

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

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI (*Oncorhynchus mykiss* Walbum, 1792) İÇİN
HAREKETLİ AEROMONAD SEPTİSEMİ ENFEKSİYONUNA KARŞI AŞI
ÜRETİMİ**

Sercan ÇİFTÇİ

Danışman

Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

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

©2015 [Sercan ÇİFTÇİ]

TEZ ONAYI

Sercan ÇİFTÇİ tarafından hazırlanan "**Gökkuşığı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss* W, 1792) İçin Hareketli Aeromonad Septisemi Enfeksiyonuna Karşı Aşı Üretimi**" 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

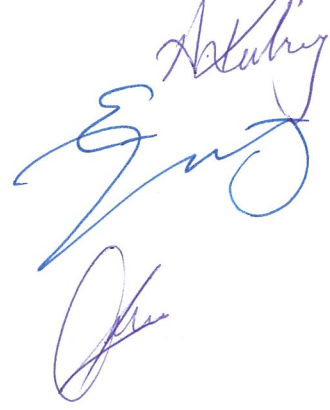
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ
Akdeniz Üniversitesi

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Seçil METİN
Süleyman Demirel Üniversitesi



Enstitü Müdürü

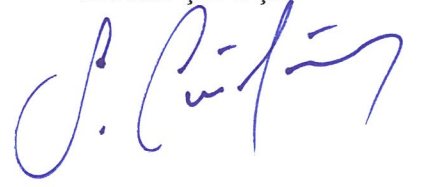
Doç. Dr. Yasin TUNCER

.....

TAAHHÜTNAME

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

Sercan ÇİFTÇİ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iiv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iix
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1.Gökkuşağı Alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) ve Yetiştiriciliği.....	3
2.2. <i>Aeromonas hydrophila</i> Enfeksiyonları.....	4
2.3. Hareketli Aeromonad Septisemi (MAS, Bakteriyel Hemorajik Septisemi)	6
2.3.1. Hastalığın etiyolojisi	7
2.3.2. Klinik bulgular ve patoloji	8
2.3.3. Histopatoloji	9
2.3.4. Epizootiyoloji	10
2.3.5. Hastalığın Kontrolü	10
2.4. Balıklarda Bağışıklık.....	11
2.4.1. Doğal bağışıklık (Spesifik olmayan savunma).....	11
2.4.2. Kazanılmış bağışıklık (Spesifik savunma).....	11
2.4.2.1. Humoral bağışıklık.....	12
2.4.2.2. Selüler bağışıklık (Cell mediated immunity, CMI).....	12
2.4.3. İmmunoglobulinler (Antikorlar)	12
2.5. Balıklarda İmmunizasyon	13
2.6. Balık Aşıları	14
2.7. Bakteriyel Aşılar	16
2.8. <i>Aeromonas hydrophila</i> ile İlgili Yapılan Aşı Çalışmaları.....	18
2.9. Balık Aşılarında Kullanılan Adjuvantlar (Aşıların Etkinliğini Artıran Maddeler)	19
2.9.1. Adjuvantların görevleri	20
3.MATERYAL VE YÖNTEM	21

3.1. Materyal	21
3.1.1. Balık materyali ve uyguluma yeri	21
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Su Kaynağı ve Suyun Kalitesi	22
3.1.3. Araştırmada Kullanılan Yem	22
3.1.4. Araştırmada kullanılan <i>Aeromonas hydrophila</i> suşları	23
3.1.5. <i>Aeromonas hydrophila</i> Aşılarının Hazırlandığı Kuruluş	24
3.1.6. Araştırmada Kullanılan Adjuvantlar	24
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Etken izolasyonu ve saflaştırılması	24
3.2.2. <i>A. hydrophila</i> suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi	24
3.2.3. Geleneksel bakteriyolojik testler ve API 20 NE testi	24
3.2.4. Aşının Hazırlanması	25
3.2.4.1. Aşı suşunun seçimi	25
3.2.4.2. Aşının üretimi	25
3.2.4.3. Sterilite testi	26
3.2.4.4. Toksisite denemeleri	26
3.2.5. Aşıların Uygulanması	27
3.2.6. Aşı Etkinliğinin Değerlendirilmesi	29
3.2.7. Epruvasyon Uygulamaları	29
3.2.8. Bağışıklığın Değerlendirilmesi	29
3.2.9. Serum Elde Edilmesi	29
3.2.10. Aglutinasyon testi	30
3.2.10.1. Antijen hazırlanması	30
3.2.10.2. Lam aglutinasyon testinin uygulanması	30
3.2.10.3. Mikro - aglutinasyon testinin uygulanması	30
3.3. İstatistiki Hesaplamalar	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	31
4.1. <i>Aeromonas hydrophila</i> Suşlarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Ait Bulgular	31
4.2. Aşı Suşunun Seçimi Amacıyla Yapılan Virülens Çalışmalarına Ait Bulgular	33
4.3. LD ₆₀ dozunun belirlenmesi amacıyla yapılan epruvasyon denemesine ait bulgular	35
4.4. Hazırlanan aşının toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçlarına ait bulgular	36
4.5. Deneysel aşıların balıklarda sağladığı bağışıklık seviyesinin belirlenmesine ait ilgili bulgular	36

4.6. Deneysel eprüvasyon uygulanan balıkların semptomları ve kümülatif mortalite oranları	38
4.7. Lam Aglutinasyon Testi ile İlgili Bulgular	39
4.8. Mikroaglutinasyon testine ait bulgular.....	40
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	43
6. KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.	74

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI (*Oncorhynchus mykiss* W, 1792) İÇİN HAREKETLİ AEROMONAD SEPTİSEMİ ENFEKSİYONUNA KARŞI AŞI ÜRETİMİ

Sercan ÇİFTÇİ

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Bu çalışmada, formalinle öldürülmüş *Aeromonas hydrophila* aşıları ile immunize edilen gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* W, 1792)'nda aşılarda koruyucu etkisi araştırılmıştır. Monovalan aşı (tek bir *A. hydrophila* suşu AHS) immersiyon, , polivalan (3 *A. hydrophila* suşu AHS, AHJ, AH1) aşı ip enjeksiyon ve polivalan-glukan(100 µg/ml) ip enjeksiyon, polivalan-FCA (1:1) ile ip enjeksiyon aşılarda gökkuşağı alabalıkları aşılanmıştır. Adjuvant kullanılmayan balıklara 30. günde rapel aşı tekrarı yapılmıştır. *A. hydrophila* karşı aşılamadan sonra 30. ve 90. günlerde aşılanan gruplara ve kontrol grubuna LD₆₀ doz (1×10^8 cfu / ml) *A. hydrophila* ip enjeksiyonla verilerek epruvasyon uygulanmıştır. Aşılanan deneme grubu balıklarda 30. ve 90. günlerde RPS değerleri polivalanla %92,5, %87,5, Polivalan+FCA'la %90, %90, polivalan+glukanla %87,5, %80 ve monovalanla aşılanan gruplar %85, %75, olarak tespit edilmiştir. *A. hydrophila* bakterisinden farklı yöntemlerle immunize edilen ve 30., 60. ve 90. günlerde balıkların serumlarından hazırlanan mikroaglutinasyon testine ait antikor titresi sırasıyla polivalan+FCA 1/32,1/16,1/64, polivalan 1/64,1/32,1/32, monovalan 1/64,1/8,1/8 ve poli+glukan uygulanan gruplarda 1/64,1/16,1/16 dilüsyonunda aglutinasyon görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşağı alabalığı, *Oncorhynchus mykiss*, *Aeromonas hydrophila*, Aşı, *Lactococcus garvieae*, RPS, Mikroaglutinasyon, Epruvasyon, Adjuvant

2015, 75 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

A VACCINE PRODUCTION AGAINST MOTİLE AEROMONAS SEPTİCAEMİA INFECTION FOR RAINBOW TROUT, (*Oncorhynchus mykiss* W,1792)

Sercan ÇİFTÇİ

Süleyman Demirel University
Institute of Applied and Natural Sciences
Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

In this study, the protective efficacy of formalin-killed vaccines against *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout was evaluated (*Oncorhynchus mykiss* W, 1792). For this purpose monovalent vaccine (one strain *A.hydrophila*, AHS) immersion and intraperitoneal (ip) injection, polyvalent (three strains *A.hydrophilic* AHS, AHJ, AH1) vaccine ip injection and monovalent-glucan (100 µg/ml) ip injection, Monovalent-FC (1: 1) vaccines ip injection were inoculated with rainbow trout. Adjuvant unused fish vaccine groups was carried out booster vaccination at 30 days. The vaccinated groups and the control group, was challenged by ip injection of LD₆₀ doses (1×10^8 cfu / ml) *A.hydrophila* pathogen at the day 30th and 90th post-vaccination. In vaccinated fish occurred RPS values were determined as the polyvalent groups 92. 5%, 87.5% , polyvalent+FCA 90%,90% to the polyvalent+glucan 87. 5%, 80%, monovalent 85%, 75%. Serum microagglutination test antibody titre were seen polyvalent + FCA to 1/32.1/16.1/64, polyvalent 1/64.1/32.1/32, monovalent 1/64.1/8.1/8 and polyvalent + glucan groups 1/64.1/16.1/16 agglutination at the days 30th, 60th and 90th post-vaccination.

Keywords: Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aeromonas hydrophila*, vaccine, RPS, microagglutination, challenge, adjuvant.

2015, pages 75

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma süresince çalışmanın yönlendirilmesi ve eksikliklerin giderilmesi konusunda fikir ve görüşleri ile tezin olgunlaşmasına katkı sağlayan sayın hocalarım;; Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ, Yrd. Doç Dr. Seçil METİN ve Su Ürünleri Mühendisi Tamer Demirkan'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yüksek lisans çalışmalarım süresince bana yardımda bulunan tüm arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleşmesinde **0347.STZ.2013-2**-nolu SANTEZ proje ile Yüksek Lisans Bursu sağlayarak beni maddi olarak destekleyen Sanayi bakanlığına, VETAL Hayvan Sağlığı Ürünleri A.Ş. ve H2Biyotek Ltd.Şti'ne teşekkürlerimi sunarım.

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

Sercan ÇİFTÇİ
ISPARTA, 2015

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 1. Denemenin gerçekleştirildiği balık üretim tesisi ve denemede kullanılan fiberglas balık tankları.....	22
Şekil 3. 2. Sterilite kontrolü yapılan steril aşılar	26
Şekil 4. 1. Aeromonas izolet agarda yeşil renkli <i>A. hydrophila</i> kolonileri	33
Şekil 4. 2. Farklı <i>A. hydrophila</i> suşların oluşturduğu mortalite (%)	34
Şekil 4. 3. <i>A. hydrophila</i> suşları ile deneysel enfeksiyondan sonra günlere göre ölen balık sayısı.....	35
Şekil 4. 4. Deneysel enfeksiyon sonrası balıklar, (A) otopside viseral organlarda hiperemi ve hemorojiler, (B) Renkte açılma ve lateral line boyunca pembe-kırmızı çizgi, yüzgeç kaidelerinde hemorojiler	39
Şekil 4. 5. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antijenin oluşturduğu kümeler	40
Şekil 4. 6. İmmun test serumlarını içeren mikro aglutinasyon playte çukurları	41
Şekil 4. 7. Farklı aşılama yöntemleri uygulanarak immunize edilen alabalıkların kan serumunda oluşan aglutinin titrelerinin ($\log_2$) günlük dağılımı.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. <i>A. hydrophila</i> , <i>A. cavie</i> ve <i>A. sobria</i> türlerinin birbirinden karakteristik.....	5
Çizelge 2. 2. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın biyokimyasal özellikleri (Koneman ve dig., 1992, Roberts, 1993).....	8
Çizelge 2. 3. Salmonidlerde bakteriyel hastalıklara karşı kullanılan ticari aşılar (Sommerset vd.,2005)	16
Çizelge 2. 4. Salmonidlerde deneysel anlamda Çalışılan Bakteriyel Aşılar	17
Çizelge 3. 1. Deneme süresince kullanılan ticari alabalık yeminin kimyasal besin bileşenleri .	23
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan <i>Aeromonas hydrophila</i> suşları.....	23
Çizelge 3. 3. Aşı deneme grupları ve uygulama şekilleri.....	28
Çizelge 4. 1. <i>A. hydrophila</i> suşlarının konvansiyonel yöntemler ve API 20NE hızlı teşhis kitlerine göre elde edilen fenotipik özelliklerine ait bulgular (22 °C 24 saatlik).	32
Çizelge 4. 2. <i>A.hydrophila</i> suşlarının virülens durumlarının belirlenmesi.....	34
Çizelge 4. 3. LD ₆₀ oranının tespitinde deneysel enfeksiyon sonuçları.....	36
Çizelge 4. 4. Gökkuşuğu alabalıklarında 30 ve 90. günlerde yapılan deneysel enfeksiyon (LD ₆₀) sonrası elde edilen RPS değerleri.....	37
Çizelge 4. 5. Aşılamadan 30. ve 90. günden sonra deneysel eprüvasyon sonrası deneme gruplarında kümülatif mortalitesi.....	38
Çizelge 4. 6. Farklı aşılama yöntemleri uygulanan balıklarda immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

cfu	koloni oluşturan birim(kob)
dk	dakika
FCA	Freund's complete adjuvant
g	gram
IU	international 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)

1.GİRİŞ

Dünyadaki nüfus artışı ve sanayileşme birçok sorunu da beraberinde getirmektedir.Bu sorunların başında doğanın tahribatı ve bu yüzden stokların gün geçtikçe azalmasıdır. Doğal stoklara alternatif çözüm olarak kültür balıkçılığı geliştirilmiştir. Son yıllarda dünyada ve ülkemizde akuakültür alanında yetiştiricilikte önemli artışlar kaydedilmiştir. Ülkemizdeki tatlısu kültür balıkçılığının büyük çoğunluğunu gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği oluşturmaktadır.

Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) ülkemizde 1970'li yıllarda yetiştiriciliğine başlanan ve günümüzde tatlı su balıkları üretiminde büyük öneme sahip bir balık türüdür. Ülkemizde 2012 yılında gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) üretimi 111.335 ton iken 2013 yılında 122.873,3 ton ve 2014 yılında 107.533 ton olarak bildirilmiştir (TÜİK ,2015). Sürekli büyüyen bu artışla birlikte olarak işletmelerde intensif yetiştiriciliğe bağlı olarak balık hastalıklardan kaynaklanan ekonomik kayıplar dikkat çekmektedir.

Dünyada geniş dağılım gösteren *Aeromonas hydrophila* Gram-negatif bir bakteridir ve aynı zamanda deniz ve tatlı su balık hastalıklarına neden olan bir patojendir. Hareketli *Aeromonas* türleri genellikle fırsatçı patojen ya da sekonder patojen olarak kabul edilmesine rağmen, *A. hydrophila* primer patojen olarak görülmüştür (Santos vd., 1991, Toranzo vd., 2009, Gong vd., 2014, Timur ve Timur, 2003, Bastardo vd., 2012).

Aeromonas enfeksiyonları genellikle çevre koşullarındaki kötüleşmesi yani optimum koşulların karşılanmaması gibi durumlarda ortaya çıkan bir enfeksiyondur. Aşırı stoklama, yüksek veya ani sıcaklık değişiklikleri, taşıma, düşük çözünmüş oksijen, kötü besleme mantar ve parazitik zararlıların bulunması, stres faktörleri, balıklarda fizyolojik değişikliklere neden olmakta ve enfeksiyonlara karşı duyarlılığı artmaktadır (Austin ve Austin, 1987; Timur ve Timur; 2003; Bastardo vd., 2012).

A. hydrophila'nın, birçok kültür ve doğadaki tatlısu balıklarından özellikle gökkuşağı alabalıkları, sazan, yayın balığı, japon balıkları, yılan balıkları, akvaryum balıkları, tilapia ve deniz balıklarının hastalık etkeni olarak izole edildiği bildirilmiştir (Snieszko ve Axelrod, 1971; Bach vd., 1978; Hazen vd., 1978; Austin ve Austin, 1987; Roberts, 1993; Doukas vd.,

1998; Aoki, 1999; Sahrikoglu ve Candan 2002; Timur ve Timur, 2003; Timur vd., 2003; Aydın ve Ciltas, 2004; Güvener, 2005).

Özellikle son zamanlarda ülkemizde gökkuşağı alabalık yetiştiriciliği sektöründe yaz aylarında *A.hydrophila* enfeksiyonları nedeniyle tekrarlayan ölümler ortaya çıkmakta ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Sağlam vd., 2006, Durmaz ve Türk, 2009, Mefut vd., 2007).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde, enfeksiyondan kaynaklanan kayıplar, antimikrobiyal bileşiklerin maliyeti ve antibiyotiklere karşı direncinin artışı sektörde önemli problemler oluşturmaktadır. Bu nedenle enfeksiyonlara karşı immünoprofilaktik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde aşı, enfeksiyöz hastalıklara karşı koruma sağlamada en önemli uygulamalardan birisidir. Ticari aşılarda çoğu şu ana kadar immersiyon ya da enjeksiyonla uygulanan inaktif aşılardır. Bakteri enfeksiyonlarına sebep olan *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* ve *Yersinia ruckeri* gibi Gram negatif bakteriler, aşı ile etkili bir şekilde kontrol altına alınabilmektedir. Viral enfeksiyonlardan enfeksiyöz pankreatik nekrozis (IPN)'e karşı balık çiftliklerinde ticari olarak aşı kullanımının yanı sıra bazı viral hastalıklara karşı da aday aşılarda mevcuttur. Diğer bakteriyel, viral ve paraziter enfeksiyonlara karşı aşı çalışmaları deneysel anlamda devam etmektedir. Genel olarak aşının pozitif etkileri su ürünleri yetiştiriciliğinde ölüm oranlarını azaltmaktadır (Sommerset vd., 2005)

A. hydrophila enfeksiyonlarına karşı korunması için uygun ticari hiç bir aşı bulunmamaktadır. Ticari aşılarda yetersizliğinin nedeni *A. hydrophila* sero gruplarının farklı izolatlarına karşı aşılarda etkinliğinin azalmasının sonucu bu bakterinin yüksek heterojenitesi ile ilgili olabileceği ifade edilmiştir (Bastardo vd., 2012).

Gökkuşağı alabalığı üretiminde hastalık etkenlerinin potansiyel çeşitliliği oldukça yüksektir ve çeşitli patojenlere karşı aşı uygulamaları ile başarılı önleyici stratejiler yürütülmektedir. Bir çok durumda, bu aşılama prosedürleri aynı balık stoklarında farklı yollarla iki bağımsız uygulanmakta (intra-peritoneal, i.p. enjeksiyon ya da immersiyon) ve bu işlemler tekrar yapılmaktadır (Bastardo vd., 2012, LaPatra, 2005).

Polivalan aşılar balıkları çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri suşlarının geniş “mikro organizma” yelpazesine karşı koruma avantajı sağladığı gibi heterolog suşlardan hazırlanan *Aeromonas* aşılarında da iyi sonuçlar verebilmektedir (Bastardo vd., 2012, LaPatra, 2005).

Aeromonas hydrophila yıllardır su ürünleri sektöründe kayıplara neden olan önemli bir patojendir. Bu patojen tatlı sularda fırsatçı bir patojen olarak bilinmesi nedeni ile akuakültürde yaygın olarak hastalıklara sebep olmaktadır. Aşı geliştirmek amacı ile *A.hydrophila*’ya karşı deneysel aşılar akuakültürde çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Lamers vd., 1985; Baba vd., 1988; Leung vd., 1997; Rahman ve Kawai, 2000).

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalığında *A. hydrophila* patojenine karşı kullanmak üzere su bazlı ve adjuvantlı monovalan ve polivalan aşılar hazırlanarak aşının balıklarda oluşturduğu immün yanıt ve koruma düzeyleri değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1.Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve Yetiştiriciliği

Salmonidae familyasının üyeleri olan alabalıklar tatlı su kökenlidir. Alabalık türleri coğrafik özellik bakımından Avrupa ve Amerikan kökenli olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Gökkuşağı alabalığı Kuzey Amerika kökenli olup, alabalık türleri içerisinde en yaygın yetiştiriciliği yapılan türdür (Yeşilayer vd., 2013). Balıkçılık Derneği balık isimleri komitesi tarafından *Salmo gairdnerii* olarak bilinen gökkuşağı alabalığının bilimsel adı *Onchorynchus mykiss* olarak değiştirilmiştir (Tippets ve Moyle, 1978). Pulları sikloit ve küçük olan gökkuşağı alabalıklarının vücutları uzamış ve üstten biraz basık olup, dorsal yüzgeçle kuyruk yüzgeci arasında bir yağ yüzgeci (adipöz) bulunur. Gümüşü veya grimsi renkte olabilen vücut kenarlarında, çok sayıda küçük lekeler ve pembe bir bant bulunmaktadır (Şekil 2.1). Yumurtlama zamanı gökkuşağı alabalıkları anaçlarındaki bant kırmızı renk alırken, genel olarak balıkların rengi koyulaşmaktadır (Birici vd., 2014). Dünyada 120-130 yıldır yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarının yapay olarak üretilmiş ilk defa Amerika’da yapılmıştır. Ülkemizde ise ilk özel çiftlik 1967 - 1968 yıllarında Marmara bölgesinde kurulmuş ve *O. mykiss* yumurtalarının Avrupa’dan ithal edilmesiyle gökkuşağı alabalıklarının yetiştiriciliğine başlanmıştır. Gökkuşağı alabalıklarının yetiştiriciliğinin diğer alabalık türlerine göre bu kadar yaygın olması; çevre koşullarına kolay uyum sağlaması, 20-25 °C gibi

yüksek sıcaklıklara dayanıklı olması, kuluçka döneminin daha kısa sürmesi ve ayrıca yemden yaralanma kabiliyetinin yüksek olması nedeniyle kısa sürede iyi bir büyüme göstermesinden kaynaklanmaktadır (Tekelioğlu, 2005).

2.2. *Aeromonas hydrophila* Enfeksiyonları

Aeromonas hydrophila genellikle çeşitli nedenlerle stres altında kalan balıklarda hemorajik sepsis ile seyreden sistemik bir hastalıktır. *A. hydrophila*'nın hemorajik sepsis 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 tatlı suyun denize karıştığı deniz sistemlerinde ve çok tuzlu sular hariç her tuzlulukta *A. hydrophila*'nın bulunduğunu bildirmişlerdir (Hazen vd., 1978).

A. hydrophila'nın neden olduğu enfeksiyona birçok kültür ve doğadaki tatlısu balıklarından kahverengi alabalık (*Salmo trutta*), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), ayu balığı (*Plecoglossus altivelis*), sazan (*Cyprinus carpio*), kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*), japon yılan balığı (*Anguilla japonica*), Amerikan yılan balığı (*Anguilla rostrata*), japon balığı (*Carassius auratus*) ve tilapia'da (*Tilapia nilotica*) balıklarında bu enfeksiyon görülmüştür (Snieszko ve Axelrod, 1971; Austin ve Austin, 1987; Roberts, 1993; Aoki, 1999; Timur ve Timur, 2003).

Bakteriyel sepsisin klinik bulgularını gösteren balıklarda *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* izole edilmiştir. Fakat bunlardan 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 ayrım faktörleri temel alınarak kolaylıkla birbirinden ayırt edilir. *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* türlerinin birbirinden ayrımı Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir (Koneman vd., 1992; Roberts, 1993).

Çizelge 2. 1. *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* türlerinin birbirinden karakteristik ayrımı

	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A.sobria</i>
Karakteristik			
Hareket	+	+	+
Eskulin hidrolizi	+	+	-
KCN broth'da üreme	+	+	-
Arginin dihidrolizi	+	+	-
Lizin dekarboksilaz	+	-	+
Arabinoz kullanımı	+	+	-
Salicin fermentasyonu	+	+	-
Asetoin üretimi (VP test)	+	-	+
Glukozdan gaz üretimi	+	-	+
Sistinden H₂S üretimi	+	-	+
β-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 edildiği bildirilmektedir (Sanders ve Fryer, 1988; Roberts, 1993; Aoki, 1999; Karatas ve Candan, 2003). Bu nedenle bu bakterilerin varlığı kendi başına hastalık etkeni değildir ve çoğunlukla stres bu bakterilerin neden olduğu hastalık çıkışlarına etki eden faktör 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. Manipulasyon, 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 enfeksiyonlar hastalığa karşı duyarlılığı artırır. Hastalığın şiddetini, bakteriyel virulens, bir balık popülasyonundaki stres çeşidi ve derecesi, konakçının fizyolojik durumu ve spesifik balık popülasyonu içindeki doğal genetik direnç derecesi gibi bir takım faktörler etkiler (Roberts, 1993; Aoki, 1999; Cipriano, 2001).

Aeromonad enfeksiyonları her yaştaki balıkta görülür fakat kayıplar genellikle yavru balıklarda daha şiddetlidir. Hastalık çıkışı ilkbaharda su sıcaklığının yükseldiği dönemde gerçekleşir (Roberts, 1993; Camus vd., 1998; Aoki, 1999; Timur ve Timur, 2003).

Kontrollü laboratuvar şartları altında hasta balıklardan izole edilen hareketli aeromonad suşlarının, sudan izole edilen suşlardan daha virulent olduğunu bulmuşlardır. *A. hydrophila* ve *A. sobria*'nın nispi virulensini karşılaştırmak üzere gökkuşuğu alabalıklarında (*O. mykiss*) çalışma yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar, sağlıklı veya hasta balıktan izole edilen *A. hydrophila* suşlarının *A. sobria* suşlarına nazaran daha virulent olduğunu göstermiştir (De Figueredo ve Plumb, 1977).

2.3. Hareketli Aeromonad Septisemi (MAS, Bakteriyel Hemorajik Septisemi)

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 (Aydın, N., 1994b).

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 (Aydın, N., 1994b).

Hareketli aeromonadlardan *Aeromonas caviae* ve *Aeromonas sobria*'nın da arasına hasta balıklardan izole edildiği bildirilmektedir. Eski ve spesifik bir isim olmayan bakteriyel hemorajik septisemi adı bugün bütün Gram negatif bakterilerin balıklarda neden olduğu sistemik enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Hareketli aeromonad sptisemi 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 (Aydın, N., 1994c, Arda vd, 2002).

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).

2.3.1. Hastalığın etiolojisi

Aeromonas hydrophila Gram-negatif, 0.3-1.0 X 1.0-3.5 µm boyutunda fermantatif, tek polar flagellaları sayesinde hareketli çomaklardır. TSA besiyerinde 20-25 °C de 24-48 saat inkübe edildiklerinde krem rengi, yuvarlak, hafif kabarık koloniler gelişir. Sitokrom oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitifdir. *A. hydrophila* vibriostat (O/129) 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 (Koneman ve dig., 1992, Roberts, 1993)

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
β-galaktosidaz	+	Maltoz	+
H ₂ S	+	Mannitol	+
5-37 ⁰ C'de üreme	+	Ramnoz	-
%6 tuzlulukta üreme	-	Salicin	+
β-Hemoliz	+	Sorbitol	-
Eskulin hidrolizi	+	Sukroz	+
Jelatin hidrolizi	+	Trehaloz	+
Üreaz	-	Ksiloz	-

(+): pozitif, (-): negatif, D: değişken

2.3.2. 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 ve asites 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).

Cyprinid balıklarda hastalık, birkaç belirti ile perakut; ekzoftalmus, yüzgeç ve kuyrukta erime ve asites gibi tipik belirtiler ile akut veya geniş, kalıcı ülserlerin olduğu kronik formda meydana gelebilir. Hastalık genellikle abdominal ödem ile ilişkilidir (Snieszko ve Axelrod, 1971, Roberts, 1993, Aoki, 1999; Timur ve Timur, 2003).

Klinik incelemede karın boşluğunda berrak veya kırmızı renkli bir sıvı görülebilir. Birçok vakada ölüm sonrasında görülen başlıca bulgu iç organlarda hiperemi, mesenteriumda ve viseral ve parietal peritonda hemorajidir. Hastalığın şiddetli görüldüğü vakalarda tüm iç organlar parlak kırmızı renkte olabilir. Dalak genişlemiş ve kiraz kırmızısı rengindedir. Genişlemiş böbrekte genellikle liquefactive 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 dermisin ciddi ödemi 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).

2.3.3. 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 liquefactive 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).

2.3.4. Epizootiyoloji

Etkenin tatlı sularda yaygın bir şekilde bulunduğu bildirilmektedir. Böyle sulardaki akuatik bitki ve balıklarda her an hastalık için hazır bulunmaktadır. Hareketli aeromonadlara bağlı olarak gelişen çeşitli sendromlar hastalığı başlatan uyarıcıya bağlı çok değişiklik gösterirler. Cyprinidlerde 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 (Timur ve Timur, 2003).

2.3.5. 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. Böylece tedavi oral antibiyotik tedavisi şeklinde uygulanır. Kloramfenikol, nufirpirinol, oksitetrasiklin ve sulfamerazin kullanılmaktadır. Balıklar 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 (Timur ve Timur, 2003).

Antibiyotikler sazan kültüründe koruyucu (profilaktif) olarak hemorajik sepsisinin gerek çevresel problemlerden gerekse yetiştiricilik uygulamasındaki değişikliklerin balıklarda oluşturduğu stresten 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 (Timur ve Timur, 2003).

Profilaksi için aşılama başka bir alternatif oluşturur. Bu amaçla polyvalan ticari aşılarda geliştirilmesi gerekir. Aşı yapımı ile ilgili bazı çalışmalar görülmektedir. Bununla beraber ticari ürünler henüz ortaya çıkmamıştır (Timur ve Timur, 2003).

2.4. Balıklarda Bağışıklık

Balıkların bağışıklık sistemi memelilerin bağışıklık sistemine göre daha az karışık sistem olmasına rağmen sellüler ve humoral bağışıklık gibi çeşitli koruma mekanizmalarını içermektedir (Ellis,1978; 1988; 1989). Bağışıklık hayvanlarda enfeksiyonlara karşı korunmada en önemli bir fizyolojik mekanizmadır. Omurgalılarda bağışıklık; doğal (primer) ve kazanılmış (adaptive) bağışıklık olmak üzere iki tiptir.

2.4.1. Doğal bağışıklık (Spesifik olmayan savunma)

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

2.4.2. Kazanılmış bağışıklık (Spesifik savunma)

Kazanılmış bağışıklık sonradan kazanılan bir durumdur ve vücudun tepkime verme yeteneğine bağlı olarak zarar verici spesifik partiküler mikroorganizmalara karşı, spesifik reaktive lenfosit (sellüler bağışıklık) veya serum antikorlarının (humoral bağışıklık) oluşmasıdır (Ellis,1978; 1988; 1989, Busch, 1981, Pelczar vd., 1986, Trust, 1986, Janeway ve Travers, 1996). Kazanılmış bağışıklıkta savunma mekanizmasının merkezi lenfositlerdir. Lenfositler kazanılmış bağışıklığın, humoral bağışıklık, sellüler bağışıklık ve bellek gibi üç safhasının başlatılmasından ve yürütülmesinden sorumludur. Humoral cevap “Homolog veya spesifik antijene karşı serum protein moleküllerinin sentezi amacıyla uyarılması” olarak tanımlanmaktadır. Bu serum protein molekülleri (globulinler) antikorlar olarak isimlendirilir. Bu nedenle canlı patojenlerin avirulent suşları, öldürülmüş patojenler veya bunlardan elde edilmiş antijenler, konakçının patojen tarafından hasta edilmesini önlemek için kazanılmış bağışıklık oluşturmak üzere kullanılmaktadır (Post, 1987).

2.4.2.1. 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 aşıların uygulanmasını takiben dikkate değer artan bir direnç oluşturur (Ellis, 1988).

2.4.2.2. Selüler bağışıklık (Cell mediated immunity, CMI)

Timustan köken alan T lenfositleri selüler 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).

2.4.3. İmmunoglobulinler (Antikorlar)

İmmunoglobulinler antijenik uyarımlar sonucu vücutta plazma hücreleri tarafından sentezlenen ve homolog antijenle birleşerek spesifik bir reaksiyon verebilen glikoprotein karakterindeki moleküllerdir (Gülmezoğlu, 1975, İlter, 1975, Minbay, 1988, Bilgehan,1993, Müftüoğlu vd., 1993; Arda vd., 1994).

Protein olmaları nedeniyle immunoglobulinler çok iyi antijenik özelliklere sahiptirler. Kendilerine karşı antikor sentezini uyarırlar ve bunarlada reaksiyon verirler. Antikorlar çeşitli maddelerle (FITC, izotop, enzim) konjuge edilerek serolojik reaksiyonlarda (FAT, RIA, ELISA) başarı ile kullanılmaktadır (Austin and Austin, 1999; Schill vd.,1989;Arda vd., 1994; Janeway vd Travers, 1996; Kubilay, 1997).

Teleost balıklarda ise bir sınıf immunoglobulin kesin olarak identifiye edilmiştir. Bu immunoglobulin memelilerde makroglobulin veya IgM olarak isimlendirilen sınıfa bir çok hususta benzerlik gösterir (Trust, 1986; Fuda vd.,1991; Michel vd., 1991; Sanchez vd., 1991; BulleBuchman vd.,1992; Al-Harbi ve Austin, 1993; Estevez vd., 1993, Smith vd., 1993, Nagae vd., 1993, 1994a,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).

2.5. Balıklarda İmmünizasyon

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, dünya çapında geniş kültürlerde patojenler 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* gubu 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).

2.6. Balık Aşıları

Son yıllarda balık yetiştiriciliğinde özellikle salmon endüstrisinde intensif yetiştiricilik faaliyetlerinde önemli artışlar kaydedilmektedir. Bu gelişime bağlı olarak, özellikle de balıkların yoğun bir şekilde stoklanması, stres ve su kalitesindeki olumsuz değişiklikler nedeniyle hastalık problemleri ortaya çıkmıştır. Gelecekte akuakültür endüstrisinde başarı sağlanmasının ön koşulu, hastalık kayıplarının ve buna bağlı olarak antibiyotik kullanımının minimuma indirilmesidir. Bu amaçla spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sisteminin geliştirilmesi için uygulanan profilaktik önlemler ile akuakültür endüstrisinin gelişimi sağlanacaktır. Bu yöntemlerden biri olan aşılama hala gelişim aşamasında olmasına rağmen, bu konu ile ilgili hem bilimsel hem de endüstriyel alanda başarılar elde edilmiştir (Gudding vd.,1999).

Balıklar için ilk aşılama çalışmaları 1930'larda Kuzey Amerika' daki Salmonid kuluçkahanelerinde furunkulozis'e karşı yapılmıştır. Bilimsel anlamda balıklarda bakteriyel hastalıklara karşı ilk yapılan aşılama 1942 yılında Duff tarafından gerçekleştirilmiştir (Ellis, 1988; Joosten vd.,1997). Daha sonra 1950'lerde antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasıyla balık aşılmasına olan ilgi azalmıştır. 1960' lı yıllarda salmon yetiştiriciliği büyük ölçeklerde yapılmaya başladığında ortaya çıkan vibriosis, furunkulozis ve yersiniozis gibi temel balık hastalıkları antibiyotiklerle kolayca kontrol altına alınabilmektedir. Bununla birlikte salmon sanayi 1970' lerde hızlı bir gelişim göstermiş ve 1980'li yılların başında bu bakteriyel patojenlerin birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği görülmüştür (Ellis, 1988; Klein vd.,1996). Buna ilave olarak kimyasal maddelerle tedavi güçleşmiş ve daha pahalı bir yöntem haline gelmiştir. Antibiyotiğe karşı direnç gelişimi sonucu hastalıkların kontrolü amacıyla aşı uygulaması tercih edilen bir yöntem haline gelmiş ve 1980'li yılların başında ticari olarak

akuakültüre sunulmuştur (Bakopoulos, 1995; Thyssen ve Ollevier, 2001). Özellikle Atlantik salmon üretim çiftliklerinde aşılardan tanıtılmasıyla, antibiyotiklerin kullanımı önemli bir şekilde azalmaya başlamıştır. Antibiyotik kullanımının minimuma indirilmesiyle, çevre üzerine olumsuz etkinin azalması ve besin kalitesinde gelişme olduğu gözlenmiştir. Buna ilave olarak, aşılardan uygulanmasıyla balık sağlığı da gelişme sağlanmıştır (Lorenzen ve LaPatra, 2005).

Balık ve kabuklu su ürünleri yetiştiriciliğinde ortaya çıkan problemler arasında infeksiyöz patojenler oldukça önemli yer tutmaktadır (Meyer 1991, Aasjord ve Slinde 1994, Mialhe vd., 1995). Bu patojenlerin neden olduğu infeksiyöz hastalıklar akuakültürde önemli kayıplara neden olmaktadır (Leong ve Fryer, 1993). Kimyasallar ve antibiyotikler bakteriyel ve paraziter hastalıkların kontrolü için kullanılabilir de bu ürünlerin çoğu, hayvanların etinde birikim, ilaca karşı dirençli suşların gelişmesi ve akuatik çevrenin kirlenmesi gibi istenmeyen yan etkilere sahiptir (Munn 1994, Press ve Lillehaug 1995). Viral infeksiyonlar da ise tedavi mümkün değildir ve hastalığın görüldüğü tesisler de yeniden üretime geçmeden önce enfekte stoğun imha edilmesi gereklidir. Bu nedenlerden dolayı yapılan araştırmaların çoğu hastalığın tedavisi yerine korunma üzerine odaklanmıştır (Heppel ve Davis, 2000). Son yıllarda hastalıkların kontrolü amacıyla aşı uygulaması tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (Bakopoulos, 1995; Thyssen ve Ollevier, 2001). Önemli bakteriyel, viral ve paraziter hastalıkları kontrol etmek için aşılama çalışmaları yoğun olarak devam etmektedir.

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

Su ürünlerinde aşılama hala gelişim aşamasında olmasına rağmen, kullanılan aşılardan uzun süre koruma sağladığı kanıtlanmıştır. Günümüzde ticari aşılardan çoğu enjeksiyon ve kısa süreli banyo (immersiyon), son yıllarda da oral yolla verilecek şekilde formüle edilmiştir (Ellis, 1988; Joosten vd.,1995; Joosten vd.,1997; Midtlyng, 1997). Vibriosis ve yersiniozis aşılardan kısa süreli banyo ve enjeksiyonla etkili bir şekilde verilebilmektedir. Bununla birlikte soğuk su vibriosisi ve furunkulosis gibi bazı aşılarda optimal etkiyi elde etmek için enjeksiyon içinde adjuvantında bulundurulması gerekmektedir (Ellis, 1988).

2.7. Bakteriyel Aşılar

Günümüzde su ürünleri yetiştiriciliği için önemli problemlere neden olan bakteriyel hastalıklara karşı aşılar mevcuttur (Çizelge 2.3-2.4). Bu aşılar genellikle formalin uygulaması ile inaktif edilen bakterinleri içerir ve bu bakterinler çoğunlukla adjuvant ile emülsiyon haline getirilerek intraperitoneal enjeksiyon ile balığa uygulanır. Ticari olarak vibriosis (*Listonella anguillarum*, *Vibrio ordalii*), furunkulosis (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*), soğuk su vibriosisi (*Vibrio salmonicida*), yersiniosis (*Yersinia ruckeri*), pasteurellosis (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*), edwardsiellosis (*Edwardsiella ictaluri*), kış ülseri (*Moritella viscosa*), ve streptococcosis/lactococcosis (*Streptococcus iniae*, *Lactococcus garviae*)' e karşı bakteriyel aşılar mevcuttur (Hastein vd., 2005; Sommerset vd.,2005; Neary vd., 2008).

Genel olarak bakteriyel hastalıklara karşı aşıların etkisi olumludur. En iyi koruma adjuvantlı, enjeksiyon yolu ile uygulanan aşılardan elde edilmiştir. Fakat, bu tip ürünler kullanıldığı zaman enjekte edilen bölgede bazı yan etkiler görülebilmektedir (Morrison vd., 2001; Hastein vd., 2005; Neary vd., 2008).

Çizelge 2. 3. Salmonidlerde bakteriyel hastalıklara karşı kullanılan ticari aşılar (Sommerset vd.,2005)

Hastalık	Balık Türü	Mevcut Ticari Aşılar
Bakteriyel Böbrek Hastalığı	Salmonidler	Var
Soğuk-Su Vibriosisi	Salmonidler	Var
Piscirickettsiosis	Salmonidler	Var
Kış Ülseri	Salmonidler	Var
Furunkulosis	Salmonidler	Var
Yersiniosis	Salmonidler,	Var
Columnaris	Salmonidler,	Var
Streptococcosis	Salmonidler	Var
Lactococcosis	Gökkuşağı alabalığı	Var

Çizelge 2. 4. Salmonidlerde deneysel anlamda Çalışılan Bakteriyel Aşılar

Bakteriyel Hastalık	Etken	Balık türü	Uygulama yöntemi	Koruma	Referans
Lactococcosis	<i>Lactococcus garvieae</i>	Gökkuşaağı alabalığı	Oral i.p.enjeksiyon	EVET	Altun vd., 2010
	<i>Lactococcus garvieae</i>	Gökkuşaağı alabalığı	i.p. enjeksiyon	EVET	Kubilay vd., 2008
Lactococcosis	<i>Lactococcus garvieae</i>	Gökkuşaağı alabalığı	i.p. enjeksiyon	EVET	Vendrell vd., 2007
	<i>Lactococcus garvieae</i>	Gökkuşaağı alabalığı	i.p. enjeksiyon	EVET	Ravelo vd., 2006
	<i>Lactococcus garvieae</i>	Gökkuşaağı alabalığı	Oral İp+oral	KİSMİ EVET	Romalde vd., 2004
	<i>Lactococcus garvieae</i>	Gökkuşaağı alabalığı	i.p. enjeksiyon	EVET	Ceschia, vd., 1998
Streptococcosis	<i>Streptococcus iniae</i>	Gökkuşaağı alabalığı	i.p enjeksiyon	EVET	Soltani, vd., 2007
			İmmersiyon	HAYIR	
			Oral	HAYIR	
	<i>Streptococcus iniae</i>	Gökkuşaağı alabalığı	i.p. enjeksiyon	EVET	Eldar vd., 1997
Piscirickettsiosis	<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Coho salmon	i.m.	KİSMİ	Miquel vd., 2003
BKD	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Gökkuşaağı alabalığı	DNA - i.m. i.m. enjeksiyon	HAYIR EVET	Go'mez-Chiarri vd.,1996
Vibriosis	<i>Vibrio anguillarum</i>	Gökkuşaağı alabalığı	Oral	EVET	Lillehaug, 1989
Soğuk Su Hastalığı	<i>Flexibacter psychrophilum</i>	Coho salmon	İ.p. enjeksiyon	EVET	Holt, 1987
	<i>Flexibacter psychrophilum</i>	Gökkuşaağı alabalığı	Banyo aş	EVET	Obach ve Baudin Laurencin, 1991
Yersiniosis	<i>Yersinia ruckeri</i>	Gökkuşaağı alabalığı	Banyo aş	EVET	Raida ve BulleBuchmann, 2008
	<i>Yersinia ruckeri</i>	Gökkuşaağı alabalığı	İp enjeksiyon (Canlı-DNA)	EVET	Temprano vd., 2005

2.8. *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 deneysel aşı çalışmaları yapılmıştır (Lamers vd., 1985; Baba vd., 1988; Leong vd., 1997; Rahman ve Kawai, 2000).

Lamers vd. (1985) yılında sazanlara, ısıyla inaktif edilmiş *A.hydrophila* aşısının daldırma yöntemi ile uyguladıklarında serum antikor düzeylerinde bir artış ve İnaktif tüm hücre (Whole cell,WC) aşılarının etkili olduğu bildirilmiştir.

Kusuda vd., (1987) yılında sazanlara uygulanan formalinle inaktif edilmiş *A.hydrophila* aşısının total serum protein konsantrasyonlarında bir artışa neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

Gökkuşığı alabalıklarında injeksiyon, immersiyon ve oral olarak uygulanan *A.hydrophila* aşısı ile serumdaki antikor üretiminde artış gözlemlemişlerdir (Loghothesis ve Austin, 1994). *A.hydrophila*'ya karşı -Dış Membran Proteinleri'nden hazırlanan (Outer Membrane Protein, OMP) aşı ile yüksek bir koruma görülmüş ve seçilen OMP antijenlerinden hazırlanan aşının etkili olduğu belirtilmiştir (Rahman ve Kawai, 2000).

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

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

Sazan (30-40 gr) balıklarında yapılan bir aşı çalışmasında 6 virulent *A. hydrophila* suşu ile hazırlanan aşının adjuvantla birlikte koruyuculuğunun belirlendiği çalışmada balıklarda % 56-

87 arasında RPS değeri elde edilmiştir. Sonuçta 6 farklı virulent suş için adjuvantlı aşının koruma sağladığı ve kullanılabileceğini tespit etmişlerdir (Poobalane vd., 2010).

Bastardo vd. (2012), yılında yaptıkları çalışmada, *L. garvieae* ve *A. hydrophila* karşı hazırlanan bivalent aşının gökkuşağı alabalığında koruyuculuğunu değerlendirmişlerdir. Formalin ile inaktive edilmiş bivalent aşı yanı sıra ISA-763'ü içeren adjuvant ile aşı hazırlanmıştır. Aşılamadan 30. ve 90. gün sonra *L. garvieae* ve *A. hydrophila* karşı eprüvasyon yapılmış, sulandırılmış ve adjuvantlı aşılar sırasıyla 30. gün sonrasında *L.garvieae* patojenine karşı %100 ve % 95.3 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, daha sonra suyla hazırlanan bivalent aşılarda *L.garvieae* ve *A.hydrophila* RPS oranları *L.garvieae* için % 76.A. *hydrophila* karşı % 85 RPS oranında azalmaya karşın 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 aşılarda etkili bir şekilde koruyabileceği ve alabalık işletmelerinde bu patojenlerden kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi içinde uygun bir aşı olarak önerilebileceğini belirtmişlerdir.

A. hydrophila enfeksiyonlara karşı korunması için uygun ticari bir aşı bulunmamaktadır. Ticari aşılarda eksikliğinin nedeni *A. hydrophila* sero gruplarının farklı izolatlarına karşı aşılarda etkinliğinin azalmasının sonucu bu bakterinin yüksek heterojenitesi ile ilgili olabileceği ifade edilmiştir (Lapatra vd. 2010, Bastardo vd. 2012).

2.9. Balık Aşılarında Kullanılan Adjuvantlar (Aşıların Etkinliğini Artıran Maddeler)

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. Aşılarında 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 uyuracak 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 artışıını 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).

2.9.1. Adjuvantların görevleri

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

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal

3.1.1.Balık materyali ve uyguluma yeri

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

Araştırmada virülens çalışmaları için 200 adet, toksitide denemeleri için 100 adet, immersiyon aşı uygulamaları için 180 adet (ortalama ağırlık 3,28 g), ayrıca i.p. enjeksiyon yoluyla aşı denemesi (canlı ağırlık ortalama 15-20 g). Boy ortalaması 8-10 cm olan 1080 adet olmak üzere toplam 1560 adet sağlıklı gökkuşuğu alabalığı kullanılmıştır.

Balıklar Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi'nde betonarme havuzlara yerleştirilmiştir. Havuzlarda bulunan balıklar 21 gün boyunca gözlemlenerek adaptasyonu sağlandıktan sonra eprüvasyon için denemenin sürdürüleceği Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Ünitesi'nde ki 16 adet yuvarlak fiberglas (0,6 m³ hacimli, 450 lt su bulunan) tank (Şekil 3.1.) kullanılmıştır.



Şekil 3. 1. Denemenin gerçekleştirildiği balık üretim tesisi ve denemede kullanılan fiberglas balık tankları

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Su Kaynağı ve Suyun Kalitesi

Araştırma süresince deneme gruplarında kullanılan artezyen suyun debisi 12 L/dk, tanklardaki suyun ortalama sıcaklığı 12,3-12,5, pH'sı 7,2 ve suda çözünmüş oksijen miktarı 7,4 mg/lt olarak ölçülmüştür.

3.1.3. Araştırmada Kullanılan Yem

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

Çizelge 3. 1. Deneme süresince kullanılan ticari alabalık yeminin kimyasal besin bileşenleri

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

3.1.4. Araştırmada kullanılan *Aeromonas hydrophila* suşları

Araştırmada hasta balıklardan izole 10 adet *Aeromonas hydrophila* suşu kullanılmıştır. Bu suşların kökenleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan *Aeromonas hydrophila* suşları

No	Tür	Köken
1	Gökkuşığı Alabalığı	Karadeniz(AH5)
2	Japon Balığı	Antalya (AHJ)
3	Gökkuşığı Alabalığı	Karadeniz(AH15)
4	Sazan Balığı	Antalya (AHS)
5	Gökkuşığı Alabalığı	Karadeniz (AH 12.1)
6	Gökkuşığı Alabalığı	Karadeniz (AH 4)
7	Gökkuşığı Alabalığı	Ege (AH 59)
8	Gökkuşığı Alabalığı	Karadeniz (AH14)
9	Gökkuşığı Alabalığı	Ege (AH 98)
10	Kafes suyu	Karadeniz (AH 94)

3.1.5. *Aeromonas hydrophila* Aşılarının Hazırlandığı Kuruluş

Bu araştırmada, immersiyon ve enjeksiyon uygulaması için *A. hydrophila* aşıları Vetah Hayvan Sağlığı Tic. A.Ş., Organize Sanayi Bölgesi / ADIYAMAN'da hazırlanmıştır.

3.1.6. Araştırmada Kullanılan Adjuvantlar

Araştırmada adjuvant olarak glukoz (Sigma G5011), Freund's Complete Adjuvant (FCA) (Sigma-F5881) ve Montanide ISA 763 AVG (Seppic, Fransa) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Etken izolasyonu ve saflaştırılması

Yapılan çalışmalar sonucunda deneysel aşı üretiminde kullanılmak üzere seçimi yapılan bakteri suşları stok kültürden triptik soy agar (TSA) besiyerine alınarak 22 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda üreyen bakterilerin saflık kontrolleri yapılmıştır. İzole ettiğimiz suşlar saflaştırılarak genel bakteriyolojik testleri ve API 20NE testi yapılarak etkenin özellikleri belirlenmiştir (Austin ve Austin, 2007).

3.2.2. *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 Merieux) hızlı teşhis kitikullanılmıştır (Austin ve Austin, 2007).

3.2.3. Geleneksel bakteriyolojik testler ve API 20 NE testi

A. hydrophila suşlarında Gram boyama, oksidasyon-fermentasyon (O/F), hareket testi (asıllı damla metodu), sitokrom oksidaz, katalaz, O/129 geleneksel bakteriyolojik testler yapılmış ayrıca tüm suşlarında genç kültürleri 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

kültürler 22°C’de 24 saat süreyle inkübe edilerek, test sonuçları değerlendirilmiştir (Austin ve Austin, 2007).

3.2.4. Aşının Hazırlanması

3.2.4.1. Aşı suşunun seçimi

Aşı hazırlamada kullanılacak suşların seçimi virulens testlerinin sonuçlara göre değerlendirilerek yapılmıştır (Ellis, 1988; Larsen ve Pedersen, 1997). Araştırmada 10 farklı *A.hydrophila* suşu üzerinde virülens çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla 10⁸ bakteri/ml yoğunluğunda hazırlanan *A.hydrophila* suşları 20’şer adet gökkuşağı alabalığına intraperitoneal yolla (0.1 ml) verilerek deneysel enfeksiyon oluşturulmuş ve balıklar 21 gün süreyle takip edilmiştir. Ayrıca kontrol grubuna da (0.1) ml PBS i.p. olarak verilmiştir. Ölen balıklardan bakterinin reizolasyon amacı ile TSA’ya ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan petrilerde üreyen bakterinin Gram-negatif, sitokrom oksidaz, katalaz, hareketlilik ve O/129 (Vibriostat testi) testine duyarlı olup olmadığı belirlenmiştir. Böylelikle ölümlerin gökkuşağı alabalıklarına verilen *A.hydrophila* suşlarından kaynaklandığı teyit edilmiştir.

A.hydrophila suşları arasında virülensi yüksek olanlar ve farklı balık türlerinden izole edilenlerin arasından AHS suşu aşı suşu olarak seçilmiştir. Bu tez çalışmasında, 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.

3.2.4.2. Aşının üretimi

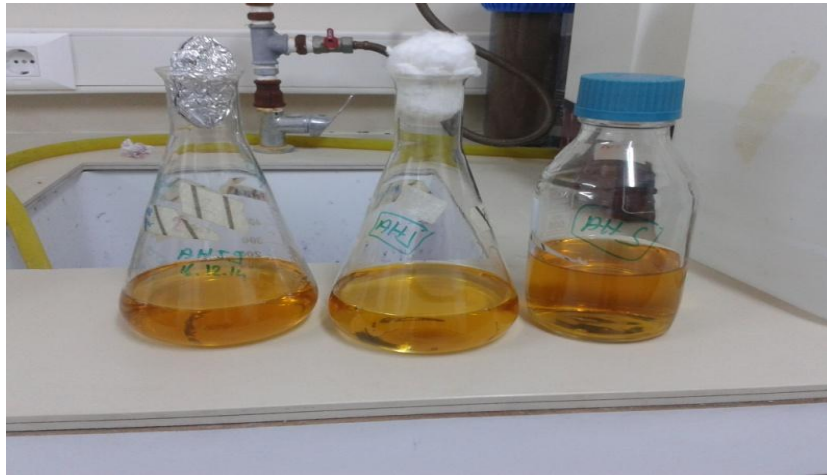
Aşı üretiminde kullanılan *A.hydrophila* suşları Tryptic Soy Broth (TSB) içerisinde 22⁰ C’de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üreyen kültür soğutmalı santrifüj (SİGMA 2-16K)’de 5000 devirde 20 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen bakteri çökeleği Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.2) ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra süspansiyon % 1’lik formaldehit solüsyonu içinde oda sıcaklığında 1 saat ve +4 °C’de bir gece olacak şekilde inaktivasyona bırakılmıştır (Bastardo vd., 2012). İnaktivasyonun sonunda aşı solüsyonundan formaldehiti uzaklaştırmak amacıyla 2 kez PBS ile yıkanmış ve son konsantrasyon 12x10⁸ 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

Bu çalışmada monovalan aşı AHS suşunda, polivalan aşı ise AHS, AHJ ve AH1 suşları kullanılarak hazırlanmıştır. Adjuvanlı hazırlanan aşılara; FCA 1:1 oranında, Montanide (ISA 763 AVG); 30:70 oranında ilave edilmiştir. Hazırlanan deneysel aşı, immersiye ve i.p. enjeksiyon yolu ile immunizasyonda kullanılmıştır.

3.2.4.3. Sterilite testi

Üretilen aşılar da herhangi bir mikrobiyal kontaminasyonunun varlığı tespit etmek için sterilite testi yapılmıştır. Bu amaçla hazırlanan aşılar dan Brain heart ifusion agar (BHI), Triptik soy agar (TSA), Sıvı thioglycolate medium, MacConky agar (MCA), kanlı agar, savoraraude dextrose agar ve TSB besiyerine 2 paralel olacak şekilde ekim yapılarak 22 ve 36 °C de 21 gün süreyle inkübasyona tabi tutulmuştur. Sterilite kontrolü yapılmış olan aşılar +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Ellis, 1988). (Şekil 3.2.)



Şekil 3. 2. Sterilite kontrolü yapılan steril aşılar

3.2.4.4. Toksisite denemeleri

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

3.2.5. Aşıların Uygulanması

Çalışmamızda, ülkemizden izole edilmiş *A. hydrophila* suşları ile hazırlanan aşılar immersiyon ve enjeksiyon yoluyla gökkuşağı alabalıklarına 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 uygulanmıştır.

Denemede toplam 7 grup kullanılmış ve deneme 2 paralel yapılmıştır. Denemede monovalan aşı immersiyon ve enjeksiyon yoluyla; polivalan aşı enjeksiyon yoluyla; monovalan aşı + glukan , monovalan aşı + FCA ve monovalan aşı + Montanide' li aşılar enjeksiyon yoluyla kullanılmıştır.

Deneme 2 tekerrürlü olarak yapılmış ve 7 farklı grup oluşturulmuştur;

1. grup; ortalama 3 g ağırlığında 40 adet gökkuşağı alabalığına polivalan 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 gökkuşağı alabalığına monovalan aşı i.p. enjeksiyon yöntemi ile (0,1 ml) uygulanmıştır. Aşılanmış balıklara 30 gün sonra aynı yöntemle rapel uygulanmıştır.

3. grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet gökkuşağı alabalığına polivalan aşı + FCA adjuvantı (1:1) ile i.p. enjeksiyon yöntemi (0,1 ml) ile uygulanmıştır.

4. grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet gökkuşağı alabalığına polivalan aşı + glukan (100 µg/ml) adjuvantı ile i.p. enjeksiyon yöntemi (0.1 ml) uygulanmış.

5. grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet gökkuşağı alabalığına polivalan aşı i.p. enjeksiyon yöntemi ile (0.1 ml) uygulanmıştır. Aşılanmış balıklara 30 gün sonra monovalan aşı i.p. enjeksiyon yolu ile rapel yapılmıştır.

6. grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet gökkuşağı alabalığına polivalan aşı + glukon (100 µg/ml) adjuvantı i.p. enjeksiyon yöntem ile (0.1 ml) uygulanmıştır.

7. grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet gökkuşağı alabalığına *Lactococcus garvieae* ve polivalan *A. hydrophila* aşı ve Montanide ISA 763 AVG adjuvantı (30:70) ile i.p. enjeksiyon yöntem ile (0.1) ml uygulanmıştır.

8. grup; ortalama 20 g ağırlığında 40 adet gökkuşağı alabalığına PBS (0.1 ml) i.p. yöntemi uygulanmış. Çizelge 3.3.'de deneme grupları ve uygulama şekilleri özetlenerek verilmiştir.

Çizelge 3. 3. Aşı deneme grupları ve uygulama şekilleri

Deney Grupları	Uygulama Metodu ve Miktarı	Balık Sayısı	Tekrar Sayısı
Poli – im Rapel	1:10 oranında sulandırılarak 1 dk immersiyon	40(20X2)	2
Mono - i.p. Rapel	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml, 30 gün sonra mono rapel	40(20X2)	2
Poli - FCA (1:1) i.p.	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml, 30 gün sonra mono rapel	40(20X2)	2
Poli– i.p., rapel	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml	40(20X2)	2
Poli – Glukon i.p.	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml	40(20X2)	2
Poli + ISA 763 AVG (30:70)	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml	40(20X2)	2
Kontrol , Aeromonas	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml	40(20X2)	2
Kontrol ,Lactococ	Enjeksiyon i.p., 0.1 ml	40(20X2)	2

3.2.6. Aşı Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Gökkuşığı alabalıklarına uygulanan aşının etkinliği eprüvasyon uygulaması ve balıkların kan serumunda oluşan antikor titresinin belirlenmesi ile değerlendirilmiştir (Ellis 1997).

3.2.7. Eprüvasyon Uygulamaları

Öncelikle homolog ve virülensi en yüksek olan *A. hydrophila* AHS ile % 60 suşunun ölüm yapan (LD₆₀) sayısı belirlenmiştir. LD₆₀ dozunun belirlenmesinde her grupta 20'şer adet gökkuşığı alabalığı (ort. 20g) kullanılmıştır. *A. hydrophila* AHS suşu 10⁴, 10⁶ ve 10⁸ cfu/ml aralığında hazırlanan konsantrasyonlarda balıklara uygulanmış ve denenerek LD₆₀ dozu 10⁸ cfu/ml olarak belirlenmiştir.

Aşılamadan sonra balıklara aşı uygulamasını takiben 30.ve 90. günlerde eprüvasyon uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla balıklar karanfil yağı ile bayıltılarak tüm gruplara LD₆₀ dozunda hazırlanan bakteriden 0,1 ml olacak şekilde enjekte edilmiştir. Eprüvasyon uygulanan balıklar 21 gün boyunca izlenerek, ölen balıkların iç organlarından da reizolasyon amacıyla TSA'ya ekimler yapılmıştır. *A. hydrophila* izole edilen balıklardan spesifik mortalite olarak kaydedilmiştir (Johnson ve Amend, 1983a; Erdal, 1989; Bastardo vd., 2012).

Eprüvasyon uygulanması sonucu elde edilen ölüm oranlarına göre balıkların nispi hayatta kalma yüzdeleri (% RPS) belirlenmiştir.

$$RPS=[1-(\text{Aşılı Balıklarda Ölüm Miktarı}\% / \text{Kontrol Grubunda Ölüm Miktarı}\%)] \times 100$$

3.2.8. Bağışıklığın Değerlendirilmesi

Aşılı ve kontrol grubu balıklarından, 30. ve 90. günlerde her gruptan rastgele seçilen 5 balıktan kuyruk sapı kesilerek kan örneği alınmış ve serumları elde edilerek derin dondurucuda -20 °C' de kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.9. 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 yapılmıştır (Arkoosh ve Kaattari, 1993; Kubilay ve Timur, 2001).

3.2.10. Aglutinasyon testi

3.2.10.1. 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 % 0.6 formaldehit ilave edilmiş +4° C de 24 saat bekletilmiştir. PBS ile iki kez yıkandıktan sonra PBS ile sulandırılmıştır. Sulandırma sonucu oluşan süspansiyon yoğunluğu spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0.8 Optik dansiteye (OD) göre ayarlanmıştır. Böylece hazırlanan antijen somatik O antijeni olarak mikroaglutinasyon testinde kullanılmak üzere +4 °C saklanmıştır (Sorensen ve Larsen, 1986).

3.2.10.2. Lam aglutinasyon testinin uygulanması

Temiz bir lam üzerine bir damla test serumundan ve bir damla da önceden hazırlanmış aglutinasyon antijeninden damlatılarak lamin 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).

3.2.10.3. Mikro - aglutinasyon testinin uygulanması

Gökkuşağı alabalıklarının serumunda antikor titrelerinin belirlenmesi amacıyla mikro-aglutinasyon testi yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan yuvarlak tabanlı polyester mikropakanın 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. Mikropalakalar 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 mikrop lakanın 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).

3.3.İstatistiki Hesaplamalar

Denemede aş ıların sağladığı bağışıklık, ölümler ve RPS verileri SPSS 16.0 istatistik programında varyans analizi ve Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi ile 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 kullanılan 10 adet *Aeromonas hydrophila* suşu hasta balıklardan izole edilmiştir. *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 yapılan için biyokimyasal testlerden sitokram oksidaz ve katalaz testinde pozitif reaksiyon verdiği, O/F testinde fermantatif olduğu tespit edilmiştir.

Suşların vibriostat (O/129)testinde ise dirençli oldukları görülmüştür. Sadece sitrat tesitinde AHS ve AHJ suşları pozitif reaksiyon verirken diğerleri negatif sonuç vermiştir. *A. hydrophila* suşların konvansiyonal testler ve API 20 NE hızlı teşhis kiti ile yapılan testlerden elde edilen fenotipik özellikleri Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1. *A. hydrophila* suşlarının konvansiyonel yöntemler ve API 20NE hızlı teşhis kitlerine göre elde edilen fenotipik özelliklerine ait bulgular (22 °C 24 saatlik)

	AH5	AH15	AH12.1	AH4	AHS (Sazan)	AHJ (Japon Balığı)	AHG59	AHG14	AHG98	AH94
Aeromonas isolasyon agar üreme	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Yeşil	Yeşil
Gram boyama	-, çubuk	-, çubuk	-, çubuk	-, çubuk	-, çubuk	-, çubuk	-, çubuk	-, çubuk	-, çubuk	-,çubuk
S.O.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
O/129 (50µg)	Dirençli	Direnç li	Direnç li	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
Arginin dihidrolaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Üre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triptofan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskülin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β Galaktosidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N- asetil glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Potasyum glukonat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kaprik asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malik asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adipik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trisodyum sitrata	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Fenilasetik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatin Hidrolizasyonu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



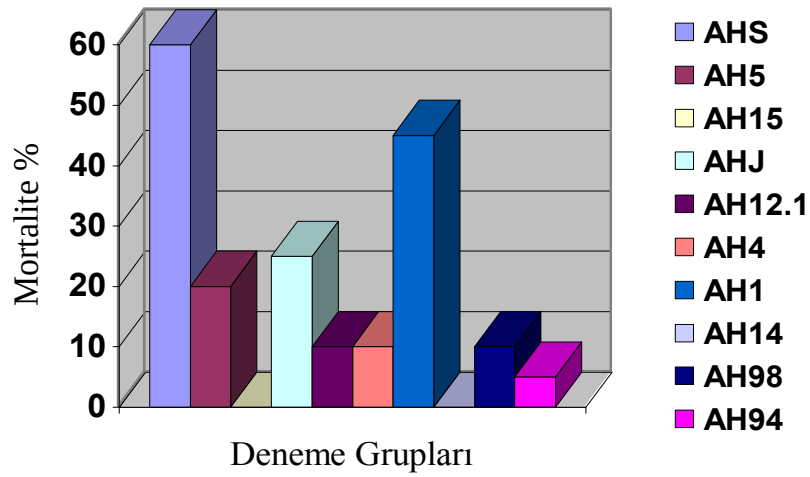
Şekil 4. 1. Aeromonas izolet agarda yeşil renkli *A. hydrophila* kolonileri

4.2. Aşı Suşunun Seçimi Amacıyla Yapılan Virülens Çalışmalarına Ait Bulgular

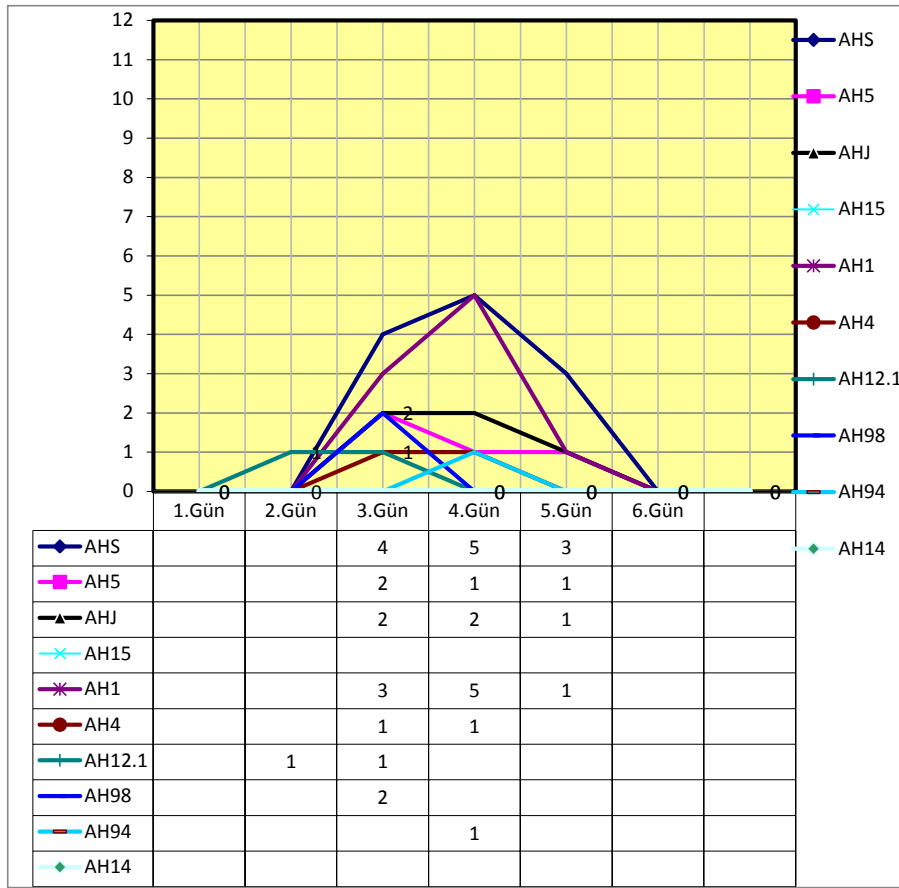
A. hydrophila patojeninin serolojik ve genotipik olarak çok heterojen olması nedeni ile aşı suşunun seçiminde virülens denemeleri yapılmış ve virülensi en yüksek olan suşlar aşı hazırlamak için seçilmiştir. *A. hydrophila* suşlarının virülens durumlarının belirlenmesi sırasında suşların hepsinin sayısı 10^8 cfu/ ml olacak şekilde balıklara verilmiştir. Bu amaçla suşların önceden koloni sayım yöntemi ile sayısı belirlenmiş ve kültürlerin O.D. değerleri spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.). Hazırlanan canlı patojenler Gökkuşaağı alabalıklarına i.p. yolla 0.1 ml verilmiştir. Bu nedenle çalışmada kullanılan tüm *A. hydrophila* suşlarının OD değerleri 0.8'e ayarlanmıştır. Balıklara patojen verilmesinden 3. Gün sonra balıklarda ölümler başlamıştır. Standart hale getirilmiş 600 nm de 0.8 O.D. değerine göre hazırlanan bakteri süspansiyonundan balıklara 0,1 ml miktarında i.p. olarak enjekte edilmesinden 21 gün süre ile tüm gruplarda ölen balık sayıları kaydedilmiştir. En fazla ölüm oranı AHS suşunun enjekte edildiği grupta (%60) görülmüş bunu AH1 (%45) ve AHJ (%25) suşları takip etmiştir (Çizelge 4.2., Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.)

Çizelge 4. 2. *A.hydrophila* suşlarının virülens durumlarının belirlenmesi

Suş No	Toplam Balık	Ölen Balık	Ölüm Oranı %	cfu/ml	Optik Dansite (O.D.) (600 nm)
AHS	20	12	%60	1×10^8	0.869
AH5	20	4	%20	1×10^8	0.814
AH15	20	-	%0	1×10^8	0.876
AHJ	20	5	%25	1×10^8	0.837
AH12.1	20	2	%10	1×10^8	0.852
AH4	20	2	%10	1×10^8	0.770
AH1	20	9	%45	1×10^8	0.877
AH14	20	-	%0	1×10^8	0.879
AH98	20	2	%10	1×10^8	0.857
AH94	20	1	%5	1×10^8	0.818



Şekil 4. 2. Farklı *A.hydrophila* suşların oluşturduğu mortalite (%)



Şekil 4. 3. *A. hydrophila* suşları ile deneysel enfeksiyondan sonra günlere göre ölen balık sayısı

4.3. LD₆₀ dozunun belirlenmesi amacıyla yapılan eprüvasyon denemesine ait bulgular

Denemede kullanılan aşılardan etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan eprüvasyon denemelerinde kullanılmak üzere AHS suşu LD₆₀ dozunda kullanılmıştır. LD₆₀ dozunu tespit etmek amacıyla yapılan deneysel enfeksiyon sonuçları çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 3. LD₆₀ oranının tespitinde deneysel enfeksiyon sonuçları

Balık Sayısı	Ölen Balık Sayısı	Ölüm Oranı %	cfu/ml	LD ₆₀ **
20	12	60	1x10 ⁸	1x10 ⁸
20	3	15	1x10 ⁶	
20	2	10	1x10 ⁴	

*cfu/ml: Mililitredeki canlı bakteri sayısı, **LD₆₀: Bir balık popülasyonunun %60 öldürebilen doz

Ortalama ağırlıkları 20 gr olan balıklar 1x10⁸ cfu/ml dozunda *A.hydrophila* AHS suşuna maruz bırakıldığında (i.p. yolla, 0.1 ml miktarda enjekte edilen) % 60 oranında ölüm meydana gelmiş ve bu doz LD₆₀ değeri olarak balıkların eprüvasyonunda kullanılmıştır.

4.4. Hazırlanan aşının toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerin sonuçlarına ait bulgular

Hazırlanan inaktif aşılarda Gökkuşaklı alabalıklarına enjeksiyon yolu ile verilerek toksisite denemsi yapılmış ve balıklarda herhangi bir ölüm veya olumsuzluk gözlenmemiştir. Böylece hazırlanan aşılarda balıklar üzerinde toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

4.5. Deneysel aşılarda balıklarda sağladığı bağışıklık seviyesinin belirlenmesine ait ilgili bulgular

Deneysel aşılarda etkinliğini değerlendirmek için, çalışmada kullanılan balık grupları LD₆₀ oranında *A.hydrophila* AHS suşuna (1x10⁸cfu/ml) maruz bırakılmıştır. İlk aşılarda poli (i.p.) aşı ve rapelde ve mono (i.p.) aşı enjeksiyon ile aşılanan balıklarda 30. ve 90. günlerde RPS değeri ile diğer uygulama yöntemlere göre istatistiki olarak önemli bulunmuştur (p<0.05) (Çizelge 4.5). İmmersiyon yolla aşılanan balıklarda 30. günde kontrol grubu ile istatistiki olarak farklılık gözlenmemiştir. Adjuvant kullanılarak aşılanan balık gruplarında ise 30. ve 90. günde elde edilen koruma diğer aşı gruplarından istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Poli (i.p.) + poli (i.p.) aşı uygulamayı takiben poli (i.p.) + FCA adjuvantlı aşı uygulanan grupta ise 30. ve 90. günlerde en yüksek koruma elde edilmiş ve bu günler arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (p>0.05) (Çizelge 4.4)

Yapılan aşı uygulamaları sonucu en iyi RPS değeri Lactococ- Aeromonas-ISA 763 AVG aşısında elde edilmiş, bunu sırasıyla poli (i.p.) + poli (i.p.) grubunda elde edilmiş bu grubu sırası ile poli + FCA, poli + glukon ve mono (i.p.) + mono (i.p.) grupları takip etmiştir. Mono (i.m.) + mono (i.m.) grubunda ise RPS oranı çok düşük bulunmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4. Gökkuşuğu alabalıklarında 30 ve 90. günlerde yapılan deneysel enfeksiyon (LD₆₀) sonrası elde edilen RPS değerleri

Deney Grupları	30.Gün				90.Gün			RPS (%)
	Balık Sayısı	Ölen Balık sayısı Ort. -S.H.	Mortalite (%)	RPS (%)	Balık Sayısı	Ölen Balık sayısı Ort. -S.H.	Mortalite (%) (LD ₆₀)	
Poli – im rapel	20/20	-	-	-	20/20	10/12 11,00±1,00 ^a	55	45,00±5,00 ^c
Mono i.p rapel	20/20	3/3 3,00±0,00 ^b	15	85,00±0,00 ^c	20/20	5/3 4,00±1,00 ^b	20	80,00±5,00 ^b
Poli - i.p.rapel	20/20	1/2 1,50±0,50 ^{bcd}	7,5	92,50±2,50 ^{abc}	20/20	3/2 2,50±0,50 ^{bc}	12,5	87,50±2,50 ^{ab}
Poli– Glukan		3/2 2,50±0,50 ^{bc}	12,5	87,50±2,50 ^{bc}	20/20	4/4 4,00±0,00 ^b	20	80,00±0,00 ^b
Poli – FCA	20/20	3/1 2,00±1,00 ^{bc}	10	90,00±5,00 ^{bc}	20/20	2/2 2,00±0,00 ^{bc}	10	90,00±0,00 ^{ab}
Lactococ-ISA 763 AVG	20/20	0/0 0,00±0,00 ^d	0	100,00±0,00 ^a	20/20	1/0 0,50±0,50 ^c	2,5	97,50±2,50 ^a
Aeromonas ISA 763 AVG	20/20	1/1 1,00±0,00 ^{cd}	5	95,00±0,00 ^{ab}	20/20	2/2 2,00±0,00 ^{bc}	10	90,00±0,00 ^{ab}
Kontrol Aeromonas	20/20	12/13 12,00±0,00 ^a	62.5	40,00±0,00 ^d	20/20	13/11 12,00±1,00 ^a	60	40,00±5,00 ^c
Kontrol Lactococcus	20/20	12/12 12,50±0,50 ^a	60	37,50±2,50 ^d	20/20	12/12 12,00±0,00 ^a	60	40,00±0,00 ^c

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

4.6. Deneysel eprüvasyon uygulanan balıkların semptomları ve kümülatif mortalite oranları

Aşılamanın 30. ve 90. gününden sonra yapılan eprüvasyon uygulaması takiben yaklaşık 48 saat sonra kontrol gruplarında ölümler başlamış ve bu ölümlerde 2 ile 6. günler arasında yoğunlaşmıştır. Altıncı günden itibaren ölümler azalmış ve balıklar 21 güne kadar izlenmiştir. Eprüvasyon sonrası günlere göre ölen balık sayısı çizelge 4.5. verilmiştir. Patojen uygulamasından sonra yeni ölmüş balıklardan yapılan re-izolasyonlarda balıkların iç organlarında spesifik patojen izole edilmiştir. Hasta ve yeni ölmüş balıklarda tipik olarak renkte açılma ve lateral line boyunca pembe –kırmızı çizgi, yüzgeç kaidelerinde hemorojiler ve otopside viseral organlarda hiperemi ve hemorojilerle birlikte iç organların tamamen erimiş bir halde olması en belirgin belirtilerdir (Şekil 4.4).

Çizelge 4. 5. Aşılamadan 30. ve 90. günden sonra deneysel eprüvasyon sonrası deneme gruplarında kümülatif mortalitesi

Gruplar Gün	Poli-i.m. %		Mono-i.p. rapel %		Poli-i.p. rapel %		Poli+gluka n %		Poli+FC A %		Lactococ- ISA 763 AVG %		Aeromon as ISA 763 AVG %		Kontrol Aeromona s %		Kontrol Lactococ %	
	30	90	30	90	30	90	30	90	30	90	30	90	30	90	30	90	30	90
1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	-	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.5	2.5	0
3	-	22.5	7.5	7.5	5	5	2.5	7.5	2.5	2.5	0	0	2.5	5	15	15	12.5	17.5
4	-	17.5	2.5	5	2.5	2.5	5	5	7.5	2.5	0	2.5	2.5	2.5	20	15	17.5	20
5	-	5	5	5	0	5	5	5	0	5	0	0	0	2.5	12.5	10	15	15

6	-	0	0	2.5	0	0	0	2.5	0	0	0	0	0	0	5	10	10	7.5
7		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.5	2.5	2.5	0
8	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	0	0	0
Toplam	-	45	15	20	7.5	12.5	12.5	20	10	10	0	2.5	5	10	62.5	60	60	60



(A)



(B)

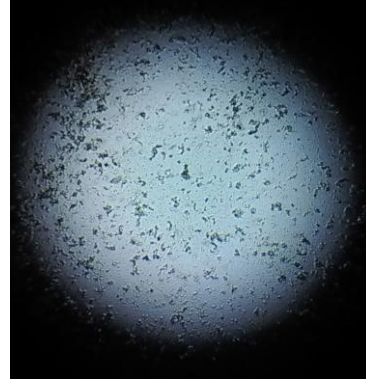
Şekil 4. 4. Deneysel enfeksiyon sonrası balıklar, (A) otopside viseral organlarda hiperemi ve hemorojiler, (B) Renkte açılma ve lateral line boyunca pembe-kırmızı çizgi, yüzgeç kaidelerinde hemorojiler

4.7. Lam Aglutinasyon Testi ile İlgili Bulgular

Aglutinasyon antijeni ile immün test serumunun lam üzerinde karıştırılması halinde aşı gruplarında aglutinasyon görülmüştür (Şekil 4.5. a ve b). Aglutinasyonun oluştuğu ışık mikroskobu altında lam üzerinde bakterilerle antikorun oluşturduğu kümeleşmelerin gözlenmesiyle tespit edilmiştir. Lam aglutinasyonda immersiyon yapılan gruptan balıkların küçük olması nedeni ile 30. günde kan alınamamış 90. günde ise zayıf bir aglutinasyon tespit edilmiştir. Kontrol grubunda aglutinasyon oluşmamıştır. Lam aglutinasyon testinde en kuvvetli aglutinasyon polivalan+FCA adjuvanlı grupta görülmüş bunu sırasıyla polivalan+rapel grubu ve polivalan+glukan takip etmiştir.



A



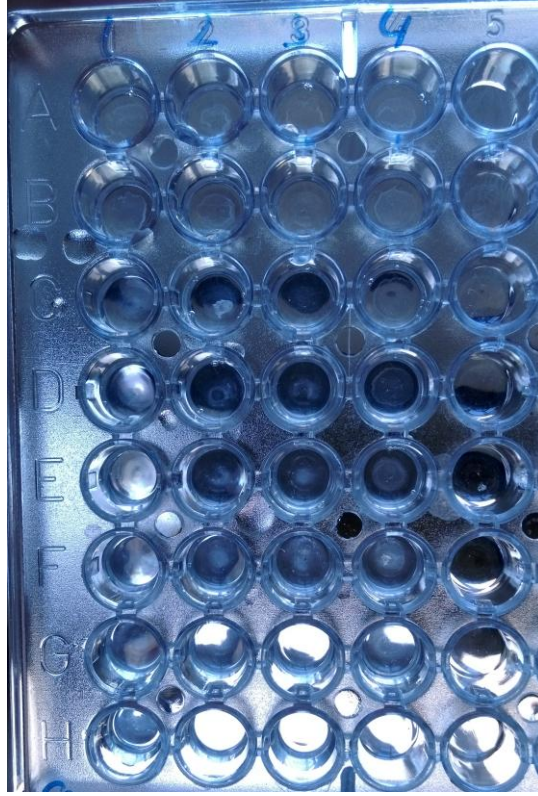
B

Şekil 4. 5. Lam aglutinasyon testinde antikor ve antijenin oluşturduğu kümeler
A) Çıplak gözle, B) Işık mikroskobunda

4.8. Mikroaglutinasyon testine ait bulgular

Aglutinasyon antikorlu içeren test serumlarının polyester yuvarlak tabanlı çukur mikro playt çukurlarında antijen ile karıştırılması sonucunda gözle görülebilen aglutinasyon çökelekleri oluşmuştur (Şekil 4.6).

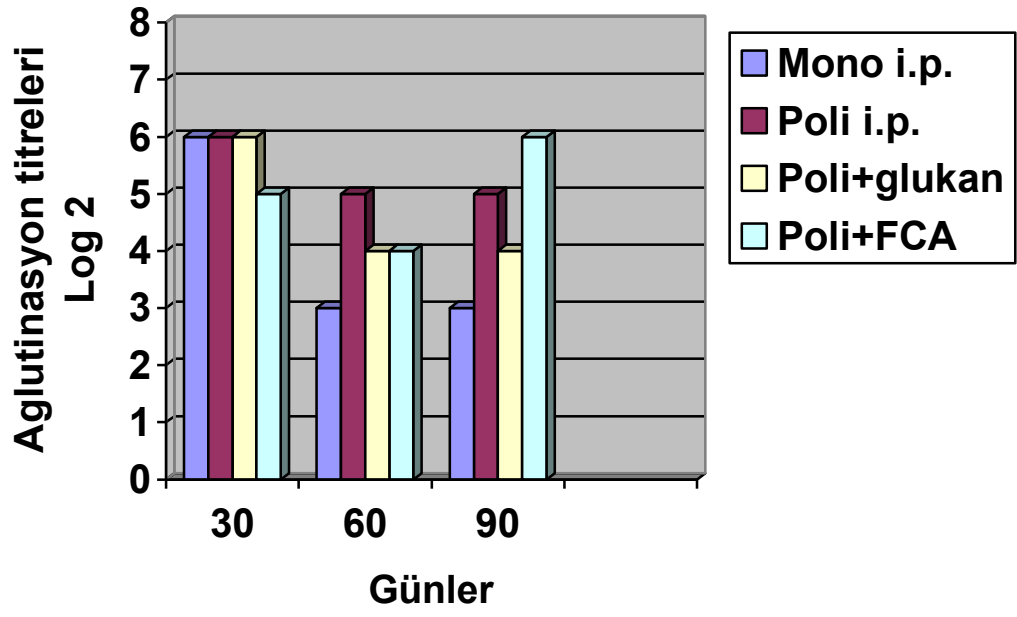
A.hydrophila bakterini ile farklı metotlarla immunize edilen balıklarda 30,60 ve 90. günde elde edilen serumlardan hazırlanan mikroaglutinasyon testine ait antikor titre sonuçları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'de verilmiştir. Çizelge 4.6. 'nin incelenmesinden anlaşılabileceği üzere 30.,60. ve 90.günlerde sırasıyla i.p. enjeksiyon yolu ile aşılardan sırasıyla polivalan+FCA grubunda 1/32, 1/16, 1/64 polivalan grupta 1/64, 1/32, 1/32, monovalan grupta 1/64, 1/8, 1/8, ve polivalan+glukan uygulanan gruplarda 1/64, 1/16, 1/16 dilüsyonunda aglutinasyon görülmüştür (Şekil 4.7.).



Şekil 4. 6. İmmun test serumlarını içeren mikro aglutinasyon playte çukurları

Çizelge 4. 6. Farklı aşılama yöntemleri uygulanan balıklarda immunizasyondan sonraki günlerde mikroaglutinasyon testine göre antikor titreleri

İmmunizasyon sonrası günler	Deneme grupları							
	Mono i.p.		Poli i.p.		Poli+glukan		Poli + FCA	
		Log ₂		Log ₂		Log ₂		Log ₂
30	1/64	6	1/64	6	1/64	6	1/32	5
60	1/8	3	1/32	5	1/16	4	1/16	4
90	1/8	3	1/32	5	1/16	4	1/64	6



Şekil 4. 7. Farklı aşılama yöntemleri uygulanarak immunize edilen alabalıkların kan serumunda oluşan aglutinin titrelerinin (Log₂) günlük dağılımı

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde su ürünleri yetiştiriciliğinde aşı uygulamaları ile çeşitli infeksiyöz hastalıklara karşı ve özellikle de bakteriyel hastalıklara karşı koruma sağlanmaktadır (Schnick vd.,1997). Şu ana kadar, balık aşılarının geliştirilmesi amacıyla deneysel aşı çalışmaları devam etmektedir. Çoğu hastalık için aday aşı formülasyonlarının etkinliği, büyük balık grupları üzerinde test edilmeli ve koruma; balıkların hayatta kalma ve ölüm oranına bakılarak değerlendirilmelidir (Sommerset vd., 2005).

Yetiştiricilik açısından önemli olan çoğu bakteriyel hastalıklara karşı aşılar koruyucu olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Balık çiftliklerinde ekonomik açıdan önemli kayıplara neden olan viral hastalıklar için ise mevcut aşı sınırlıdır ve bu konu üzerinde deneysel anlamda çalışmalar devam etmekte olup, önemli aday aşılar mevcuttur. Eğer deneysel anlamda çalışmalara devam edilen aday aşılarından istenilen sonuçlar elde edilirse, su ürünleri sektörü için hastalık problemlerinden kaynaklanan kayıpların azaltılması umut verici bir yaklaşım olacaktır.

İnsanlarda ve balıklar dahil olmak üzere diğer hayvanlarda aşılama bulaşıcı hastalıkların önlenmesi açısından önemli bir metottur. Enfeksiyonlar sırasında karşılaşılan patojenlere karşı aşılama canlıların bağışıklık sistemini harekete geçirir (Thompson ve Adams, 2004).

Su ürünleri 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 karşı herhangi bir ticari aşı bulunmamasına rağmen deneysel olarak tüm hücre (WC), dış membran proteinleri (OMP), ekstrasellüler proteinler (ECP), LPS ve biofilimli aşılar değişik adjuvantlarla birlikte denenmektedir. Farklı balık türlerinde *A. hydrophila* tarafından oluşan enfeksiyonları önlemek amacıyla deneysel aşılar incelenmiş olmasına rağmen uygun ticari aşı geliştirilmesi mezofilik, hareketli *Aeromonas* türlerinin grup içinde mevcut büyük fenotipik ve serolojik heterojenite (hareketli *Aeromonas* gubu içinde yaklaşık 100 serotipin varlığı bildirilmiştir) göstermesinden dolayı engellenmektedir.

Araştırmaların sonuçları değerlendirildiğinde *A. hydrophila* patojenine karşı belli bir bölgeden izole edilen bakterilerle hazırlanacak aşıların 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 önem arz etmektedir.

A. hydrophila esitli nedenlerle stres altında kalan balıklarda görülen önemli bir enfeksiyona neden olan ve tüm dünyada yaygın olarak bulunan bir balık patojenidir (Snieszko ve Axelrod, 1971; Austin ve Austin, 1987; Roberts, 1993; Aoki, 1999; Austin ve Austin, 1999; Timur ve Timur, 2003).

Aeromonas'a karşı en iyi koruma yöntemi; iyi bir hijyen, yüksek stok yoğunluğundan kaçınma, elle müdahaleyi en aza indirmek gibi önlemlerle birlikte etkin aşıları geliştirmektedir. Bir dizi çalışmada ılık su balık türlerinde *A. hydrophila* karşı aşı konusu ele alınmıştır. Shome and Shome (2005) formalin ile inaktif, toksoid ve canlı aşıları *Catla catla* , *Cirrhinus mrigala* ve kanal yayın balıklarında i.p. enjeksiyon ve daldırma yöntemi ile denemişler ve en etkili aşının, canlı aşının i.p. enjeksiyonla verilmesiyle elde etmişlerdir. *Catla catla* balıklarında formalinle öldürülerek hazırlanan *A. hydrophila* aşısı ile glukanın birlikte verildiği aşının etkili olduğu, sığır laktoferrinin ise iyi bir adjuvant özellik göstermediği bildirilmiştir (Kamilya vd., 2006).

Pullu sazanlar da (*Cyprinus carpio*) L., lipozom içeren *A. hydrophila* antijenleri ile aşılandıktan 22 gün sonrası korumanın oluştuğunu bildirilmiştir (Yasumoto vd., 2006). Gökkuşağı alabalığında, *aroA* geni içeren canlı *A. Hydrophila* aşısının iyi bir seviyede koruma oluşturduğu tespit edilmiştir (Hernanz Moral vd., 1998).

Yapılan tüm bu başarılı alışmlara rağmen, halen herhangi bir balık türü için *A. hydrophila* karşı lisanslı bir aşı yoktur. Bu patojenin çok farklı antijenik profilleri olmasından dolayı otojen aşılarda lokal suşları içeren bira suş ile multivalent aşıların etkili olacağı düşünülmektedir (Stevenson, 1988).

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 aşılama gibi avantajları vardır. Ancak etkisi ve etki süresi enjeksiyona göre daha az ve daha kısa sürelidir (Ellis 1988; Kav ve Erganiş, 2007).

Yaptığımız araştırmada, 3g'lık alabalıklara immersiyon yolu ile aşı uygulanmış ve 90. günde spesifik patojen balıklara i.p. enjeksiyonla verildiğinde % 55 oranında mortalite gözlenmiştir. Navot vd. (2011) immersiyonda eriyik antijen daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise formaldehitte öldürülmüş tüm hücre antijenleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar eriyik antijenin banyo yöntemi aşılarında antijen alımını daha iyi sağladığı humoral immunité yanı sıra hücresel bağışıklığında etkin hale getirdiği söylenebilir. Yapılan bu çalışmada immersiyon aşıda koruyuculuk olmadığı görülmüş, balıklar küçük olduğu için serumda antikor varlığına bakılamamıştır. İmmersiyon gubunda ölüm oranının kontroldeki balıklardan fazla olması immersiyon aşılama balıkların küçük balıklara enjeksiyon uygulamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Bastardo vd.(2012) yılında yaptıkları çalışmada *A. hydrophila* ve *L. garvieae* karşı bivalent aşı ile aşılama gökkuşağı alabalığının aşı sonrası immün yanıtı ve koruması incelenmiştir. Bu çalışmada her iki patojene karşı koruma gözlenmiş, tüm aşılama balıklarda RPS %76'dan daha yüksek çıkmıştır. *A.hydrophila* ve *L.garviae* karşı koruma seviyesi özellikle sulu bivalent aşı (AqBV) ile aşılama balıklarda 90 günden sonra sırasıyla % 85.1 ve % 76.2 olarak elde edilmiş ve monovalan sulu aşıların sağladığı korumadan daha yüksek koruma sağladığı rapor edilmiştir. Gram-pozitif, Gram-negatif bakteriler karşı kullanan bivalent aşının başarılı olduğu bildirilmiştir. Mineral olmayan yağ, Montanide ISA 763 AVG (Seppic, Fransa) 30:70 oranında final konsantrasyon 1×10^9 hücre/ml olacak şekilde bivalent adjuvanlı AdBV formülasyon ile aşılama durumunda, aşılama sonrası 90 güne kadar *A.hydrophila* ve *L. garviae* karşı yüksek koruma seviyesinin RPS'nin sırasıyla %95 ve %90 olarak göstermiştir. Bu çalışmada koruma hem sulu hemde adjuvanlı iki değerlikli aşı ile aşılamadan sonra serum antikor üretiminin yüksek olması ile göstermiştir. Bu sonuçlar, mineral yağ bazlı olmayan adjuvanlı maddelerin birlikte kullanılması ile enjekte edildiğinde diğer raporlar ile uyumlu olarak gökkuşağı alabalığında *A. hydrophila* ve *L. garviae* bakterilerine karşı başarılı

bir koruma ve koruma sağladığı süresini uzattığını göstermektedir (Anderson, 1997; Romalde vd., 2005; Ravelo vd., 2006). Bu mineral yağ bazlı olmayan adjuvantların mekanizmasının depo etkisi vardır, antijenin yavaş bir şekilde doku veya kana girmesini, karışmasını ve serbest bırakılmasını sağlar. Ayrıca humoral immun tepkiyi uzatır ve artırır. Yapılan bu çalışmada da Bastardo vd.(2012) Mineral olmayan yağ, Montanide ISA 763 AVG (Seppic, Fransa) 30:70 oranında kullanılarak bivalen aşilar hazırlanmış ve Bastardo vd.(2012)' ye benzer sonuçlar elde edilmiştir. Gram negatif ve Gram pozitif bu önemli balık patojenlerine karşı Montanide ISA 763 AVG adjuvantı ile başarılı bir koruma sağladığı tespit edilmiştir.

Gökkuşığı alabalıklarında injeksiyon, immersiyon ve oral olarak uygulanan *A.hydrophila* aşısı ile serumdaki antikor üretiminde artış gözlemlenmiştir (Loghothetis ve Austin, 1994). Areechon vd. (1992), bağışıklık tepkisinin derecesinin kullanılan aşı tipine bağlı olarak değiştiğini belirtmiştir. Balıkların *A. hydrophila* karşı aşılar da oluşan direnç çeşitliği izolatlar arasında yüksek heterojenlik olması *A. hydrophila* ya karşı için başarılı aşı gelişiminde büyük bir sorun oluşturmuştur.

Portekiz'deki gökkuşığı alabalıklarından izole edilen suşların izleyen yıllarda aynı serogrubuna ait olduklarını desteklemiş, bu çalışmada bivalent aşının koruyucu etkinliği gözlemiştir. Ancak, yakın coğrafik bölgede (Galiçya, KB İspanya) on üç adet kadar farklı sero tipin gökkuşığı alabalığında hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir. Aşı formülasyonlarını güncelleştirmesinde baskın sero-tiplerdeki olası kaymayı belirlemek için periyodik olarak seroepidemiolojik çalışmalara olan ihtiyaç artmıştır.

Swain vd. (2007), poli ve tek değerlikli aşilar ile aşılanmış "*Labeo rohita*" balığında aşılamadan 4 hafta sonra en yüksek antikor seviyesini tespit etmiştir. Bu durum, *A.hydrophila*'nın immünojenik doğasının yüksek olduğunun bir göstergesidir. Bastardo vd. (2012), gökkuşığı alabalığında aşılama yapılmasına rağmen *A. Hydrophila* ' ya karşı yüksek oranda antikor titresi tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar *Oreochromis niloticus* 'un *A.hydrophila* karşı doğal antikor seviyeleri ile benzer olduğu bildirilmiştir (Ahmed vd., 2010).

Vibrio anguillarum, *V. ordalii*, *V. salmonicida*, *A. salmonicida* ve *Yersinia ruckeri* (Hastein, Gudding ve Evensen, 2005) gibi önemli Gram negatif bakteriyel patojenlerin neden olduğu hastalıklara karşı alabalıkların immunizasyonu için etkili ticari aşilar mevcutken, *A. hydrophila* suşları arasında antijenik çeşitliliğin fazla olmasından dolayı etkili aşı

geliştirememiştir (Stevenson 1988). Bu nedenle polivalent *A. hydrophila* suşları ile hazırlanan aşılardan daha geniş bir koruma oluşturabileceği belirtilmektedir (Lapatra vd., 2010). Buna ek olarak, ticari olarak başarılı bir aşı geliştirilmesi içinde multivalent aşılardan denenmesi gerekmektedir. Buda geniş coğrafi alanda *A. hydrophila* izolatlarının çok sayıda antijenik analizleri yapılarak başarılı olabilir.

Yaptığımız çalışmada, *A. hydrophila* bakterisi farklı metotlarla immunize edilen balıklardan 30., 60. ve 90. Günlerde elde edilen serumlardan hazırlanan mikroadglutinasyon testine ait antikor titre i.p. enjeksiyon yolu ile aşılanan sırasıyla polivalent+FCA 1/32, 1/16, 1/64, polivalent 1/64, 1/32, 1/32, Monovalent 1/64, 1/8, 1/8, ve Monovalent+glukan uygulanan gruplarda 1/64, 1/16, 1/16 dilüsyonunda aglütinasyon görülmüştür. Lam aglütinasyon testinde de gruplarda aglütinasyon oluşmuştur. Yapılan bu çalışmada *A. hydrophila* aşısına karşı diğer araştırmacıların belirttiği gibi antikor tespit edilmiştir (Swain vd., 2007; Ahmed vd., 2010; Bastardo vd., 2012). Bu sonuç, *A. hydrophila*'nın immünojenik doğasının yüksek olduğunun bir göstergesi olduğunu desteklemektedir.

Bir polivalent aşının başarısı genellikle başlangıç antijene konsantrasyonu ile çapraz reaktivite ve farklı antijen arasındaki rekabetle düzenlenir (Nikoskelainen vd., 2007). Bastardo vd. (2012), *L. garvieae* ve *A. hydrophila* karşı antikor bağışıklık tepkisinin kinetikleri ve koruması sağlamıştır, bu Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri patojenleri arasında antijenik kompetisyon (antijenik yarış-rekabet) olmaksızın tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarda, Atlantik somon (*Salmo salar*) ve gökkuşağı alabalıklarının polivalent aşılardan aşılandıktan sonra bağışıklık sisteminin daha da güçlendiğini göstermiştir (Nikoskelainen vd., 2007; Hoel vd., 1997). Bastardo vd. (2012), bivalent aşının gökkuşağı alabalığında *A. hydrophila* ve *L. garvieae* karşı etkili olmuş ve aşılama sonrası en az 3 ay süreyle yüksek koruma seviyeleri kazandırmıştır. Koruma düzeyindeki sonradan oluşan 3 aydan sonraki süreçte kademeli bir düşüşü görülmesine karşın RPS düzeylerinin her iki patojene karşı özellikle de adjuvant kullanılan balıklarda koruma süresinin arttığı belirtilmiştir. Hazırlanan su bazlı ve mineral olmayan yağla hazırlanan adjuvantlı aşılardan, gökkuşağı alabalığında yetiştirme döneminde *L. garvieae* veya *A. hydrophila* koruduğunu tespit etmişlerdir. Bastardo vd. (2012) aşılarında *A. hydrophila*'nı tek bir suşunu kullanırken bu çalışmada *A. hydrophila*'nın 3 farklı suşu bir arada kullanılmıştır.

İnaktive tüm hücre (WC) aşuların etkileri bildirilmiştir. Örneğin; Lamers vd. (1985) yılında sazanlara uyguladıkları, ısıyla inaktif edilmiş daldırma *A.hydrophila* aşısının sonucunda serum antikor düzeylerinde bir artışa yol açtığını gözlemlemişlerdir (Lamers vd., 1985). Daha sonra Kusuda vd., (1987) yılında sazanlara uygulanan formalinle inaktif edilmiş *A.hydrophila* aşısı sonucunda total serum protein konsantrasyonlarında bir artış gözlemlemişlerdir (Kusuda vd., 1987).

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

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

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

Sazanlara (30-40 g) karşı yapılan bir çalışmada koruma sağlamak için virulent 6 *A.hydrophila* suşu ile S-layer protein üretilmiş ve koruma kabiliyeti değerlendirilmiştir. Bu amaçla balıklar adjuvant ilaveli aşı ile i.p. enjeksiyon yöntemi ile aşılanmıştır ve 35 gün sonra epruvasyona tabi tutulmuştur. Epruvasyon sonucunda RPS %56-87 arasında bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar kullandıkları 6 farklı virulent suş için adjuvanlı aşırı koruma sağlayabilir ve kullanılabilir olarak değerlendirmişlerdir (Poobalan vd., 2010).

Thanga vd., (2013), Japon balıklarında aşılanmamış balık gruplarında gün içinde %100 mortalite görülürken aşı gruplarında ise 25-50 gün sonra istatistik olarak hayatta kalma oranını artırmıştır. Adjuvanlı aşular (*Kuşkonmaz* takviyeli) *aeromonas* yükünü azaltmaya yardımcı olduğunu belirtmişlerdir. OMP ve BF aşı grupları hayatta kalma oranının ECP grubuna kıyaslandığında daha yüksek bir orana sahip olduğunu ve daha iyi bir koruma elde edildiğini bildirmişlerdir. *Kuşkonmaz* OMP ve BF aşuları ile birlikte bağışıklık güçlendirmeye yardımcı

olduğu, kuşkonmaz *A.hydrophila*'ya karşı düşük maliyetli, güvenli ve kuvvetli adjuvant olduğunu bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, polivalan immersiye, Polivalan enjeksiyon, polivalan+glukan enjeksiyon, polivalan+FCA enjeksiyon, *A.hydrophila* polivalan+*L.garvieae* +ISA 763 aşısı gruplarından oluşmuştur. Aşılanan balıklarda 30.günde *A.hydrophila* polivalan+*L.garvieae* +ISA 763 grubunda *L.garvieae* patojenine karşı %100, *A.hydrophila* patojenine karşı %95, poli i.p. rapel grubunda %92,5, polivalan+FCA enjeksiyonlu grupta %90 poli +glukanda %87,5 monovalan i.p. rapelde %85 olarak RPS değeri tespit edilmiştir. 90.günde ise *A.hydrophila* polivalan + *L.garvieae* + ISA 763 grubunda *L.garvieae* patojenine karşı % 97,5, *A.hydrophila* patojenine karşı %90, poli i.p. rapel grubunda %87,5 polivalan + FCA enjeksiyonlu grupta %90, poli + glukanda %80, monovalan i.p. rapelde %75 olarak RPS değeri tespit edilmiştir. İmmersiye yolla aşılanan balıklarda 30. günde balıkların küçük olması nedeni ile enjeksiyonla patojen verilmemiş, 90. günde yapılan epruvasyon sonucunda RPS değeri % 45 olarak tespit edilmiş sağlanan koruma ile istatistiki olarak kontrol grubu ile farklılık göstermemiştir. 3 farklı tür balıktan izole edilen ve mevcut suşlar arasında en fazla virülense sahip olan suşlarla hazırlanan karma aşının balıklarda monovalan aşısıya göre daha iyi bir koruma oluşturduğu gözlenmiştir. Polivalan aşılar 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 aşılarında etkili olduğu görülmektedir. Bir polivalan aşının başarısı genellikle başlangıç antijene konsantrasyonu ile çapraz reaktivite ve farklı antijen arasındaki rekabet ilgilidir. Bu çalışmada, *A.hydrophila* karşı farklı izolatlardan oluşan karma aşı koruma sağlamıştır, bu da bakteri patojenleri arasında antijenik kompetisyon olmaksızın destekleyici ve heterojen bir yapı gösteren *A. hydrophila* antijenite özelliğinden kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Demir,2015 yaptığı araştırmada formalinle öldürülmüş *A.hydrophila* aşısı ile immunize edilen Japon balıkları (*Carassius auratus*, L.1758)'nda aşının koruyucu etkisi araştırılmıştır. Aşılanan deneme grubu balıklarda 50.günde RPS değerleri polivalanla %100, monovalan+FCA'la %78,6, monovalan+glukanla %67.9 ve monovalanla %32 olarak tespit edilmiştir. Japon balıklarında en fazla virülense sahip olan suşlardan hazırlanan karma aşının balıklarda çok iyi bir koruma sağladığı belirtmiştir. *A.hydrophila* bakterisinden farklı yöntemlerle immunize edilen ve 50. günde balıkların serumlarından hazırlanan mikroadglutinasyon testine ait antikor titresi monovalan+FCA 1/32, polivalan 1/8, Monovalan ve Monovalan+glukan uygulanan gruplarda 1/4 dilüsyonunda aglutinasyon tespit etmişlerdir.

Yapılan bu çalışma gökkuşığı alabalığında yapmış olduğumuz çalışma ile paralellik arz etmiştir.

Adjuvant kullanılarak aşılanan balık gruplarında 30. ve 90. günde elde edilen koruma kontrol grubundan istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Yapılan aşı uygulamaları sonucu en iyi RPS değeri Polivalan + Rapel grubunda elde edilmiş bu grubu adjuvant aşı içeren polivalan + FCA izlemiştir. FCA, deneysel amaçla kullanılan en yaygın ve etkili bir adjuvanttır. Ancak balık ve diğer canlılarda enjeksiyon bölgesinde guroculoma oluşturmakta ve yangısal reaksiyonlar sonucu yan etkileri olduğu bildirilmektedir (Aydın, 1994c; Candan ve Karataş 2010; Tafalla vd., 2013). Bu çalışmada ise gökkuşığı alabalıklarında enjeksiyon bölgesinde herhangi bir yangısal reaksiyona rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra FCA kullanımı her zaman balıklarda immunojenitenin ya da korumanın artmasına sağlayamadığı rapor edilmiştir. Kawakami vd. (1998) sarıkuşuk balıklarında (*Seriola quinqueradiata*) Pasteurellosis hastalığına karşı *Photobacterium damsela* aşısı ile FCA' nın birlikte kullanımında korumada belirgin bir artış olmadığı belirtilmiştir. 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 kullanılmıştır ve aşı intraperitoneal olarak enjekte edildikten üç hafta sonra bir rapel (FCA olmadan) verilmiştir. Rapel uygulamasından iki hafta sonra balıklara *A.hydrophila* ile epruvasyon yapılmış ve sonra FCA'lı aşı ile rapel uygulanan FCA'sız aşının aynı korumayı sağladığı bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise yukarıdaki araştırmacılardan farklı olarak FCA'nın gökkuşığı alabalıklarında *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 olarak balıklara enjekte edilmiştir. En iyi koruma FCA adjuvanlanmış 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 FCA' yı birlikte enjekte etmiş ve bu enfeksiyona karşı koruyucu bir etkinin olduğu bildirilmiştir. 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 immunizasyon sonrası 10 hafta sonraya kadar yüksek kaldığı bildirilmiştir. Högfors vd. (2008), gökkuşığı alabalıklarında *Flavobacterium*

psychrophilum'dan elde edilen protein antijeni ile FCA birlikte i.p. enjeksiyon yolu ile verildiğinde antijen tek verildiğinde koruma oluşturmazken, FCA ile birlikte verilmesi durumunda koruyucu etkisinin olduğu kaydedilmiştir. 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* aşısının 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.

polivalan + glukan ilave edilen adjuvantlı grupta monovalan + rapel uygulamalarından daha iyi koruma tespit edilmiştir. Buna ek olarak, β -glukan birçok araştırmacı adjuvant olarak etkili olduğunu bildirmişlerdir (Midtlyng vd., 1996; Midtlyng vd., 1998; Chen ve Ainsworth, 1992; Rorstad vd., 1993; DeBaulney vd., 1996; 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, yalnız aşı verilen balıklarda ise % 52 oranında RPS elde etmişlerdir. Glukanlı grup daha yüksek RPS ye sahip olmasına karşın istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Figureas vd. (1998) yılında, *Vibrio damsela* karşı β -glukan 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), maya glukan (β -1,3-D-glukan) *A.salmonicida* ve *Vibrio salmonicida* formalinle öldürülmüş aşılar β -glukan ile veya glukansız i.p. enjeksiyonla salmon balıklarına verilmiştir. Aşılamadan sonra yapılan epruvasyon sonuçlarında frunküloz karşı β -glukan önemli ölçüde glukansız guba göre yüksek bir koruma göstermiş. Ancak β -glukan tek başına verildiğinde 11 hafta sonra koruma oluşturmamıştır. Bir başka çalışmada, tek başına frunkülozise 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 anlamlı bakterin verilen grupta yüksek iken immunostimulantlı gruplarda daha düşük bulunmuştur. Hint sazanlarına formalinle (*Catla catla*) 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* aşısı ile β -glukan i.p. enjeksiyon yolu ile verildiğinde yüksek bir antikor titresi görülürken, banyo ve oral uygulama yapılan gruplarda antikor gelişmemiştir (Selvaraj vd., 2005). Selvaraj vd. (2006) yılında, yaptıkları bir başka çalışmada, sazan balıklarında farklı konsantrasyondaki β -glukan ile LPS *A. hydrophila* aşısının i.p., oral ve banyo şeklinde 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. Mavi gurami, formalinle öldürülmüş *A. hydrophila* tek başına ve laminaran, bir β -1,3-D-glukan ile birlikte ip enjekte edilmiştir. 29 gün sonra 20 mg/kg laminaran enjeksiyon uygulanan balıklarda fagositik aktivitesinde artış olmasına rağmen formalin-öldürülmüş *A. hydrophila* ve 20 mg/kg laminaran eklenmesi önemli bir korumada oluşturmamıştır. Glukanın adjuvant etkisi bazı araştırmacılar tarafından etkili bulunurken bazıları tarafından etkili bulunmamıştır. Yaptığımız çalışmada da polivalanlı grup rapel uygulaması ile FCA'lı gruptan 30. günde daha iyi görünürken, 90. günde adjuvantlı aşıda RPS oranı değişmemiştir. Glukan ise çok etkili olmadığı görülmüştür. Kubilay et al. 2008, yaptıkları araştırmada, gökkuşağı alabalıkları *Lactococcus garvieae* suşu ile hazırlanan deneysel aşının gökkuşağı alabalıklarına i.p. enjeksiyon ile adjuvant ve immunositimulantlarla birlikte aşılama yapılmıştır. Aşılama sonrası 30. günde yapılan eprüvasyon sonucunda RPS oranının bakterinli grupta %87.5, bakterin + FIA (Freund Incomplete Adjuvant)' lı grupta ise %100 olarak tespit edilmiştir. Aşılı balıkların mikroaglutinasyon testinde bakterinli grupta ve bakterin+adjuvantlı grupta antikor titresi tespit edildiğini bildirmişlerdir. Yaptıkları araştırma ile FIA (Freund Incomplete Adjuvant) nın iyi bir koruma süresi sağlarken, aşı ile birlikte glukan uygulamasında glukanın etkili olmadığını görmüşlerdir. Bu çalışmada da glukanın su bazlı aşıda çok etkili olmadığı görülmüştür.

A. hydrophila aşılarının antijenik çeşitliliğin yüksek olmasından dolayı etkili aşıların geliştirilmesi oldukça güçtür ve hala bu patojene karşı ticari bir aşı henüz yoktur. Ancak son zamanlarda *A. hydrophila* karşı koruma oluşturan deneysel aşıların geliştiği ve otovaksin aşıların kullanıldığı görülmektedir.

Sonuç olarak; akuakültürde en sık rastlanan enfeksiyonlardan birisi hareketli aeromonas sepsisemi hastalığıdır. Bu hastalıktan korunmak için iyi bir hijyen ve aşı programları yapılmalıdır. Aşılama programlarında aşının başarısı iyi bir işletme yönetimi ile ilgilidir.

1. Yaptığımız araştırmada; farklı türden izole edilen *A. hydrophila* suşlarını içeren karma aşıların gökkuşağı alabalıklarında etkili bir koruma oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu patojene karşı yapılan aşılarda farklı orjinli suşların birlikte kullanılmasınan antijenik çeşitliliği artırmasından dolayı iyi bir koruma sağladığı düşünülmektedir.
2. Adjuvantlardan FCA'nın glukana göre *A. hydrophila* aşısında etkili olduğu g r lm ştir.
3. Aşı uygulamalarından enjeksiyonun beklenildiği gibi daha iyi koruma oluşturduğu görülmektedir. Bu çalışmada yapılan tüm hücre antijenlerin hazırlanan immersiyon yolu ile vücuda alımı iyi bir şekilde gerçekleşmemiştir. Bu nedenle yapılan çalışmaların incelenmesindende g r lm ştir ki küçük balıklarda eriyik antijenle immersiyon uygulamalarının denemesi faydalı olacaktır.
4. Aşının koruyuculuğu hem eprüvasyon hemde serumda antikor varlığının kontrolü ile yapılmıştır. Aşılı balıkarda antikor varlığı aglutinasyon testi ile belirlenmiştir.
5. Gökkuşağı alabalıklarında diğer araştırmacılarında belirttiği gibi multivalent aşıların *A. hydrophila* karşı etkili olabileceği ve *L.garvieae* ile birlikte adjuvantla uygulanmasının pratikte kullanımını kolaylaştıracadı d ş n lm ştir.

6. KAYNAKLAR

- Aakre, R., Wergeland, H. I., Aasjord, P. M., Endresen, C., 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing B-1, 3-M- glucan as aduvant. Fish and Shellfish Immunology, 4, 47-61.
- Aasjord, P.M., Slinde, E., 1994. Fish vaccine: development, production and use of bacterial vaccines, with special reference to salmon, in: A.M. Martin (Ed.), Fisheries Processing: Biotechnological Applications, Chapman & Hall, London, pp. 432–465.
- 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.
- Al-Harbi, A.H., Austin, B., 1993. Purification of macroglobulins from the Serum and skin and gut mucus of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunized with lipopolysaccharide (LPS) from a fish-pathogenic Cytophaga-Like Bacterium (CLB). Bullentin Europe Association of Fish Pathology, 13(2), 40-45.
- Altun S., Kubilay A., Ekici S., Didinen B. I., Diler Ö., 2010. Oral Vaccination against Lactococcosis in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using Sodium alginate and Poly(lactide-co-glycolide), Kafkas Univ Vet Fak Derg. 16 (Suppl-B): 211-217.
- Altun T., Tekelioğlu N., Nevşat E., Sağat Y. Some Growth Parameters on European Eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) Fed with Different Feeds, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi 2005 E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences 2005 Cilt/Volume 22, Sayı/Issue (1-2): 215–219
- Amend, D.P., Johnson,K.A., Croy,T.R., Mccarthy, D.H., 1983. Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins . Journal of Fish Diseases, 6, 293-299.
- Anderson,D.P.,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.

- 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., Sarıyüpoğlu, M., 2002. Balık Hastalıkları. Medisan Yayınevi, ISBN 75-7774-53-7, Ankara.
- Areechon, N., Kitancharoen, 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.
- Aydın, S. and Ciltaş, A.K., 2004. Systemic *Aeromonas hydrophila* Infections in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) : Gross Pathology, Bacteriology, Clinical Pathology, Histopathology and Chemotherapy. Journal of Animal and Veterinary Advances, 3, 810-819.
- 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.
- Bach, R., P. K. Chen, And G. B. Chapman, 1978, Changes in the Spleen of Channel Catfish *Ictalurus punctatus* Rafinesque induced by Infection with *Aeromonas hydrophila*. Journal of Fish Diseases, 1, 205 - 217.
- 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.

- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H., 1995, Some Biochemical Properties and antibiotic Sensitivities of *Pasteurella piscicida* Isolated in Greece and Comparison with Strains from Japan, France and Italy, *Journal of Fish Diseases*, 18: 1–7.
- 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.
- Bilgehan, H., 1993, Temel Mikrobiyoloji ve Başışıklık 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.
- Brenck, 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.
- Birici N., şeker T., Balcı M., şelik B., Kılıç A., 2014, Elazığ İlinde Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* L.) Yetişiriciliği Yapan İşletmelerin Yapısal ve Ekonomik Analizi, *Yunus Araştırma Bülteni* (2): 23-48.
- 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.

- 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.
- 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.
- Cascon, A., Yugueros J., Temprano A., Sanchez M., Hernanz C., Luengo J.M., Naharro. G., 2000, A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*, Infect. Immun. 68: 3233-324.
- Ceschia, G., Giorgetti, G., Mazzolini, E., Danielis, L., 1998. Vaccination against streptococcosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Journal of Applied Ichthyology, 14 (3-4): 185–187.
- Chandran M.R., Aruna B.V., Logambal S.M. And Michael R.D., 2002a, 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.

- 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.
- Demir, A., 2015, Japon Balıkları (*Carassius Auratus*, L.1758)'Nda *Aeromonas Hydrophila* Enfeksiyonuna Karşı Aşılama Stratejilerinin Geliştirilmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, ISPARTA, 79 s.
- Doukas, V, Athanassopoulou, F., Karagouni, E. And Dotsika, E.,1998, Short Communication *Aeromonas hydrophila* Infection in Cultured Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea, Journal of Fish Diseases, 21 (4) ,317-320.
- Durmaz. Y., Türk. N.,2009, Alabalık İşletmelerinde Motil *Aeromonas*ların İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Saptanması, Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 15(3):357-361.
- 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.
- Eldar, A., Horovitz, A., Bercovier, H., 1997, Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology, 56(1-2): 175-183.
- Ellis, A.E., 1978, The Immunology of Teleosts. In: Fish Pathology. (ROBERTS, R.J.ed.) Bailliere Tindall Adivision of Cassell Ltd., 93-104.

- Ellis, A.E., 1988, General Principles of Fish Vaccination. In: Fish Vaccination, (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press Ltd., London, pp.1-19.
- 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. EAAP 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., Ubeira F. M., 1993, Isolation and partial characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) immunoglobulins, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, Volume 105, Issue 2, J Pages 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.
- 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.
- Go'mez-Chiarri M, Brown LL, Levine RP., 1996, Protection against *Renibacterium salmoninarum* infection by DNA-based immunization. International Congress on the Biology of Fishes. In: Proceedings of the Aquaculture Biotechnology Symposium. San Francisco University., p. 155-157.

- Gong Y.X., Zhu B., Liu G.L., Liu L., Ling F., Wang G.X., Xu X.G., 2014, Single-walled, carbon nanotubes as delivery vehicles enhance the immunoprotective effects of a recombinant vaccine against *Aeromonas hydrophila*, Fish Shellfish Immunol. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.004>).
- 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.
- Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Q., 1999, Recent development in fish vaccinology. Veterinary Immunology and Immunopathology, 72: 203-212.
- Gülmezoğlu, E., 1975, Bağışıklığın Temelleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 176s, Ankara.
- Güvener, R.P., Timur, G., 2005, Bazı Akvaryum Balıklarında *Aeromonad* 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.
- Hastein, T., Gudding, R., Evensen, Q. 2005, Bacterial Vaccines for Fish-An update of the current situation worldwide. Development in Biological Satandardization, 121: 55-74.
- Heppel J., ve Davis L. H., 2000, Application of DNA vaccine technology to aquaculture, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 90, pages 1-118
- Hernanz Moral C., Flano Del Castillo E., Lopez Fierro P., Villena Cortes A., Anguita Castillo J., Cascon Soriano A., Sanchez Salazar M., Razquin Peralta B. & Naharro Carrasco

- G. 1998, Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophila* *aroA* gene and potential use of an auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *Infection and Immunity* 66, 1813–1821.
- 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* L.). *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.
- Holt, R.A., 1987, *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish. PhD dissertation, Oregon State University, Corvallis, OR.
- 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
- 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.
- Joosten, P.H.M., Trigueros, M.A., Sorgeloos, P., Rombout, J.H.W.M., 1995, Oral Vaccination of Juvenil Carp (*Cyprinus carpio*) and Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) with Bioencapsulated *Vibrio anguillarum* Bacterin. *Fish and Shellfish Immunology*, 5: 289 – 299.

- Joosten, P.H.M., Tiemersma, E., Threels, A., Caumartin-Dhieux, C., Rombout, J. H.W.M., 1997, Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish & Shellfish Immunology*, 7: 471–485.
- 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., 2007, 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.
- Klein, B.U., Siesenop, U., Böhm, K.H., 1996, Investigations on Transferable Antibiotic Resistance Through R-plasmids Between Obligate and Facultative Fish Pathogenic bacteria. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*,16(4):138–141.
- 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.
- Kubilay, A., 1997, Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) patojen bakteri *Yersinia ruckeri*'ye Karşı Antikor Üretimi ve Tespiti Üzerinde Bir Araştırma, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği ABD Doktora Tezi.117s. Isparta.

- Kubilay, A., Timur, G., 2001, *Yersinia ruckeri* Bakterini ile İmmunize Edilen Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Antikor Üretiminin IFAT ve ELLISA Teknikleri ile Saptanması." Turk J. Vet. Anim. Sci. 25, 437-445.
- Kubilay A., Altun, S., Ulukoy, G., Ekici, S., Diler, O., 2008, Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Lactococcus garvieae* using vaccine mixtures. Israeli Journal of Aquaculture, December Bamidgah 60(4): 265-270.
- Kumari, J., Sahoo, P.K., 2006, 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., 2006, 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 immunesystem 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., Fryer, J.L., 1993, Viral vaccines for aquaculture, Annual Rev. Fish Dis. 3: 225–240.
- 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.
- Lillehaug, A., 1989, Oral immunisation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis with vaccines protected against digestive degradation. Journal of Fish Diseases. 12(6): 579-584.
- 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., Lapetra, S.E., 2005, DNA vaccines for aquacultured fish. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 24 (1): 201-213.
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Nunez, S., Toranzo, A.E., 1999, Protection of Gilthead Seabream Against Pasteurellosis at The Larval Stages. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 19 (4):159 –161.
- 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.
- Mefut.A, Emre.Y, Diler.Ö, Altun.S., İnce.İ, 2007, Akdeniz Bölgesi'ndeki Bazı Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* W.1792) İşletmelerinde Bakteriyel Balık

Patojenlerinin Tespit ve Kontrolü, Akdeniz Su Ürünleri Araştırma, Üretim ve Eğitim Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi.

Meyer, F.P., 1991, Aquaculture disease and health management, J. Anim. Sci. 69:4201–4208.

Mialhe, E., Bachere, E., Boulo, V., Cadoret, J.P., Rousseau, C., CedeZo, V., Saraiva, E., Carrera, L., Calderon, J., Colwell, R.R., 1995, Future of biotechnology-based control of disease in marine invertebrates, Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 4: 275–283.

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* L.) against furunculosis. Fish & Shellfish Immunology, 6, pp. 335-350.

Midtlyng, P.J., 1997, Novel vaccines & new vaccination strategies for fish Bull. Eur. Fish Pathol. 17: 239–244.

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.

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.

Minbay, A., 1988, İmmunoloji Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayını, 131s. Bursa.

Miquel A, Muller I, Ferrer P, Valenzuela PDT, Burzio LO., 2003, Immunoresponse of Coho salmon immunized with a gene expression library from *Piscirickettsia salmonis*. Biological Research., 36:313-323.

Morrison, R.N., Nowak, B.F., Carson, J., 2001, The histopathological effects of a levamisole-adjuvanted *Vibrio anguillarum* vaccine on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Aquaculture, 195: 23–33.

- Munn, C.B., 1994, The use of recombinant DNA technology in the development of fish vaccines, *Fish Shellfish Immunol.* 4: 459–473.
- Müftüoğlu, E., Bolaman, Z., Bilgin, O., Ertop, Ş., 1993, *İmmunoloji*. Saray Medikal Yayıncılık, 408s. Bornova-İZMİR.
- Nagae, M., Fuda, H., Hara, A., Kawamura, H., Yamauch, K., 1993, Changes in serum immunoglobulin M (IgM) Concentrations early development of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) Aquaculture determined by sensitive ELISA technique. *Comparative Biochemistry and Physiology.*, 106 A, 69- 74.
- Nagae, M., Fuda, H., Una, K., Kawamura, H., Adachi, S. Hara, A., Yamauchi, K., 1994a, The effect of cortisol administration on blood plasma immunoglobulin M(IgM) concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 13, 41-48.
- Nagae, M., Fuda, H., Hara, A., Saneyoshi, M., Yamauchi, K., 1994b, Changes in serum concentrations of immunoglobulin M(IgM), cortisol and thyroxine (T4) during smoltification in the masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Fisheries of Science*, 60(2), 241-242.
- 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., 2004b, Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus*-a carnivore model. *Fish & Shellfish Immunology* 16, 613-619.
- Neary E.T., Develi N., Yüksel, S.A., 2008, Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılan Aşılar. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(2): 29-35.
- Nikoskelainen, S., Verho, S., Jarvinen, S., Madetoja, J., Wiklund, T., Lilius, E., 2007, Multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of

- specific responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish Shellfish Immunol*, 22, pp. 206–217.
- Noga, E. J., 2000, *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, Iowa State University Press, Ames, 141-142.
- Obach A., Baudin Laurencin F., 1991, Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of coldwater disease. *Diseases of aquatic organisms*. 12: 13-15.
- 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., 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.
- Press, C.M., Lillehaug, A., 1995, Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects, *Br. Vet. J.*, 151: 45–69.
- 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.
- Raida M.K., Buchmann K., 2008, Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine* 26: 1050-1062.
- 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.
- Romalde, J.L., Luzardoalvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A.E., Blanco-Mendez, J., 2004, Oral Immunization using Alginate Microparticles As a Useful Strategy for Booster Vaccination Against Fish Lactococcosis. *Aquaculture*, 236: 119-129.
- 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.
- Saglam, Y. S., Işık, N., Arslan A., Erer, H., 2006, Erzurum Bölgesi'ndeki Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* W.1792) *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia*

ruckeri izolasyonu ve Patolojik İncelemeler, Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 1 (1-2) 6-10.

Sahrikoglu, L. ve Candan, A., 2002, Levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) Balıklarında *Aeromonas hydrophila* Enfeksiyonu Üzerinde Bir Araştırma, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 14, 59-70.

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.

Santos Y., Bandin I., Nunez S, Nieto TP. Toranzo AE., 1991, Serotyping of motile *Aeromonas* species in relation to virulence phenotype. Bull Eur Ass Fish Pathol.;11:153-5.

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.

Schnick, R.A., Alderman, D.J., Armstrong, R., Le Gouvello, R., Ishihara, S, Lacierda, E.C., Percival, S., Roth, M., 1997, World wide aquaculture drug and vaccine registration progress, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 17: 251–260.

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.
- Snieszko, 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.
- Sommerset I., Krossoy B., Biering E., Frost P., 2005, Vaccines for fish in aquaculture. Expert Rev. Vaccines, 4(1): 89-101.
- Sorensen, U.B., Larsen J.L., 1986, Serotyping of *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology, pages: 593-597.
- Stevenson R. M., 1988, Vaccination against *Aeromonas hydrophila*, Fish vaccination, 112-123.
- 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.
- 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.
- Temprano A., Riaño J., Yugueros J., González P., De Castro L., Villena A., Luengo J.M., Naharro G., 2005, Potential use of a *Yersinia ruckeri* O1 auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. Journal of Fish Diseases 28: 419-427.
- Thompson K.D., Adams A., 2004, Current Trends in Immunotherapy and Vaccine Development for Bacterial Diseases of Fish. In: Molecular Aspects of Fish and Marine Biology (Vol-3): Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases (Ed. by Leung K.Y.), World Scientific Publishing Co., 313-362.
- Thuvander A., Hongolo I., Jansson E., Sundquist B., 1987, Duration of protective immunity and antibody titres measured by ELÝSA after vaccination of rainbow trout, *Salmo gairneri richardson*, against vibriosis. Journal of Fish Diseases, 10, 479-486.
- Thyssen A., Ollevier F., 2001, In vitro Antimicrobial Succetibility of Photobacterium damsela subsp. piscicida to 15 Different Antimicrobial Agents. Aquaculture 200: 259 – 269.
- 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.
- Toranzo A.E., Romalde J.L., Magarinos B, Barja J.L., 2009, Present and future of aquaculture vaccines aganist fish bacterial diseases. Options Mediterraneennes;86:155-76.

- Trust T.J., 1986, Pathogenesis of infectious diseases of fish. Annual of Review Microbiology, 40, 479-502.
- TÜİK, 2012, Su Ürünleri İstatistikleri. [http: // www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr) (Erişim tarihi:08.2015).
- 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.
- 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.
- William E., Tippets, Moyle P. B., 1978, Epibenthic Feeding by Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) in the McCloud River, California Journal of Animal Ecology Vol. 47, No. 2 (Jun., 1978), pp. 549-559
- Vendrell D., Balca'zar J.L., Ruiz-Zarzuela I., Blas I., Girone's O., Mu'zquiz J. L., 2007, Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Preventive V.
- 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.
- Yasumoto S., Yoshimura T. & Miyazaki T. 2006, Oral immunization of common carp with a liposome vaccine containing *Aeromonas hydrophila* antigen. *Fish Pathology* 41, 45–49.
- Yeşilayer N., GÖREN M. H., 2013, Tokat'ta Alabalık Yetiştiriciliği Yapan Karasal İşletmelerin Yapısal ve Biyo-Teknik Analizi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 30 (1), 41-51.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sercan ÇİFTÇİ

Doğum Yeri ve Yılı : Merkez/ ESKİŞEHİR , 1988

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : sercan_ciftci@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Eskişehir Cumhuriyet Lisesi 2002-2005

Lisans : SDÜ, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, 2007-2011

Yayınları

SCI, SSCI ve AHCI dışındaki indeks ve özlere tarafından taranan dergilerde yayımlanan makale

- Kubilay A. , **Ciftci S.**, Yıldırım P., Didinen B.I., Metin S., Demirkan T., Ozen M.R. and Oidtmann B., 2014, First Observation of Red Mark Syndrome (RMS) in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 34(3) 2014, 95.

Uluslararası Sempozyum Kongre Poster/Sözlü bildirisi

- Kubilay A., Çiftçi S., Yıldırım P., Didinen B.I., Ekici S., Demirkan T., Oidtmann B., 2014, First Observation of Red Mark Syndrome (RMS) in Cultured Rainbow Trout

Oncorhynchus mykiss(Walbaum, 1792) in Turkey 1 st International Symposium on Aquatic Sciences and Technology.15-17 May 2014 Cyprus.

- Kubilay A., Çiftçi S., Yıldırım P., Gümüş E., Assessment of Vaccine Strain Compared to The Virulence of Different Isolates of *Aeromonas hydrophila* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), INTERNATIONAL CONFERENCE ON DISEASES OF FISH AN SHELLFISH *Las Palmasde Gran Canaria, Spain 7 to 11 September 2015.*