düzeyleri immunostimulantlı gruplarda daha düşük bulunmuştur. Hint sazanlarına formalinle inaktive *A. hydrophila* aşısı β -glukan ile birlikte verildiğinde RPS % 67.7 glukansız grupta ise % 58.0 olarak tespit edilmiş ancak istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Kamilya vd., 2006). Ancak β -glukan mevcudiyetinde ölüm oranında bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. *A. hydrophila* ile β -glukan aşılamadan önce ip verildiğinde yüksek bir antikor titresini görülürken Aşılamadan önce β -glukan ile banyo ve oral uygulama yapılan grupta antikor gelişmemiştir (Selvaraj vd., 2005). Glukanın adjuvant etkisi bazı araştırmacılar tarafından etkili bulunurken bazıları tarafından etkisiz bulunmuştur. Yaptığımız

Çalışmada da poli – i.p. gruptan sonra mono - FCA’lı grup en iyi RPS değeri göstermiştir.

A. hydrophila aşıların antijenik çeşitliliğinin yüksek olmasından dolayı etkili aşıların geliştirilmesi oldukça güçtür ve bu patojene karşı henüz ticari bir aşı geliştirilememiştir. Ancak son zamanlarda *A. hydrophila* karşı koruma oluşturan deneysel aşıların geliştiği ve otovaksin aşıların kullanıldığı görülmektedir. Akuakültürde çok çeşitli aşılar kullanılmasına rağmen akvaryum balıklarında henüz ticari aşılar kullanılmamakta ve deneysel aşılarda son yıllarda önem kazanmıştır.

Sonuç olarak; Japon balığı tatlı su akvaryum balıkları içerisinde önemli bir türdür. Japon balığı yetiştiriciliğinde en sık rastlanan enfeksiyonlardan birisi olan hareketli aeromonas septisemi hastalığına karşı aşı geliştirilen bu çalışmada hastalıktan korunmak için iyi bir hijyen ve aşı programının yapılması gerekliliği ortaya konulmuştur.

1. Yaptığımız araştırmada; Japon balıklarında farklı türden izole edilen *A. hydrophila* suşlarını içeren karma aşıların etkili olduğu saptanmıştır. Bu patojene karşı yapılan aşılarda farklı izolatların birlikte kullanılmasının antijenik çeşitliliği artırdığı ve daha çok hücresel bağışıklıkla iyi bir koruma sağladığı dşnlmektedir.
2. Adjuvantlardan FCA’ nın glukana göre *A. hydrophila* aşısında etkili olduğu görülmüştür. Çalışmanın daha uzun süre devam ettirilmesi halinde yağ bazlı bu adjuvantla koruma süresinin daha uzun olabileceği dşnlmş bu bağlamda bu adjuvantla en az 6 ay sonra koruma süresinin değerlendirilmesi çok faydalı olacaktır.
3. Aşı uygulamalarından enjeksiyonun beklenildiği gibi daha iyi bir koruma oluşturduğu görülmektedir. Ancak bu yöntemin büyük ve ana Japon balıklarına uygulanması pratiktir. İmmersiyon yolu ile aşı çalışmasında tüm hücre antijenlerin vcoda alımı iyi bir şekilde gerçekleşmemektedir. Bu nedenle yapılan çalışmaların incelenmesinde görülmüştür ki balıklar kk balıklarda eriyik antijenlerin denenmesi faydalı olacaktır.

Japon balıklarında bölgesel izole edilen suşlardan başarılı aşıların yapılması mümkün olduğu çalışmamızla tespit edilmiştir. Özellikle Japon balığı üretimi yapan işletmelerde balıkların aşılanması işletmenin ekonomisi açısından çok faydalı olacaktır.

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.
- Ahmed, N.I., Atta, N.S. Aziz, A.E. Ahmed, M. 2010. Oral vaccination of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against motile Aeromonas septicaemia, Nat Sci, pp. 21–26
- Akhlaghi, M., 1999. Passive immunisation of fish against vibriosis, comparison of intraperitoneal, oral and immersion routes. Aquaculture, 180,191–205.
- 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.
- Alpbaz, A., 1984. Akvaryum Tekniği ve Balıkları. Acargil Matbaası, İzmir, 300s.
- Alpbaz, A., 1991. Japon Balığı Üretimi. Alp Yayıncılık, İzmir, 143s.
- Alpbaz, A., 1993. Akvaryum tekniği ve balıkları. MAS Ambalaj Sanayi ve Ticaret A.Ş., İzmir, 403s.
- Alpbaz, A., 2000. Akvaryum Balıkları Ansiklopedisi.214s.
- Altinköprü, T., 1983. Japon Balıkları. Gül Matbaası, İstanbul, 88s.
- Amend, D.P., Johnson,K.A., Croy,T.R., Mccarthy, D.H., 1983. Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins . Journal of Fish Diseases, 6, 293-299.
- Andersen, D.P., 1974. Fish Immunology, Diseases of Fishes Ed. By S. Snieszko, H. Axelrod T.F.H. Publications, 239s.
- Anderson, D. P., 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish:
- Anderson, D.P., 1993. Fluorescent Antibody Test. Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303 USA, 1-8.
- Anderson,D.P.,1997. Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish,R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng, F. Brown (Eds.), Fish vaccinology, Switzerland: Karger, Basel, 257–265
- Anguita, J., Rodríguez-Aparicio, L.B., Naharro, G., 1993.Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. Appl Environ Microbiol., 59(8), 2411-2417.
- Anonim, 2011. İnternet Sitesi. <http://www.fao.org/fishery/topic/13611/en>. Erişim Tarihi. 10.12.2011.

- Aoki, T.,1999. Motile Aeromonads: *Aeromonas hydrophila*, In Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections (edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno), CABI Publishing, 0 85199 1947.
- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Diker, K.S., 1994. İmmunoloji. Medisan Yayınevi, 394s. Ankara.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyüpoğlu M., 1995. Balık Hastalıkları. Medisan, 61, Ankara, 230s.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyüpoğlu, M., 2002. Balık Hastalıkları. Medisan Yayınevi, ISBN 75-7774-53-7, Ankara.
- Areechon, N., Kitanchaen, N., Tonguthi, K., 1992. Immune response of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) to vaccination against *Aeromonas hydrophila* by injection, immersion and oral administration, in: J.S. Langdon, G.L. Enriquez, S. Sukimin (Eds.), BIOTROP Spec Publ, vol. 48 (), pp. 143–151
- Arkoosh, M.R., Kaattari, S.L., 1993. Quantitation of Fish Antibody to a Specific Antigen by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303, 15-24p. USA.
- Ashida, T., Okimasu, E., Ui, M., Heguri, M., Oyama, Y., Amemura, A., 1999. Protection of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* against Experimental Edwardsiellosis by Formalin-killed *Edwardsiella tarda* in Combination with Oral Administration of Immunostimulants. Fisheries science. 65, (4), 527-530.
- Austin, B., Austin, D. A., 1987. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Limited, Chichester, 0-85312-844-8.
- Austin, B., Austin, D. A., 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish, Third (Revised) Edition, Praxis Publishing Ltd, Chichester, 1-85233-120-8.
- Austin, B., Austin, D.A., 1999. Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish, Third Edition, Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, 120s.
- Austin, B., Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish 4th edition. Springer-Praxis publishing, Chichester, 594p. UK.
- Aydın, N., 1994a. Aşılar, Aşılamaların Genel Prensipleri ve Immunoterapi. İmmunoloji. (Nida, M. Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., Özgür, M., Diker, S., eds). Neslihan Yayınevi ANKARA. 273-290.
- Aydın, N., 1994b. Immunostimulasyon ve Immunostimulantlar. İmmunoloji (Nida, M. Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., Özgür, M., Diker, S., eds). Neslihan Yayınevi. ANKARA. 291-294.
- Aydın, N., 1994c. Adjuvantlar. İmmunoloji. Neslihan Yayınevi. ANKARA. 305-312.

- Azad, I.S., Shankar K.M., Mohan C.V., Kalita B., 2000. Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carps and common carp following oral vaccination – antigen localization by a monoclonal antibody. *Diseases of Aquatic Organisms* 43, 103-108.
- Baba T., Imamura J., Izawa K., Ikeda K., 1988. Immune protection in carp, *Cyprinus carpio* L., after immunization with *Aeromonas hydrophila* crude lipopolysaccharide. *Journal of Fish Diseases* 11, 237-244.
- Bailone, R.L., Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Pedrotti, F.S., Nunes, G.C., 2010. Haematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Arch Med Vet*, 42, 221–227.
- Bastardo, A., Ravelo C., Castro N., Calheiros, J., Romalde, J.L., 2012. Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) *Fish & Shellfish Immunology* 32, 756-761
- Baylan, O., Yılmaz, S., 2004. İntestinal ve Ekstra intestinal İnfeksiyonların Bir Etkeni: *Aeromonas*. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 34, 262-272.
- Bilgehan, H., 1993. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Barış Yayınları, Fakülteler kitapevi, 587s. İzmir.
- 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.
- Brennek, D.R., Plouffe, D.A., Wiegertjes, G.F., Belosevic, M., 2002. Immunization of goldfish with excretory/secretory molecules of *Trypanosoma danilewskyi* confers protection against infection, *Developmental and Comparative Immunology*, 26: 649-657. doi: 10.1016/S0145-305X(02)00018-6
- Bruno, D.W., Poppe, T.T., 1996. A Colour Atlas of Salmonid Diseases, Academic Press, London, 0-12-137810-1.
- BulleBuchmann, 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.
- Bullock, G.L., Anderson, D.P., 1984. Immunization Against *Yersinia ruckeri*, Cause and Enteric Redmouth Disease. (Symposium on Fish Vaccination. Theoretical Background and Practical Results on Immunization Against Infectious Diseases. 20-22 February, O.T.E. 151-166 pp., PARIS.
- 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.

- Busch, R.A., 1982. Enteric Redmouth Disease. Symposium International de Talloires. 10-12 May 1982, Les Antigenes des Micro-organismes pathogènes des Poissons. Collection Fondation Marcel Merieux. 201-224.
- Camus, A.C., Durborow, R.M., Hemstrest, W.G., Thune, R.L., Hawke, J. P., 1998. *Aeromonas* Bacterial Infections- Motile Aeromonad Septicemia, SRAC Publication No:478.
- Candan, A., Karataş, S., 2010. Balık Sağlığı. ISBN:978-605-88665-0-8. Kalmak Ofset.
- Chandran M.R., Aruna B.V., Logambal S.M. And Michael R.D., 2002. Field immunization of Indian major carps against *Aeromonas hydrophila* by immersion. Journal of Aquaculture in the Tropics 17, 311-318.
- Chen, D., Ainsworth, J., 1992. Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. Journal of Fish Diseases. 15, 295-304.
- Chettri, J.K., Leibowitz, M.P., Ofir, R., Zilberg, D., 2009. Protective immunization against *Tetrahymena* sp. infection in guppies, Fish and Shellfish Immunology, 27: 302-308. doi: 10.1016/j.fsi.2009.05.013
- Cipriano, R. C., 2001. *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish, Fish Disease Leaflet, 68.
- Collins, C.H., Lyne, P.M., 1976. Microbiological Methods. Butterworths, 521p. London-Boston.
- Çağırğan, H., Tanrıkulu, T., Tokşen, T., 1996. Balık Hastalıkları Özel Sayı Veteriner Kontrol ve Araştırma Müdürlüğü Dergisi, 20, 34-44.
- Çelikkale, M.S., 1988. İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği Karadeniz Teknik Üniversitesi. Sürmene Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Y.O., Cilt 2, yayın No:128, K.T.Ü. Basımevi, Trabzon, 387s.
- Dalmo, R.A., Bogwald, J. 2008. β -glucans as conductors of immune symphonies. The 7th International Symposium on Fish Immunology in Stirling, 2007. Fish & Shellfish Immunology, 25.(4). 384-39.
- DeBaulney, M., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F., Le Gouvello, R., 1996. Effect of longterm oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis Aquat Org. 26. 139-147
- De Figueredo, J. And Plumb, J. A., 1977, Virulence of Different Isolates of *Aeromonas hydrophila* in Channel Catfish, Aquaculture, 11, 349 - 354.
- Dehghani, S., Akhlaghi, M., Dehghani, M., 2012. Efficacy of Formalin-Killed, Heat-Killed and Lipopolysaccharide Vaccines Against Motile Aeromonads Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Global Veterinaria 9 (4): 409-415, ISSN 1992-6197 © IDOSI Publications.

- Demirsoy, A., 1993. Yaşamın Temel Kuralları. Omurgalılar/Anamniyota, Cilt III/Kısım I, Metekan A.Ş. Baskı Tesisleri, Ankara, 684s.
- Ebanks, R.O., Dacancy, A., Goguen, M., Pinto, D.M., Ross, N.V., 2004. Differential Proteomic analysis of *Aeromonas hydrophila* outer membrane protens in response to low iron and in vivo growth conditions. *Proteomics* 4. 1074-1085.
- Ekingen, G., 1988. Balık Sistematiği. Tolga Ofset, Elazığ, 225s.
- Ellis, A.E., 1988. General Principles of Fish Vaccination. In: Fish Vaccination, (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press Ltd., London, pp.1-19.
- 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., 1989. Use of vaccines in controlling fish diseases. *Developmental and Comparative immunology*.13(4), 399.
- Ellis, A.E., 1997. Vaccination Against Bacteria. Fish Vaccination Training Course. 14– 17 April, Netherland.
- Erdal, J.I., 1989. Vaccination of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Against Different Serovars of *Yersinia ruckeri*. Disease of Fish and Shellfish, IV. EAFF International Conference, September 24-28, Spain. Book of Abstract, 78.
- Ergönül, M. B., Yavuzcan, H., Altındağ, A., 2012. Balık Sağlığı ve İmmunostimulanların Kullanımı, *Journal of FisheriesSciences.com*, 6(3): 188-202
- 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.
- Fang, H.M. Ge, R., Sin, Y. M., 2004. Cloning, characterisation and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesin. *Fish & Shellfish Immunology*, P. 645-658.
- Figueras, A., Santarém, M M., Novoa, B., 1998. Influence of the sequence of administration of β -glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 64 (1), 59-68
- 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.
- Garg, R., Garg, A., 1992. Perant Learning of Goldfish Exposed top H Depression in Water. *J. –Environ. –Biol.*, 13 (1), 1-6.
- Grabowski, L.D., Lapatra, S.E., Cain, K.D. 2004. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, (*Oreochromis niloticus*, L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. *Journal of Fish Disaeses*. 27. 573-581

- Guttvik, A., Paulsen, B. Dalmo, R.A. Espelid, S. Lund, V., Bogwald, J., 2002. Oral administration of lipopolysaccharide to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry Uptake, distribution, influence on growth and immune stimulation. *Aquaculture*, 214: 35-53.
- Gülmezoğlu, E., 1975. Bağışıklığın Temelleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 176s, Ankara.
- Güvener, R.P., Timur, G., 2005. Bazı Akvaryum Balıklarında *Aeromonas* Enfeksiyonlarının Tesbiti Üzerinde Bir Çalışma, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 19, 27-39.
- Hayran, M., Özdamar, O., 1995. Bilgisayar istatistik ve Tıp. HYB Medikal Yayın Birimi (MEBAR).427-450s. Ankara.
- Hazen T.C., Fliermans C.B., Hirsch R.P. And Esch G. W., 1978. Prevalence and Distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States, *Appl. Environ. Microbiol*, vol:36 no:5, p 71-738.
- Hekimoğlu, M.A., 1997. Türkiye’de Pazarlanan *Lepistes Varyeteleri (Poecilia ticulata)* Üzerine Araştırmalar, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Doktora Tezi, İzmir, 154 s.
- Hekimoğlu, M.A., 2006. Akvaryum sektörünün dünyadaki ve Türkiye’deki genel durumu. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 23, 237-241.
- Hoel, K., Salonijs, Lillehaug, K.A., 1997. *Vibrio* antigens of polyvalent vaccines enhance the humoral immune response to *Aeromonas salmonicida* antigens in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol*, 7, pp. 71–80
- 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.
- Högfors, E., Pullinen, K.R., Madetoja, J., Wiklund, T., 2008. Immunization of rainbow trout with a low molecular mass fraction isolated from *Flavobacterium psychrophilum*, *Journal of Fish Diseases*, 31: 899-911.doi: 10.1111/j.1365-2761.2008.00956.x
- Hunnam, P., 1983. Lebensraum Aquraim. E. Handbuch D. Süss. U. Ulmer, 86-87
- İlter, Ö., 1975. İmmunoglobuliner, İmmunoloji (II.Ulusal İmmunoloji Kongresi).45-65s. İstanbul.
- Janeway, C.A., Travers, P., 1996. *Immuno Biology .The Immun System In Healt and Disease Second Edition*, Current Biology Ltd. Gorland Publishing Inc. New York and London.
- Johnson, K. A., Amend, D. F., 1983a. Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bakterins applied by oral and anal intubation of salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 6, 473-476
- Johnson, K.A., Amend, D.F., 1983b. Comparison of efficacy of several delivery methods using *Yersinia ruckeri* bacterin on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 6, 331-336.

- Kamilya,D., Maiti, T.K., Joardar, S.N., Mal, B.,2006. Adjuvant effect of mushroom glucan and bovine lactoferrin upon *Aeromonas hydrophila* vaccination in catla, *Catla catla* (Hamilton). Journal of Fish Diseases. 29.(6) 331-337.
- Karataş, Düğenci, S., Candan, A., 2003. Isolation of Aeromonas Strains from the Intestinal Flora of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L. 1758), Turk J Vet Anim Sci, 27, 1071-1075.
- Kato, G., Kondo, H., Aoki, T.,Hirono,I., 2012. Mycobacterium bovis BCG vaccine induces non-specific immune responses in Japanese flounder against Nocardia seriolae. Fish & Shellfish Immunology 33. 243-250.
- Kav, K., Erganiş, O., 2008. Balıklarda Bağışıklık Sistemi. Vet. Bil. Derg. 24. 1. 97-106.
- Kawakami, H., Shinohara, N., Sakai, M., 1998. The Non-specific Immunostimulation and Adjuvant Effects of *Vibrio anguillarum* Bacterin, M-glucan, Chitin and Freund's Complete Adjuvant against *Pasteurella piscicida* Infection in Yellowtail. Fish Pathol. 33, 287-292.
- Kimura, T., Ezura, Y., Tajima, K., Yoshimizu, M., 1978. Serological diagnosis of bacterial kidney disease of salmonid (BKD): immunodiffusion test by heat stable antigen extracted from infected kidney. Fish Pathology, 13(2), 103-108.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C.And Winn, W. C., 1992, Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Fourth Edition, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 0-397-51201-5.
- Korun, J., Betül Toprak, H., 2007. Ulusal Su Günleri, Antalya.
- Kubilay, A.,1997. Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) patojen bakteri *Yersinia ruckeri*'ye Karşı Antikor Üretimi ve Tespiti Üzerinde Bir Araştırma. SDÜ Fen Bilimleri Enst. Su Ürünleri Müh. ABD Doktora Tezi.117s. Isparta.
- Kubilay, A., Timur, G., 2001 *Yersinia ruckeri* Bakterini ile İmmunize Edilen Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Antikor Üretiminin IFAT ve ELISA Teknikleri ile Saptanması. " Turk J. Vet. Anim. Sci.25.437-445.
- Kumari, J., Sahoo, P.K., 2006a. Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. Dis Aqua Org 70: 63-70.
- Kumari, J., Sahoo, P.K., 2006b. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants. Aquaculture, 255, (1–4), 133–141.
- Kusuda, R., Chen, C., Kawai, K., 1987.Changes in the agglutinating antibody titre and serum protein composition of colored carp after immunization with *Aeromonas hydrophila*. Fish Pathology 22, 141-146.

- Lamers, C.H.J., De Haas, M.J.H., Van Muiswinkel, W.B., 1985. The reaction of the immune system of fish to vaccination: Development of immunological memory in carp, *Cyprinus carpio* L., following direct immersion in *Aeromonas hydrophila* bacterin. *Journal of Fish Diseases* 8, 253-262.
- Lapatra, S.E., Plant, K.P., Alcorn, S., Ostland, V., Winto, J., 2010. An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, 33, 143–151.
- Lapatra, S.E., Lauda, K.A., Jones, G.R., Shewmaker, W.S., Bayne, C.J., 1998. Resistance to IHN virus infection in rainbow trout is increased by glucan while subsequent production of serum neutralizing activity is decreased. *Fish Shellfish Immunol* 8, (6), 435–446.
- 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.
- Leong, J.C., Anderson, E., Bootland, L.M., Chiou, P.W., Johnson, M., Kim, C., Mourich, D., Trobridge, G., 1997. Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Developments in Biological Standardization* 90, 267-77.
- Ling, K.H., Sin, Y.M., Lam, T.J., 1993. Protection of goldfish against some ectoparasitic protozoans using *Ichthyophthirius multifiliis* and *Tetrahymena caryophyllae* for vaccination. *Aquaculture*, 116, 303-314.
- Ljungh, A., Wretling, B., Möllby, R., 1981. Separation and Characterization of Enterotoxin and Two Haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, 89B(1-6), 387-397.
- Logothetis, P.N., Austin, B., 1994. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 4, 239-254.
- Lorenzen, N., Lapatra, S.E., 2005. DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 24 (1): 201-213.
- MacIntyre, S., Buckley, J.T., 1978. Presence of Glycerophospholipid: Cholesterol Acyltransferase and Phospholipase in Culture Supernatant of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 135(2), 402-407.
- Matsuyama, H., Mangindaan, R.E.P., Yano, T., 1992. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 101: 197-203.
- Mertlich, R., 1987. *Exotic Goldfish* T.F.H. Canada., 1-89.
- Mertlich, R., 1989. *Basic Goldfish Breeds The Doubletails*. T.F.H., Canada, 86-87.

- Midtlyng, P.J., Reitan, L.J., Speilberg, L., 1996. Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 6, pp. 335-350.
- Michel, C., Dorson, M., Faivre, B., 1991. Opsonizing activity of anti- *Aeromonas salmonicida* antibodies after inactivation of complement in rainbow trout. *Annals of Veterinary Researches*, 22, 51-58.
- Midtlyng, P. J., Lillehaug, A. 1998. Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Dis. Aquat. Org.* 32, 91-97.
- Mills, D., Stone, D., Newton, P., Willis, S., 1993. A Comparison of Three Diets for Larval Goldfish Rearing. *Austasia-Aquaclut.* 7, 1, 48-49.
- Minbay, A., 1988. İmmunoloji Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, 131s. Bursa.
- Müftüoğlu, E., Bolaman, Z., Bilgin, O., Ertop, Ş., 1993. İmmunoloji. Saray Medikal Yayıncılık, 408s. Bornova-İZMİR.
- Nagae, M., Fuda, H., Hara, A., Kawamura, H., Yamauchi, K., 1993. Changes in serum immunoglobulin M (IgM) Concentrations early development of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) Aquaculture determined by sensitive ELISA technique. *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.
- Navot, N., Sinyakov, M.S., Avtalion, R. R., 2011. Application of ultrasound in vaccination against goldfish ulcer disease: A pilot study. *Vaccine* 29, 1382–1389
- Nayak, D.K., Asha, A., Shankar, K.M., Mohan, C.V., 2004. Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus*-a carnivore model. *Fish & Shellfish Immunology* 16, 613-619.
- Newman, S.G., 1993. Bacterial vaccines for fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* 3. 145-185
- Nikl, L., Albright, L.J., Evelyn, T.P.T., 1991. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. *Dis Aqua Org* 12: 7-12.
- Noga, E.J., 2000, *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, Iowa State University Press, Ames, 141-142.

- Olivier, G., Evelyn, T.P., Lallier, R., 1985. Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon Dev Comp Immunol, 9, pp. 419–432.
- Peddie, S., Secombes, C.J., 2003. The immunostimulatory effects of Chevimmun on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Bulletin Of the European Association of fish pathologists, 23. 48-51.
- Peddie, S., Secombes, C.J., 2005. An overview of fish immunostimulant research. Fish Vet J 8: 1-31.
- Pelczar, M.I., Chan, E.C.S., Krieg, N.R., 1986. Microbiology. Bound in Singapura by Forg and Sons Printers Pte. Ltd., pp. 918. Singapura.
- Poobalane, S., Thompson, K.D., Ardó, L., Verjan, N., Han, H.J., Jeney, G. 2010. Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish Vaccine, 28, pp. 3540–3547
- Post, G., 1987. Bacterial Diseases of Fishes. Textbook of Fish Health. T.F.H. Publications, 41-43p.
- Raa, J., 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Rev Fish Sci 4: 229-288.
- Rahman, M.H., Kawai, K., 2000. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish. Fish & Shellfish Immunology 10, 379-382.
- Ravelo, C., Magariños, B., Herrero, M.C., Costa, L., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 2006. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 251, pp. 153–158.
- Roberts, R.J., Shepherd, C.J., 1986. Handbook Of Trout And Salmon Diseases Second Edition, Fishing News Book Ltd., Farnham, Surrey, England, 085238 1387.
- Roberts, R.J., 1993. Motile Aeromonad Septicaemia, In Bacterial Diseases of Fish (edited by INGLIS, V., ROBERTS, R. J. and BROMAGE, N. R.), Blackwell Scientific Publications, 0-632-03497-1.
- Romalde, J.L., Ravelo, C., López-Romalde, S., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Toranzo, A.E., 2005. Vaccination strategies to prevent emerging diseases for Spanish aquaculture, P.J. Midtlyng (Ed.), Progress in fish vaccinology, Karger, Switzerland, 85–95.
- Rørstad, G., Aasjord, P. M., Robertsen, B., 1993. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Fish & Shellfish Immunology. 3, 179-190.
- Samuel, M., Lam, T.J., Sin, Y.M., 1996. Effect of Laminaran [$\beta(1,3)$ -D-Glucan] on the protective immunity of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* against *Aeromonas hydrophila*. 6, (6), 443–454.

- Sanchez, C., Coll, J., Dominguez, J., 1991. One-step purification of the major rainbow trout. *Immunopathology*, 27, 383-391.
- Sanders, J.E., Fryer, J.L., 1988. Bacteria of Fish, In *Methods in Aquatic Bacteriology* (edited by Austin, B.), John Wiley and Sons Ltd.
- 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.
- Scholz, T., 1999. Paracites in Cultured and Feral Fish. *Vet. Parasitol.* 84, 317-335.
- Selvaraj, V., Samphat, K., Sekar, V., 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 19, 293-306.
- Selvaraj, V., Samphat, K., Sekar, V., 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 114, 15-24.
- Shotts, E.B., Talkington, J.R., Elliot, F.D., McCarthy, D.H., 1980. Aetiology of an Ulcerative Disease in Goldfish, *Carassius auratus* L., Characterization of The Causative Agent, *Journal of Fish Diseases*, 3, 181-186.
- 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.
- Smith, V.J., Brown, J.H., Hauton, C., 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infections? *Fish Shellfish Immunol* 15: 71-90.
- Smieszko, S.F., Axelrod H.R., 1971. *Diseases of Fishes*, Jersey City, New Jersey, T.F.H. Publications Inc. Ltd.
- Soltani, M., Alishahi, M., Mirzargar, S., Nikbakhat, G.H.R., 2007. Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines. *Iran J. Fish Sci.* 7, 129-140.
- Sorensen, U.B., Larsen, J.L., 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar.1986, 593-597.
- Strand, J.A., Fujihara, M.P., Burdett, R.D., Poston, T.M., 1977. Suppression of the primary response in rainbow trout, *Salmo gairneri*, sublethally exposed to tritiated water during embryogenesis. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*. 34, 1293-1304.
- Swain, P., Behura, A., Dash, S., Naya, S.K., 2007. Serum antibody response of Indian major carp, *Labeo rohita* to three species of pathogenic bacteria, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas fluorescens*, *Vet Immunol Immunopathol*, 117, 137-141.

- Sweeney, M.E., 1990. My First Fish is Gold. T.F.H., Canada, 104-129.
- Swift, S., Martin, J.L., Fish, L., Kirke, D.F., Tomás, J.M., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1999. Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. Infection and Immunity October, 67:10, p. 5192-5199.
- Tafalla, C., Bøgwald, J., Dalmo R. A., 2013. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives Fish & Shellfish Immunology, 35; 1740-1750.
- Tanrikul, T.T., 1994. Yersiniosis Hastalarından Korunmada Aşı Uygulamaları ve Bu Uygulamaların Sonuçlarının Değerlendirilmesi. Doktora tezi. Bornova, 96s.
- Thanga V.V., Deepa K., Velmurugan S., Birdilla S.D.M., Adlin Jenifer J., Michael B.M., Citarasu T. (2013) Vaccination strategies to protect goldfish *Carassius auratus* against *Aeromonas hydrophila* infection
- Thompson, K.D., Adams, A., 2004. Current Trends in Immunotherapy and Vaccine Development for Bacterial Diseases of Fish. In: Molecular Aspects of Fish and Marine Biology (Vol-3): Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases (Ed. by Leung K.Y.), World Scientific Publishing Co., 313-362.
- Thuvander, A., Hongolo, I., Jansson, E., Sundquist, B., 1987. Duration of protective immunity and antibody titres measured by ELISA after vaccination of rainbow trout, *Salmo gairdneri* richardson, against vibriosis. Journal of Fish Diseases, 10, 479-486.
- Timur, G., Timur, M., 2003. Balık Hastalıkları, Rektörlük Yayın No.4426 Su Ürünleri Yayın No.5 İstanbul, 975-404-699-9.
- Timur, G., Korun J., Güvener, R.P., 2003. Lepistes (*Poecillia reticulata*) Üretim Ünitesindeki Anaç Ve Yavru Balıklarda Ağır Mortalite İle Seyreden Aeromonad Septisemi Üzerine Bir Çalışma, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 15, 1-11.
- Trusty, M., 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. Aquaculture, 205, 203– 219.
- Toranzo, A.E., Baya, A.M., Roberson, B.S., Barja, J.L., Grimes, D.J., Hetrick, F.M., 1987. Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. Aquaculture, 61, 81-97.
- Trust, T.J., 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. Annual of Review Microbiology, 40, 479-502.
- Viji, V. T., Deepa, K., Velmurugan, S., Birdilla Selva Donio, S., Adlin Jenifer, M. J., Michael Babu, M., Citarasu, T. 2013. Vaccination strategies to protect goldfish *Carassius auratus* against *Aeromonas hydrophila* infection, Dis Aquat Org 104: 45–57, Vol. 104: 45–57, 2013 doi: 10.3354/dao02581.
- Wang, J., 1989. A Tentative Analysis About the Aquatic Organisms and Ecosystem of Fishery in Four South Lakes of Shandong. J. Fish China. 13, 3, 221-229.

- Wang, W.s., Wang, D.H., 1997. Enhancement of the resistance of tilapia and grass carp to experimental *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda* infections by several polysaccharides. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 20. (3). 261-270.
- Whitby, P.W., Landon, M., Coleman, G., 1992. The cloning and nucleotide sequence of the serine protease gene (aspA) of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *FEMS Microbiology Letters*, 99(1), 65-71.
- 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.
- Yano, T., Matsuyama, H., Mangindaan, R.E.P., 1991. Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *Journal of Fish Disease*. 14. 577-582

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Alican DEMİR

Doğum Yeri ve Yılı : Isparta-1989

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : alicandemir32@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Isparta Gazi Lisesi, 2006

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
2012

Mesleki Deneyim

1. Türkiye Sualtı Sporları Federasyonunun (T.S.S.F) Bağlı Cmas 1* Balıkadam Eğitim Belgesi,
2. Professional Association of Diving Instructors (PADI) İlk Yardım Dalgıçı (Rescue Diver) Belgesi,
3. Professional Association of Diving Instructors (PADI) Nitrox Karışım Gazlı Dalgıç Uzmanlığı Belgesi,
4. T.C. Başbakanlık Denizcilik Müsteşarlığına Bağlı olarak tüm dünyada geçerli olan Sanayi ve Ticari işlerde kullanılmak üzere Profesyonel Balık Adam Belgesi
5. MARDAN PALACE ANTALYA Deniz Balıkları Akvaryum sistemlerinde Profesyonel Balık adam olarak,
6. SAGUN GRUP'ta Çipura, Levrek ve Orkinos balıkların Kafes üretim tesisinde Profesyonel Balık adam olarak,
7. Metro Marketler zincirinde Su Ürünleri Mühendisi olarak,
8. Antalya Akvaryumda profesyonel Balık Adam olarak çalıştım.

Yayınları

Demir, A., Kubilay, A., 2014. Japon Balıkları (*Carassius auratus*, L. 1758)'nda Kullanılan Aşılar. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü 1. Ulusal Akvaryum Balıkçılığı ve Sorunları Çalıştayı. 30-31 Ekim 2014, Antalya.