

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YERSİNİOSİS HASTALIĞINDAN KORUNMANIN YENİ YOLU: CANLI AŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bal. Tek. Müh. Ümit Çağlar KAHRAMAN

**ARALIK 2013
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YERSİNİOSİS HASTALIĞINDAN KORUNMANIN YENİ YOLU: CANLI AŞI

Bal. Tek. Müh. Ümit Çağlar KAHRAMAN

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ YÜKSEK MÜHENDİSİ"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 14.11.2013
Tezin Savunma Tarihi : 12.12.2013**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İlhan ALTINOK

Trabzon 2013

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında
Ümit Çağlar KAHRAMAN tarafından hazırlanan

YERSİNİOSİS HASTALIĞINDAN KORUNMANIN YENİ YOLU: CANLI AŞI

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 26/11/2013 gün ve 1531 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda

YÜKSEK LİSANS TEZİ

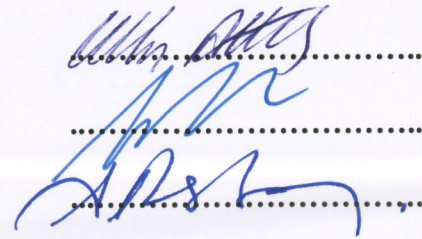
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. İlhan ALTINOK

Üye : Doç. Dr. Erol ÇAPKIN

Üye : Doç. Dr. Şevki KAYIŞ



Prof.Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Ana Bilim Dalı'nda yürütülmüştür. "Yersiniosis hastalığından korunmanın yeni yolu: canlı aşı" adlı bu çalışma KTÜ, Deniz Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş ve **TUBİTAK 110O886** nolu projeden elde edilen aşı kullanılmış ve aynı proje tarafından desteklenmiştir.

Dünyada ilk defa 1950'li yıllarda Amerika'nın Idaho eyaletinde ülkemizde ise ilk defa 1991 yılında Denizli yöresinde ortaya çıkan *Y. ruckeri*, ülkemizde ve dünyada geniş bir yayılım göstermektedir. *Y. ruckeri*, yersiniosis hastalığına neden olmaktadır. Koruma ve tedavi amaçlı kullanılan antibiyotikler gibi kemoterapötiklerin uzun süreli kullanımlarında bakterilerin bu ilaçlara karşı direnç kazanması, kısa bir süre için etkili olması ve maliyetinin yüksek olması gibi sebepler bu ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır. Bunun için yersiniosis hastalığına karşı daha etkin ve maliyeti düşük bir koruma yöntemi olan aşı kullanımını tercih edilmelidir. Bu araştırmayla aroA ve aroC mutant *Yersinia ruckeri* aşısının enjeksiyon, immersiyon ve yemle aşılama yöntemleri ile etkinliği belirlenmiştir.

Tez danışmanlığımı üstlenerek bilgi ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhan ALTINOK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Tez çalışmamın laboratuvar koşullarında benden yardımlarını esirgemeyen sayın hocalarım Doç. Dr. Erol ÇAPKIN'a, Yrd. Doç. Dr. Halis Boran'a, Arş. Gör. Rafet Çağrı ÖZTÜRK'e, Arş. Gör. Gökhan KALAYCI'ya ve Balıkçılık Teknolojisi Yüksek Mühendisi Halim İbrahim ERBAŞ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bütün hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

Ümit Çağlar KAHRAMAN
Trabzon 2013

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yersiniosis hastalığından korunmanın yeni yolu: canlı aşı” başlıklı buçalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof.Dr. İlhan ALTINOK’un sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim 14.11.2013.

Ümit Çağlar KAHRAMAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	X
SEMBOLLER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Bakteriyel Balık Hastalıkları	2
1.3. Balıklarda Bağışıklık	3
1.3.1. Doğal Bağışıklık (Spesifik Olmayan savunma).....	3
1.3.2. Kazanılmış Bağışıklık (Spesifik Savunma)	4
1.3.2.1. Humoral Bağışıklık	4
1.3.2.2. Sellüler Bağışıklık	5
1.3.3. İmmunoglobulinler (Antikorlar)	5
1.4. Aşı	6
1.4.1. Aşı Tipleri	6
1.4.1.1. İnaktif (Ölü) Aşılar	6
1.4.1.2. Canlı (Atenüe) Aşılar	7
1.4.1.3. DNA Teknolojisine Dayalı Aşılar.....	7
1.4.2. Aşılama Metotları.....	8
1.4.2.1. İmmersiyon ile Aşılama.....	8
1.4.2.2. Oral Aşılama	9
1.4.2.3. Enjeksiyon ile Aşılama.....	9
1.5. Yersiniosis (Enterik Kızıl Ağız) Hastalığı.....	9
1.5.1. Etiyoloji	10
1.5.2. Epizootiyoloji.....	11
1.5.3. Hastalığın Belirtileri	13

1.5.4.	Hastalığın Teşhisi.....	14
1.5.5.	Hastalığın Tedavisi.....	15
1.5.6.	Koruma ve Kontrol.....	16
1.6.	Önceki Çalışmalar	16
1.7.	Çalışmanın Amacı ve Gerekçesi	19
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	20
2.1.	Materyal.....	20
2.1.1.	Aşı	20
2.2.	Metot.....	20
2.2.1.	aroA ve aroC Mutant <i>Y. ruckeri</i> 'nin Virülanslığının Belirlenmesi.....	20
2.2.2.	aroA ve aroC Mutant Bakterilerin Persistansının Belirlenmesi.....	21
2.2.3.	aroA ve aroC Mutant Bakterilerin Fenotipik ve Genetik Olarak Belirlenmesi	21
2.2.4.	aroA ve aroC Mutant Bakterilerin İstikrarlılığı ya da Geriye Dönüşüm Olasılığının Belirlenmesi.....	22
2.2.5.	PZR ile Mutant Doğrulama aroA ve aroC Mutant Bakterilerin Genotipik Olarak Belirlenmesi.....	22
2.2.6.	Balıkların Aşılınması ve Aşı Uygulama Yönteminin Etkinliğinin <i>Y. ruckeri</i> Aşısı İçin Belirlenmesi.....	23
2.2.6.1.	Enjeksiyon Yöntemi ile Aşılama	23
2.2.6.2.	İmmersiyon Yöntemi ile Aşılama	23
2.2.6.3.	Yemleme Yöntemi ile Aşılama.....	24
2.2.7.	Kullanılan Aşının Koruma Süresinin Belirlenmesi.....	24
2.2.8.	İstatistik	25
3.	BULGULAR.....	26
3.1.	Deneme Çalışmaları Bulguları.....	26
4.	TARTIŞMA.....	30
5.	SONUÇLAR	36
6.	ÖNERİLER.....	38
7.	KAYNAKLAR	39
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

YERSİNİOSİS HASTALIĞINDAN KORUNMANIN YENİ YOLU: CANLI AŞI
Ümit Çağlar KAHRAMAN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Prof.Dr. İlhan ALTINOK
2013, 48Sayfa

Bu çalışmada, **TUBİTAK 1100886** nolu projeden elde edilen *aroA* ve *aroC* mutant *Yersinia ruckeri* aşısının aşılama yöntemleri ile etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aşı gökkuşacağı alabalıklarına enjeksiyon, immersiyon ve yemleme yöntemleri ile uygulanmıştır. Enjeksiyon yöntemi $1,1 \times 10^4$ CFU/0,1 ml mutant *Y. ruckeri* şeklinde intraperitoneal yolla uygulanmış. İmmersiyon yöntemi 3 ayrı yoğunluktaki ($1,1 \times 10^7$, 10^5 ve 10^3 CFU)/ml mutant *Y. ruckeri* ile 1 saat banyo yaptırılarak uygulanmıştır. Yemleme yöntemi $1,1 \times 10^7$, 10^5 ve 10^3 CFU mutant *Y. ruckeri*/gram pelet yem ile günde 2 defa 5 gün yemlenerek uygulanmıştır. İlk aşılama 21 gün sonra balıklara $1,1 \times 10^5$ CFU/balıkwild tip *Y. ruckeri* ip olarak verilmiştir. Enfeksiyondan 30 gün sonra göreceli korunma oranı değerleri enjeksiyon yöntemi için %100, immersiyon yöntemi için %98 ve yemleme yöntemi için %97,7 olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Yersinia ruckeri*, gökkuşacağı alabalığı, aşı, *aroA* ve *aroC*, RPS

Master Thesis

SUMMARY

NEW PROTECTION WAY AGAINST YERSINIOSIS DISEASE: LIVE VACCINE

Ümit Çağlar KAHRAMAN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Fisheries Technology Engineering Graduate Program
Supervisor: Prof.Dr. İlhan ALTINOK
2013, 48 pages

Effectiveness of *aroA* and *aroC* mutant *Yersinia ruckeri* vaccine developed by TÜBİTAK Project (Project no: 110O886) was determined with different vaccination methods. Fish were vaccinated by injection, immersion and oral with feed. Fish were vaccinated with *Yersinia ruckeri* mutant *Y. ruckeri* ($1,1 \times 10^4$ CFU/0,1 ml) by intraperitoneal injection. The immersion vaccination was applied 3 different concentrations (1.1×10^7 , 10^5 and 10^3 CFU/ml) of mutant *Y. ruckeri* with 1 hour bath. The oral vaccination was applied 1.1×10^7 , 10^5 and 10^3 CFU mutant *Y. ruckeri*/gram feed for 5 days two times a day. After 21 days of post-vaccination, all fish were challenged with 1.1×10^5 CFU/fish wild type *Y. ruckeri* by intraperitoneal injection. After 30 days of post-challenge relative percentage survival value was calculated for injection, immersion and oral methods 100%, 98% and 97.7% respectively.

Key Words: *Yersinia ruckeri*, rainbow trout, vaccine, *aroA* and *aroC*, RPS

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

- Şekil 1. aroA (A) ve aroC (C) geninin 5pF01 ve 3pR01 primerleri kullanılarak yapılan amplifikasyonun inverted görüntüsü. A ve C deki 3300 baz çiftlik fragmentler mutant olmayan bakterileri gösterirken MA ve MC deki 2100 baz çiftlik fragmentlerde mutasyonun olduğunu göstermektedir27
- Şekil 2. aroA (A) ve aroC (C) geninin sekans primerleri kullanılarak yapılan amplifikasyonun inverted görüntüsü. İlk sütunda 1 kilobazlık marker bulunmaktadır. 2, 3 ve 4, 5, 6 ve 10. sütunlarda 200 bazlık amplifikasyon (aroA ve aroC mutant) oluşurken, 7, 8 ve 9. sütunlarda mutasyon (1600 baz çifti) oluşmamıştır28
- Şekil 3. Alabalıklarda aşının sağladığı yaşama oranını (Kaplan-Meier). Balıklar immersiyon, enjeksiyon ve yeme karıştırılan Yersinia ruckeri aşısı ile aşılandıktan 3 hafta sonra wild tip Y. ruckeri ile enfekte edildi. Altıncı günden sonra balıklarda ölüm görülmedi.29

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Balıkların immünizasyonunda kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması (Kav ve Erganiş, 2007).	8
---	---

SEMBOLLER DİZİNİ

BHIA	: Brain Heart Infusion Agar
BHIB	:Brain Heart Infusion Broth
bp	: Baz çifti
CFU	: Koloni Oluşturan Birimler
ERM	: Enterik Kızıl Ağız Hastalığı
g	: Gram
kb	: Kilobaz çifti (1000 baz çifti)
LD ₅₀	: Canlıların Yüzde Ellisini Öldüren Doz
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rmp	: Dakikadaki Devir Sayısı
ROD:	: RibozOrnitin Deoksikolat Agar
RPS	: Göreceli Korunma Oranı
SW	: Shotts-Waltman Besiyeri
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliği, dünya besin gereksiniminin önemli bir kısmını karşılayan temel bir endüstri olmakla birlikte Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından dünyada en hızlı büyüyen gıda sektörü olarak bildirilmiştir. Su ürünleri yetiştiriciliği, dünya balıkçılık üretiminin yaklaşık %30'unu karşılamakta (Davenport vd., 2003) ve yılda %10'dan daha fazla artarak büyümektedir.

Su ürünleri yetiştiriciliği kapsamında; alabalık yetiştiriciliği dünyanın birçok ülkesinde geniş çevresel koşullar altında yapılmaktadır. Alabalıklar genel olarak Amerika kökenli [Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*), Kesikboğaz alabalık (*Oncorhynchus clarki*)] ve Avrupa kökenli [Atlantik salmonu (*Salmo salar*), Alp alası (*Salvelinus alpinus*), Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*)] olmak üzere iki grupta toplanırlar (Emre ve Kürüm, 1998). Alabalıklar 0-25°C'de yaşayabilen, minimum 5,5 mg/l doymuş oksijen gereksinimi olan, yumurta inkübasyonu için 8-12°C ve optimum gelişme sıcaklığı olarak 15-16°C'deki su ortamlarını tercih eden türlerdir (Roberts ve Shepherd, 1997; Kayış, 2009). TÜİK (2012), verilerine göre Türkiye'de 100239 tonu içsularda, 7697 tonu denizlerde olmak üzere toplamda 107936 ton alabalık yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde Doğu Karadeniz Bölgesi'nde üretimi yapılan alabalık türleri içerisinde en yaygın tür gökkuşluğu alabalığıdır. Bunun yanı sıra dere alabalığı, kaynak alabalığı ve deniz alabalığı yetiştiriciliği de yapılmaktadır (Seven, 2004; Kayış, 2009).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde su kalitesi, uygun çevre şartları, yem temini, pazarlama ve iş gücü sorunlarının yanında, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de tatlı su ve denizlerde yapılan kültür balıkçılığında ekonomik kayıplara neden olan en önemli sorun, çeşitli hastalıkların varlığıdır (Tokşen, 1999; Timur ve Timur, 2003).

Hastalıkların meydana gelmesini önlemek balık hastalıkları ile mücadelede en önemli husustur. Fakat bunun ötesinde hastalık durumunda hastalığın doğru teşhis edilmesi ve ekonomik yönden en uygun tedavi yöntemlerinin uygulanması kayıpları azaltıcı en

önemli etkidir. Doğru teşhis ve tedavi balık hastalıklarının yayılmasını önleyecek ve sektörün verimliliğine katkı sağlayacaktır (Ateşoğlu, 1996).

Balık sağlığını etkileyen faktörler patojenik olmayan ve patojenik etkenler olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır. Balıklarda çeşitli hastalıklara sebep olan beslenme ve su kalitesinde meydana gelen olumsuzluklar patojenik olmayan hastalıklar grubunda yer almaktadır (Plumb, 1999). Yapıcı etkenlerden kaynaklanan hastalıkları patojenik hastalıklar olarak adlandırılmış ve bu etkenler bakteriyel, fungal, paraziter ve viral olmak üzere dört ana grupta incelenmektedir (Roberts ve Shepherd, 1997).

1.2. Bakteriyel Balık Hastalıkları

Balıklarda patojenik olan bakterilerin, yoğun balık yetiştiriciliği yapılan işletmelerde büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bilinmektedir (Inglis vd., 1993; Austin ve Austin, 2007). Kültür şartlarında balıklarda hastalık meydana getiren bakteriler doğal ortamda bulunan balıklardan izole edilebilmektedir. Ancak doğal ortamda bulunan balıkların stres koşullarından uzak olmaları nedeniyle bu vakaların nadiren ölümle sonuçlandığı bilinmektedir (Toranzo vd., 2005).

Bakteriyel patojenlerin balıklarda meydana getirdiği iç ve dış klinik semptomlar balığın yaşı, türü ve hastalığın seyri ile (akut, kronik) değişmektedir. Bunun yanı sıra *Pasteurella* spp. gibi bazı bakteriyel patojenlerden kaynaklanan hastalıklarda hiçbir semptom görülmeden yüksek oranda ölümler gözlemlendiği bildirilmiştir (Toranzo vd., 2005).

Yersiniosis (*Yersinia ruckeri*), furunkulosis (*Aeromonas salmonicida*), edwardsiellosis (*Edwardsiella* spp.), vibriosis (*Vibrio* spp.), kolumnaris (*Flavobacterium columnare*) ve bakteriyel böbrek hastalığı (*Renibacterium salmoninarum*) gibi bakteriyel kökenli hastalıklar tüm dünyada su ürünleri yetiştiriciliği yapan işletmelerde ciddi ölümlere sebep olan başlıca hastalıklardandır (Lasee, 1995; Timur ve Timur, 2003).

Türkiye'de bakteriyel balık patojenleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio* spp., *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. ve son yıllarda ise streptokok enfeksiyonları yaygın patojenik hastalıklar olarak rapor edilmiştir (Timur ve Timur, 1985; Kayis vd.,2009).

1.3. Balıklarda Bağışıklık

Balıkların bağışıklık sistemi üzerine araştırma yapan birçok bilim adamı memeliler ile balıkların bağışıklık sisteminin birbirine benzediğini bildirmişlerdir. Timus, böbrek ve dalak balıkların en önemli bağışıklık sistemi organlarıdır.

Timus T hücrelerinin gelişmesinin başladığı, solungaçların dorsolateral bölgesinde bulunan, genellikle bir çift lobdan oluşmuş önemli bir lenfoid organdır. Timus'un en önemli görevi yabancı antijenlere karşı yanıt verebilecek lenfositlerin çoğalmasını sağlamak, vücudun kendi antijenlerine karşı reaksiyon verebilecek lenfositleri ortadan kaldırmak, antikor yanıtına yardımcı olmaktır. Bütün balıklarda vertebranın iki yanında yerleşmiş olan böbrek, ön ve arka böbrek olmak üzere iki lob halinde görülmektedir. Ön böbrek önemli bir hematopoetik organdır ve yüksek vertebratlardaki kemik iliği ile morfolojik olarak benzerlik göstermektedir. Ön böbrek, antikorların bol miktarda üretildiği yerdir. Dalak, kırmızı ve beyaz pulpa olarak ayrılmıştır. Kırmızı pulpa, organın önemli bir kısmını teşkil etmekte ve makrofaj ile lenfosit hücre popülasyonunu kapsamaktadır (Ellis, 1981; Sakai, 1999; Magnadottir, 2006).

Genel olarak balıklarda immun cevap diğer omurgalılarda olduğu gibi, spesifik olmayan (doğal) ve spesifik (kazanılmış) immun sistemler olarak iki temel guruba ayrılmaktadır (Iwama ve Nakanishi, 1996; Ellis, 1999).

1.3.1. Doğal Bağışıklık (Spesifik Olmayan Savunma)

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

Fiziksel olarak pullar ve deriler kimyasal olarak mukus, mikroorganizmanın vücuda girişine karşı bariyer olarak görev yapmaktadırlar (Anderson, 1974; Ellis, 1999; Ellis, 2001).

1.3.2. Kazanılmış Bağışıklık (Spesifik Savunma)

Kazanılmış bağışıklık sonradan kazanılan bir durumdur ve vücudun tepkime verme yeteneğine bağlı olarak zarar verici spesifik partiküler mikroorganizmalara karşı, serum antikorlarının (humoral bağışıklık) veya spesifik reaktif lenfosit (sellüler bağışıklık) oluşmasıdır (Ellis,1978; Busch, 1981; 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 spesifikantijene karşı serum protein moleküllerinin sentezi amacıyla uyarılması" olarak tanımlanmaktadır. Bu serum protein molekülleri (globulinler) antikorlar olarak isimlendirilir. Bu nedenle canlı patojenlerin avirülentsuşları, öldürülmüş patojenler veya bunlardan elde edilmiş antijenler, konakçının patojen tarafından hasta edilmesini önlemek için kazanılmış bağışıklık oluşturmak üzere kullanılmaktadır (Post, 1987).

1.3.2.1. Humoral Bağışıklık

Antijenin vücuda ilk kez girmesi halinde B veT lenfositleri birlikte reaksiyon verirler. B lenfositler plazma hücrelerine veya bellek hücrelerine dönüşürler (Ellis, 1978; Minbay, 1988). 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, 1988a). Bellek hücrelerinin hızlı ve yüksek seviyede reaksiyon kabiliyeti nedeniyle patojen ve aşuların uygulanmasını takiben dikkate değer artan bir direnç oluşturur (Ellis, 1988a).

1.3.2.2.Sellüer Bağışıklık

Timustan köken alan T lenfositleri sellüer bağışıklığın hücrelerini oluşturur. T lenfosit popülasyonu T yardımcı klonlarının yanı sıra selüer 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, 1988a).

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

1.3.3. İmmunoglobulinler (Antikorlar)

İmmunoglobulinler antijenik uyarımlar sonucu vücutta plazma hücreleri tarafından sentezlenen ve homolog antijenle birleşerek spesifik bir reaksiyon verebilen glikoprotein karakterindeki moleküllerdir. Protein olmaları nedeniyle immunoglobulinler çok iyi antijenik özelliklere sahiptirler. Kendilerine karşı antikor sentezini uyarırlar ve bunlarla da reaksiyon verirler. Antikorlar çeşitli maddelerle (izotop, enzim) konjuge edilerek serolojik reaksiyonlarda (FAT, RIA, ELISA) başarı ile kullanılmaktadır (Austin ve Austin, 1999; Schill vd.,1989; Janeway ve Travers, 1996).

Teleost balıklarda ise bir sınıf immunoglobulin kesin olarak tanımlanmıştır. Bu immunoglobulin memelilerde makroglobulin veya IgM olarak isimlendirilen sınıfa birçok hususta benzerlik gösterir (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 komplemant, lizozim, properdin, hemolizin, presipitin nötralizan antikorları ve hemaglutininler sayılabilir (Ellis, 1978).

1.4.Aşı

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

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

Hastalıkların koruma ve kontrolü ve aynı zamanda canlının büyümesini desteklemek amacıyla antibiyotik ve diğer kimyasal maddelerin kullanımında yoğun artış görülmektedir. Bu yoğun antibiyotik kullanımı, antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların gelişmesine, sucul çevreye ve insan sağlığına zararlı sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir (Barug vd., 2006).

Aşılama son 20 yıldır, su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli bakteriyel patojenlere karşı engelleyici bir yöntem olarak tespit edilmiş, bu da balık çiftliklerinin gelişmesine ve çarpıcı biçimde antibiyotik kullanımının azalmasına neden olmuştur (Sommerset vd., 2005; Adams ve Thompson, 2006).

Balık aşıları ticari olarak ilk kez Kuzey Amerika'da *Y. ruckeri* tarafından oluşturulan yersiniosis hastalığına karşı kullanılmıştır. Daha sonra salmon balığı deniz çiftliklerinde *V. anguillarum* ve daha az oranda da *V. ordalli* tarafından oluşturulan vibriosis'e karşı aşılama çalışmalarında başarı elde edildiği bildirilmiştir. Bu gibi çalışmalar ekonomik açıdan karlı olan diğer deniz ürünlerinde de aşılama yönelik ilginin artmasına ve mevcut başarılı seviyeye gelmesini sağlamıştır (Toranzo vd., 1997; Gudding vd., 1999).

1.4.1. Aşı Tipleri

1.4.1.1. İnaktif (Ölü) Aşılar

Bu aşılar, büyük oranda üretilmiş patojenlerin formalin gibi bazı kimyasalların uygulanması ile patojenin inaktive edilmiş halidir. Bu inaktif olmuş organizma bu işlemde sonra yapısı ve şekli değişmediğinden dolayı canlı patojenin sahip olduğu orijinal

antijenik özelliklerini korur. Sadece konak içinde hastalık etme, büyüme ve üreme özelliği yok edilir. İnaktif edilmiş aşıda kontrol edilmesi gereken en önemli konu bakterinin tamamen öldüğünden emin olunmasıdır (Neary vd., 2008). Bağışıklığı geliştirmede kullanılan aktif olmayan mikroorganizmaların vücutta çok hızlı şekilde yok edilmesi, bağışıklık yanıtını yeterince uzun süre uyaramamalarına neden olur. Bu nedenle aktif olmayan aşuların etkinliğini arttırmak amacıyla, vücutta daha uzun süre kalmalarını sağlayacak ve immünolojik belleği uyaracak şekilde verilmeleri gerekir. Bu amaçla kullanılan maddelere adjuvant denir. Genelde adjuvant, antijenin ortadan kaldırılmasını yavaşlatır ve bağışıklık tepkisini arttırır (Neary vd., 2008).

1.4.1.2.Canlı (Atenüe) Aşular

Bu aşular, patojenin canlı olarak verilmesinden dolayı, doğal enfeksiyon sonucu ortaya çıkacak bağışıklık cevabı oluştururlar. Mikroorganizmaların hastalık yapan özelliğinin teknik veya biyolojik yöntemlerle yok edilmesi ile canlı aşı zayıflatılır, fakat aşı görevi görecektir antijenik özelliği korunur (Ellis, 2001; Neary vd., 2008). Birçok araştırmacı tarafından deneysel olarak test edilmiş bazı canlı aşuların hastalıklara karşı koruyucu bağışıklık oluşturdukları bildirilmiştir (Daily vd., 2001; Lan vd., 2007). Bu koruma uygulanan inaktif aşular ile karşılaştırılabilir düzeydedir. Canlı, zayıflatılmış aşular su ürünleri yetiştiriciliğinde potansiyel olarak pek çok avantaja sahiptir. Canlı aşı ile aşılama gerçekte zayıflatılmış bir mikroorganizma ile yapılan bir enfeksiyondur ve antijenin aşılansın balık popülasyonu içinde devamlılığını sağlar. Bu sayede bağışıklık cevabı daha uzun ve güçlü olur (Marsden vd., 1998; Neary vd., 2008).

1.4.1.3.DNA Teknolojisine Dayalı Aşular

DNA kullanarak genetik bağışıklık kazandırma, aşı geliştirmede en yeni yaklaşımlardandır. Bu teknoloji, belli plasmid kodlu proteinler ve arıtılmış plasmid DNA'nın iskelet ve kas hücrelerine enjeksiyonu tekniğine dayanır. Balıklarda, glikoproteinler ya da nucleocapsid proteini şifreleyen genleri içeren plasmid DNA enjeksiyonu, salmonid rhabdovirüsleri, VHS (Viral Haemorrhagic Septicaemia) ve IHN

(Infectious Haematopoietic Necrosis) hastalıklarında, gökkuşuğu alabalığında koruyucu etki göstermiştir (Guddig vd., 1999; Lorenzen vd., 2002; Neary vd., 2008).

1.4.2. Aşılama Metotları

Balıklarda aşılama yöntemleri; immersiyon, oral ve enjeksiyon olarak 3 ana metot altında toplanmıştır (Ellis, 1988a; Guddingvd., 1999; Vinitnantharat, 2001).

Balıklar çeşitli faktörlerden dolayı değişik aşılama yöntemleriyle aşılanmaktadır. Bu faktörler arasında balık büyüklükleri, ortam şartları, balık türleri ve farklı hastalıklara karşı aşılama sayılabilir. Temel aşılama yöntemleri, immersiyon, enjeksiyon ve yeme katılarak verilen oral yolla yapılmaktadır. Tablo 1’de özetlendiği gibi bunların birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (Ellis, 1988a; Joosten, 1997; Midtlyng, 1997).

Tablo 1. Balıkların immünizasyonunda kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması(Kav ve Erganiş, 2007).

	İmmersiyon	Oral	Enjeksiyon
Uygulama	Kolay	Çok kolay	Orta
Stres	Az	Yok	Orta
İşçilik	Düşük	Yok	Çok
Etki	İyi	Orta	Çok iyi
Etki süresi	3-12 ay	2-4 ay	12-24 ay

1.4.2.1. İmmersiyon ile Aşılama

İki şekilde yapılır; banyo ya da daldırma. Banyo aşılama, balık daha düşük yoğunluktaki aşıda daha uzun bir süre, genellikle bir veya birkaç saat aşıya maruz bırakılır. Daldırarak, aşılama ise balık, yüksek yoğunlukta hazırlanmış aşı solüsyonunda (genellikle 1 aşı, 9 su) çok kısa bir süre, genellikle 30 saniye daldırılır. Daldırarak aşılama, balığın daha hızlı bir şekilde aşılanmasından dolayı daha fazla kullanılır. Daldırarak aşılama genellikle 1-5 gramlık yavru balıkları aşılama için kullanılır (Neary vd., 2008).

Ayrıca, hiperosmatik infiltrasyon yöntemi uygulamasıyla, balıklar antijene maruz kalmadan hemen önce yoğun sodyum klorit çözeltisine kısa bir süre daldırılarak, antijenin deri, lateral çizgi ve solungaçlardan geçişini kolaylaştırmak amaçlanmaktadır (Navot vd., 2004).

Sprey yöntemiyle ise daldırma için hazırlanmış antijen solüsyonu balıkların vücuduna spreyleyir, bu yöntemde antijene maruz kalma süresi yeterli olması durumunda daldırma yöntemi ile aynı şekilde bağışıklık cevabı verir (Neary vd., 2008).

1.4.2.2.Oral Aşılama

Bu yöntemde, özel yöntemlerle (antijen koruyucu taşıyıcılar) hazırlanan aşı antijenlerinin midenin zararlı etkilerinden korunarak bağırsağa ulaşması ve emilmesi sağlanır (Quentel ve Vigneulle, 1997; Kav ve Erganiş, 2007).Oral aşılama metotları aşılarla göre değişebilir. Yenebilir yağ veya jelatin gibi yapıştırıcı madde kullanılarak aşı tozu yem üzerine, eğer aşı sıvı formda ise besine sprej olarak uygulanır ya da yem fabrikada yapılırken yemin içine ilavesi şeklinde olur. Balıkların bioması hesap edilir ve aşı besin ile karıştırılarak talimatlara göre balıklar aşılanır (Neary vd., 2008).

1.4.2.3.Enjeksiyon ile Aşılama

Enjeksiyonla aşılama için balıkların stresini azaltmak ve işlemi kolaylaştırmak için anesteziye tabi tutularak yapılmaktadır. Aşılar balıklara genellikle multidozşırıngalar kullanılarak karın içi (intraperitoneal) olarak enjekte edilir (Ellis, 1997; Yazıcı, 2004).

1.5.Yersiniosis (Enterik Kızıl Ağız) Hastalığı

Yersiniosis *Enterobactericea* familyasının bir üyesi olan *Yersinia ruckeri* tarafından oluşturulan septisemi ile seyreden ve özellikle yavru döneminde önemli kayıplara neden olan alabalıkların bulaşıcı bakteriyel bir hastalığıdır (Carson ve Wilson, 2002).

Bu hastalık Pembe ağız, Hagerman Kızılağız, salmonların kanlı lekesi ve kırmızı boğaz hastalığı olarak da bilinir (Busch ve Ling, 1975; Desbordes, 1986; Horne ve Barnes, 1999).

1.5.1. Etiyoloji

Gram negatif enterik bir bakteri olan *Yersinia ruckeri*, genel olarak 0,5 x 1,5 - 2 µm boyutunda, hafif kıvrık, çomak şeklinde, 7 – 8 peritirikflagellaya sahip hareketli, tek tek yada kısa zincirler oluşturan kokobasil yada basil formlarında olabilir (Ross vd., 1966; Busch,1982). *Yersinia ruckeri*, 9°C'deki inkübasyonda flagellalar mevcut olmasına rağmen hareketsiz, 18-27°C'de aktif hareket gösterirken, 35°C'de inkübe edildiğinde ise flagella olmadığından tamamen hareketlerini kaybederler (O'Leary vd., 1979; Busch, 1982; Davies ve Frerichs, 1989).

Yersinia ruckeri Brain Heart Infusion Agar (BHIA), Tryptic Soy Agar (TSA) ve %5 kan ilave edilmiş TSA gibi genel ortamlar üzerinde böbrekten kolayca izole edilmektedir. Ayrıca etken, dalak, karaciğer ve bağırsaktan izole edilebilir (Busch, 1982; Austin ve Austin, 1987). TSA besiyerinde 20-25°C'de 48 saat inkübe edilen kültürlerin kolonileri 1-2mm çapında, yuvarlak, kenarları düz, hafif konveks, kabarık görünümde, beyazdan krem rengine kadar değişen renklerde, yarı şeffaf koloniler vermektedir. Ancak *Y. ruckeri* 48 saat ve daha uzun süre inkübe edildiğinde ise filamentöz hücre oluşturmaktadır (Busch, 1982). *Y. ruckeri* 9-37°C gibi geniş sıcaklık aralıklarında üreyebilmekte ise de optimum sıcaklığı 20-25°C'dir (Altun, 2001).

Yersinia ruckeri izolatları; gram negatif, hareketli, katalaz pozitif, oksidaz negatif, O/F glikoz ortamında fermantatif ve nitritleri nitratlara indirgemesi özellikleri ile enterik bakterilerin karakteristik özelliğine sahiptir. Metil kırmızısı, sitrat kullanımı, ornitindekarboksilaztestleri pozitif, H₂S üretimi, sitokrom oksidaz, indol üretimi, üreaz, glikozdan gaz üretimi testlerinin ise negatif reaksiyon verdiği, voges proskauer (VP), hareketlilik, lizindekarboksilaz, jelatin hidrolizi testlerinin suşlar arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir. *Yersinia ruckeri*, *Yersinia* cinsinin diğer türlerinden jelatin ve dekarboksilazı eritmesi ile farklılık göstermektedir. Karbonhidrat fermantasyon testlerinden; maltoz, dekstroz, trehaloz, mannitol, mannoz ve galaktozu fermentte ettiği, laktoz, sakaroz, arabinoz, salisin, adonitol, sorbitol ve ramnozu ise fermente edemediği bildirilmiştir (Sanders ve Fryer, 1988; Holt vd., 1994).

Shotts-Waltman (SW) besi yerlerinde *Yersinia ruckeri* kolonileri yeşil renkli olup bir hidroliz zonu ile çevrilmiş durumdadır. Enterik bakterilerden *Edwardsiella*'nın iki türü de bu vasatta yeşil koloniler oluştururlar fakat her iki türde de bir hidroliz zonu görülmez. Bu

ortamda *Aeromonas hydrophila* ve *Enterobacter* sarı renkli koloniler oluşturur ve bu kolonilerin etrafında hidroliz zonu bulunur veya bulunmayabilir (Kubilay, 1997).

Mikroorganizmanın 6 serotipi (I, II, III, IV, V, VI) belirlenmiştir. Enfekte balıklardan en sık izole edilen ve en yüksek virülense sahip Serotip I suşu (Hagerman suşu) Amerika başta olmak üzere dünyanın pek çok bölgesinde geniş bir coğrafik dağılım göstermektedir (Rucker, 1966; Stevenson ve Airdrie, 1984). Serotip II (Bigcreek) suşu; ilk olarak pasifik salmonlarında saptanmıştır. Bu suş Serotip I suşundan daha az virülense olup, gökkuşuğu alabalıkları dışında, diğer salmonid grubu balıklar ile ringa (*Coregonus artedi*) gibi farklı balık türlerinden de izole edilmiştir (Bullock vd.,1981). Bu suşun Amerika dışında Kanada ve bazı Avrupa ülkelerinden de izole edildiğine dair bilgiler bulunmaktadır (Davies ve Frerichs, 1989). Ayrıca Bigcreek suşunun sorbitolu fermente etme özelliği gösterdiği tespit edilmiştir (Busch, 1982). Serotip III (Avustralya suşu) ise Avustralya'da gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen ve avirulent olduğu düşünülen bu suşun, Norveç'te de izole edildiği bildirilmiştir (Busch, 1982; Willumsen, 1989).

Yersinia ruckeri'nin diğer suşlarından Serotip IV' ün L-arabinos, D-ksiloz, L-rhamnoz'dan asit ürettiği, Serotip V in ise sorbitolu fermente etmediği ve virülensinin diğer serotiplere göre daha düşük olduğu saptanmıştır (Austin vd., 2003).

1.5.2. Epizootiyoloji

Etken başta gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) olmak üzere (Rucker, 1966; Ross vd., 1966), alp alası (*Salvelinus alpinus*) atlantik salmonu (*Salmo salar*), kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*), kahverengi alabalık (*Salmo trutta*), kesikboğaz (*Salmo clarki*), koho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), sokeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) (Petrie vd.,1996; Austin ve Cross, 1998; Hietala vd., 1995) gibi salmon grubu balıklar ile kedi balığı (*Ictalurus punctatus*) (Danley vd., 1999), japon balığı (*Carassius auratus*) (Mcardle ve Martin, 1985), sazan balığı(*Cyprinus carpio*) (Berc vd., 1999), yılan balığı(*Anguilla anguilla*), mersin balığı(*Acipenser baeri*) (Vuillaume vd., 1987) ve deniz levreğinde de (*Dicentrarcus labrax*) (Valtonen vd., 1992) izole edilmiştir. Ayrıca *Yersinia ruckeri*'nin su samuru, martı, kerkenez, hindi (Rintamaki vd., 1986; Willumsen, 1989), fare gibi değişik hayvan türleri için de patojen olduğu (Ribelin veMigaki, 1975) ve insan safrasında da bulunduğu ifade edilmiştir (Balows vd.,1991).

Hastalıkta epidemilerin şiddeti, balığın yaşına ve su sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir. Su ısısının yükselmeye başladığı ilkbahar-yaz aylarında ve genç balıklarda hastalık perakut ve akut formlarda, su ısısının düşmeye başladığı sonbahar aylarında ise daha çok kronik formda seyretmekte ve ölümler daha az olmaktadır (Frerichs ve Collins, 1984; Good vd.,2001). Akut epizootilerdemortalite %60-70 oranında seyretmektedir. Hastalığın kronik formunda ölümlerin daha az meydana gelmesine karşın, aşırı stres koşullarının etkisi ile büyük kayıpların da görüldüğü bildirilmiştir (Waltman ve Shotts, 1984; Rodgers, 1991).

Yersiniosis, gökkuşağı alabalıklarında en çok 7,5 cm ve daha küçük boydaki balıkları etkilemektedir. Daha büyük balıklarda (12,5 cm boyutunda) hastalık yavaşlayarak kronik bir seyir göstermektedir. Yersiniosis, 15-18°C su sıcaklığında en yüksek seviyeye çıkarken, 10°C ve daha altındaki sıcaklıklarda ise balıklarda klinik belirtiler görülmez. Stres şartları altındaki balıklar ciddi salgınlara daha duyarlı hale gelirler (Austin ve Austin, 1987; Horne ve Barnes, 1999).

Hastalığın oluşumunda etkili su sıcaklığının 15-20°C (Rodgers,1992; Danley vd., 1999), pH'nın ise 6,5-7,5 arasında değiştiği saptanmıştır (Amend vd.,1983). Epidemilerin daha çok 15°C de meydana geldiği, 20°C'lerdeki sıcaklıklarda ise kayıpların daha fazla olduğu (Ewing vd.,1978; Busch, 1982), 8-12°C'lerde de hastalığın oluştuğu, fakat mortalitenin daha az olduğu görülmüştür (Roberts, 1983; Rodgers, 1992).

Genel olarak hastalığın inkübasyon süresi 13-15°C arasında 5-10 gün kadar olabileceği belirtilmiştir. Enfeksiyon popülasyonda ilk defa görülüyor ise, 15°C su sıcaklığındaki inkübasyon süresinin 5-7 gün olduğu bildirilmiştir. Eğer daha önceden popülasyonda Yersiniosis görülmüş ve kronik enfeksiyon mevcutsa, stres şartları altında 3-5 gün içinde hastalık yüksek bir mortalite ile sonuçlanabilir (Busch, 1982; Arda vd., 2005).

Yersiniosis, klinik olarak hastalık belirtisi göstermeyen balıklarda sudaki metabolik artıkların (amonyak gibi), su sıcaklığının artışına bağlı olarak oksijen seviyesindeki düşüş, balıkların aşırı stoklanması ve müdahale işlemlerinin neden olduğu strese bağlı olarak tekrar ortaya çıkabilmektedir (Austin ve Austin,1999). Balığın çok sayıda patojene maruz kalmasından sonra alınan mikroorganizma sayısına bağlı olarak genellikle salgın hastalık 5-19 gün sonra başlayıp 30-60 gün süreceğini bildirmişlerdir (Austin ve Austin, 1987).

Busch ve Ling (1975), popülasyondaasemptomatik hastalık taşıyan balıkların varlığında yersiniosis'in dönemsel olarak ortaya çıkabileceğini ileri sürmüştür. Hastalığı atlatan balıklarda, portörlüğün 100 günden fazla süreyle devam ettiğini ve stres şartları

altında *Y. ruckeri*'yi dışkılarıyla etrafa yaydıklarını saptamışlardır. *Y. ruckeri* normal olarak sedimentte 4 ay ve suda ise iki ay canlı kalabilmektedir (Austin ve Austin, 1987; Romalde vd.,1994).

1.5.3. Hastalığın Belirtileri

Yersiniosis hastalığında özellikle enfeksiyonun başlangıç durumunda balıklar diğer akut bakteriyemi yapan hastalıklardan furunkulosis (*Aeromonas salmonicida*), aeromonad septisemi (*Aeromonas hydrophila*) ve vibriosis (*Vibrio anguillarum*) gibi diğer hastalıklara benzer semptomlar gösterir (Busch, 1982).Enfeksiyonda klinik olarak; anoraksı, letarji, lokomotorataksi (Giorgetti vd.,1985, Furones vd.,1993) ile su yüzüne yakın kısımlarda düzensiz ve zayıf yüzmelerin (Roberts, 1983; Frerichs vd.,1985) görüldüğü saptanmıştır. Uzun süren anoraksı sonucu balıklarda zayıflama ve yer yer deride depigmentasyonun olduğu gözlenmiştir (Giorgetti vd.,1985; Noga vd.,1998). Gözde, iriste ve oküler kavitede kanamaların görüldüğü, daha çok tek taraflı, hastalığın ilerlemesiyle her iki gözde de ekzoftalmusun şekillendiği, kornea boyunca oluşan yırtılmaların ise göz rupturları ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Ewing vd.,1978; Busch, 1982).

Hastalığın akut, subakut ve kronik olmak üzere 3 formu bulunmaktadır. Akut formlar, çok az ya da hiç eksternal belirtiler göstermeksizin hızla gelişir. Seyrek olarak balıkların yüzgeç diplerinde, ağzında, operkül ve anüs etrafında eritemler görülür (Post, 1987). Akut formunda balıklar genellikle iştahsız ve halsizdir (HorneveBarnes, 1999). İnternal olarak, pankreas ve yağ dokusunun yüzeyinde, bağırsak, periton, gonadlar, yüzme kesesi ve diğer organlarda peteşial hemorajiler görülür. Normale göre böbrek ve dalak biraz daha büyümüş, şişmiş, yumuşamış ve karaciğer ise solgundur. Kas dokularında peteşiler olabilir. Sindirim sistemi eritemik ve kanlı mukusla doludur (Post, 1987; Austin ve Austin, 1999).

1.5.4. Hastalığın Teşhisi

Mikroorganizmaların morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik, serolojik ve moleküler özelliklerinin incelenmesiyle bakteriyolojik hastalıkların teşhisi yapılabilmektedir (Horne ve Barnes, 1999).

Y. ruckeri enfeksiyonunun teşhisi doku örneklerinden bakteri izolasyonu ve identifikasyonunu gerektirmekte, böbrek, dalak ve göz arkasını içeren bölgelerden alınan bakteriyel kültürlerle teşhis yapılabilmektedir (Carson ve Wilson, 2002).

Yersiniosis; gram negatif septisemilerle benzer semptomlar göstermesi nedeniyle, klinik ve otopsi bulgularına bakılarak kesin teşhis yapılmamaktadır. Kesin teşhis; hasta balık popülasyonundan tipik semptom gösteren balıkların organlarından genel besi yerlerine yapılan ekimlerle, 20-25°C'de 48 saat inkübasyonu takiben şüpheli suşların izolasyonu ve bakterinin fenotipik ve serolojik özelliklerinin tespitiyle yapılmaktadır. Etken hasta balıkların böbrek, karaciğer ve dalak gibi organlarından Brain Heart Infusion Agar (BHIA), Tryptic Soy Agar (TSA) gibi rutin bakteriyolojik ortamlarda aerobik şartlarda izole edilebilmektedir (Ross vd., 1966; Austin ve Austin, 1993).

Shotts-Waltman (SW) özel besi yerinde Tween 80'i hidrolize eden ve sukrozu fermente etmeyen bakterinin, yeşil renkte bir koloni oluşturduğu ve 3-4 mm büyüklüğünde etraflarında meydana getirdikleri zon ile aynı klinik ve makroskopik bulguları gösteren *Aeromonas hydrophila* ve *Edwardsiella tarda* gibi diğer hastalık etkenlerinden kolayca ayrıldığı bildirilmiştir (Waltman ve Shotts, 1984). Ribose Ornithine Desoxycholate Agar (ROD), *Yersinia ruckeri* suşlarının izolasyonlarında sukroz fermentasyonu ile Tween 80'in hidrolizinin önemli olmadığı ve besi yerinde suşların soluk sarı renkli koloniler oluşturduğu ortaya konulmuştur. Bu besi yerinin bağırsak ve su örneklerinden etkenin izolasyonunda önemli olduğu, fakat *Yersinia ruckeri*'nin bazı suşlarının izolasyonlarında yetersiz kaldığı belirlenmiştir (Rodgers, 1992).

Bakterinin identifikasyonu için geleneksel metotlar kullanılmakla birlikte, API 20E gibi laboratuvarminikitleri de başarılı bir şekilde sonuç vermektedir. Ancak, türlerin kesin tanısı gerekirse, ilave testlerin yapılması gerekmektedir. Çünkü *Hafnia alvei* gibi yakın akraba türler bu şekilde ayırt edilebilmektedir (Horne ve Barnes, 1999).

Ayrıca hastalığın tanısında klasik bakteriyolojik yöntemler dışında, FAT (floresan antikor tekniği), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), PCR (Polimeraz zincir

reaksiyonu), Immunperoksidaz ve mikroaglutinasyon gibi teknikler de kullanılmaktadır (Post, 1987; Altinok vd., 2001; Altun vd., 2010).

1.5.5. Hastalığın Tedavisi

Yersiniosis'in tedavisi kemoterapötik ilaçlarla yapılmaktadır. Ancak tedaviden istenilen sonucun alınabilmesi için antibiyogram testinin sonuçlarına göre ilaç kullanımına gidilmelidir. Hastalığın tedavisinde; sulfamerazin ve oksitetrasiklin, metilen mavisi ve oksitetrasiklin, bazı sülfanamidler, tiamulin, flumequin, nalidiksik asit, gentamisin, eritromisin, oksolinik asit gibi antimikrobiyal bileşikler kullanılmıştır. Sulfamerazin içeren ilaçlı yemler 200 mg/kg balık ağırlığına/3 gün süre ile bunu takiben 3 gün daha 50 mg/kg balık ağırlık hesabıyla oksitetrasiklin ilave edilmiş yemler verilmesiyle başarılı sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir (Ross vd., 1966; Rodgers, 1991; Austin ve Austin, 1993; Kubilay, 1997; Altun, 2001). Sülfanamidlerden; sülfadimetoksin ve ormetoprim karışımının 50 mg/kg balık ağırlığına/günlük doz/5 gün süreyle, sulfadiazin ve trimetoprim kombinasyonu ise 1 mg/kg balık ağırlığına/günlük doz /14 gün süre ile başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Yine sulfamerazin 66 mg/kg balık/günlük doz/5 gün veya sülfametazin 200 mg/kg balık/günlük doz/5 gün süre ile verilebilir. Ayrıca; oksolinik asit, 10 mg/kg balık ağırlığına/günlük doz/10 gün süre ile kullanıldığında hastalığa karşı etkili olduğu ifade edilmiştir (Austin ve Austin, 1993).

Sudaki etkeni yok etmek için bazı amonyum bileşiklerinden yararlanılabilir. Tedavide kullanılan ilaçların kesinlikle önerilen gün sayısı kadar kullanılması gereklidir aksi halde dirençli bakteriler gelişebilir (Cengizler, 2000).

Y. ruckeri birçok antibiyotiğe karşı duyarlı olmasına rağmen, çeşitli antimikrobiyal etkenlere karşı direnç kazandığı rapor edilmiştir (Toback, 2009). Post (1987), hem sülfamerazin hem de oksitetrasiklininterapötik düzeylerine karşı Amerika'daki bazı izolatların tümünün direnç kazandığını vurgulamıştır.

1.5.6. Koruma ve Kontrol

Balık yetiştiriciliği yapılan işletmelerde enfeksiyonların çıkmaması için bütün genel koruma önlemleri alınmalıdır. Olumsuz tüm koşullar düzeltilmeli ve minimal düzeyde tutulmalıdır. Yersiniosisden korunmada en etkili yol işletmelere hastalıkların girmesini engelleyecek tedbirlerin (uygun yetiştiricilik koşullarının sağlanması, enfekte olmuş balıkların karantinaya alınması, uygun yemleme ve yemlerin kullanılması, patojen etken ile duyarlı konakçı arasındaki ilişkinin kesilmesi) alınmasıdır. Ayrıca hastalıktan önce spesifik bağışıklık oluşmasına olanak veren aşılar uygulanmalıdır. Bunun için 3 g ağırlığın üzerindeki balıklar banyo tarzında 30 saniye süreyle aşılanabilirler. Bu şekilde yaklaşık 6-12 ay bir koruma sağlanabilir (Ellis, 1988b).

Mikroorganizmalar gözlenmiş yumurtaların yüzeyinde de bulunabileceğinden bunlar iyot içeren preparatlarla dezenfekte edilmelidir. Gerektiği hallerde balıkların yemlerine koruyucu amaçla antibiyotikler ve vitaminler katılabilir. Kızılağız hastalığının kontrolünde de en etkili ve hızlı yöntemin aşılama olduğu belirtilmiştir. Bu amaçla 1960'lardan beri çalışmalar yapılmış ve Tryptic Soy Broth (TSB)'da üretilen tüm bakteriyel kültürlerin formol ile inaktivasyonu sonucu oluşturulan ve oral, enjeksiyon ve immersiyon yoluyla uygulanabilen aşılar geliştirilmiştir. 1976'da Amerikan Tarım Bölümü ticari bir ERM aşısı için lisans vermiştir (Tebbit vd., 1981).

1.6. Önceki Çalışmalar

Yersiniosis hastalığının kontrolünde de en etkili ve hızlı yöntem balıkları aşılamaaktır. Bu amaçla 1960'lardan beri çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Yersiniosis hastalığına karşı ilk aşı denemeleri Ross ve Klontz (1965) tarafından yapılmıştır. Bu aşı fenolle öldürülmüş bakteriden hazırlanan ve yeme katılan (10 kg yeme 15 ml *Y. ruckeri*) oral bir preparasyondur. Gökkuşığı alabalıkları ilk 2 hafta boyunca haftada 5 gün, çalışmanın devamında da hafta da 1 kez bu yemle beslenmiştir. 70 gün sonra balıklarda %90 koruma gösterdiği ve bu korumanın 408 gün sürdüğü bildirilmiştir. Balıklarda kullanılan ilk aşılarından birisi olan yersiniosis aşısına dünyada ki ilk lisans 1976 yılında Amerika'da verilmiştir (Tebbit vd., 1981).

Johnson vd. (1982a), değişik büyüklükteki gökkuşığı alabalıklarını inaktif *Y. ruckeri* ile aşılamıştır. Aşıların koruma seviyelerinin 1,8 gramlık balıklarda 170 gün sonra, 3,2

gramlık balıklarda ise 210 gün sonra belirgin olarak düştüğü belirlenmiştir. Balıklarda ilk aşılama ağırlığı 4,3 g olduğunda ise aşının sağladığı korumanın en az 300 gün sürdüğü belirtilmiştir. Bu nedenle gökkuşağı alabalıklarının aşılama optimum minimum büyüklük 4 gram olarak belirlenmiştir. Ayrıca Johnson ve Amend (1983a), yaptıkları bir çalışmada 1:10 ve 1:20 oranında dilüe edilmiş inaktif *Y. ruckeri* solüsyonlarını 20 saniye süreyle banyo ve 2-5 saniye süreyle püskürtme yoluyla uygulamış ve oluşan bağışıklığı karşılaştırmıştır. Aşısız kontrol gruplarında mortalite %53 ile %66 arasında bulunurken aşılı gruplarda ise mortalite %15 olmuştur. Banyo ile püskürtme yönteminin etkinliği karşılaştırıldığında, deneysel enfeksiyon sonucu oluşan mortalite oranları arasında önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir.

Johnson ve Amend (1983b), yaptıkları bir diğer çalışmada enjeksiyon ve banyo yöntemlerini karşılaştırmış, 1:10 oranında dilüe edilen bakterinin intraperitoneal olarak verilmesinin, 1:10 ve 1:20 dilüsyonda 20 saniye banyo yoluyla yapılan aşılama göre daha iyi bir koruma oluşturduğunu bildirmiştir.

Dünyada üretilen yersiniosis aşıları *Y. ruckeri* Tip I'den hazırlanmış olup Tip I'e karşı gelişen immunitenin Tip II ve III enfeksiyonlarına karşı da koruduğu belirlenmiştir (Busch, 1982; Ellis, 1988b). Ticari aşılarda saha uygulamalarında başarılı olduğunu bildirmiştir (Tebbit vd., 1981). Fakat Ellis (1988b), ileride bilinmeyen serotiplerden dolayı meydana gelebilecek enfeksiyonlarda bu aşılarda koruma sağlayamayabileceğini belirtmiştir.

Erdal (1989) tarafından yapılan araştırmada, 20-30 g ağırlığındaki *Salmo salar*'ları 6 farklı *Y. ruckeri* serotipi ile aşılamıştır. Serotip I ve II'den hazırlanan kombine aşı LD₅₀ dozu ile balıklara IP yolla verildiğinde balıklarda Serotip I'e (Hagerman) karşı %79 koruma sağlarken, Norveç'ten izole edilen Serotip I'e karşı %71, Serotip II'ye karşı %93, Serotip III'e karşı %98 koruma sağlamıştır.

Balıklarda furunkulosis aşılarının gelişimiyle beraber daha iyi koruma sağlamak amacıyla adjuvantlı aşılarda geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Salmonidlerde alüminyumlu adjuvantların tek enjeksiyonu kısa etkili olsa da iyi bir koruma sağlamıştır. Furunkulosis'e karşı yağlı adjuvantların alüminyum ve glukandan daha uzun süren koruma sağladığı bildirilmiştir. Yağlı adjuvantlar günümüzde ticari aşılarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bu adjuvantların genellikle enjeksiyon bölgesinde hafiften şiddetliye kadar değişebilen lokal reaksiyonlara, granulomlara neden olduğu bildirilmiştir. Özellikle yağ bazlı adjuvantların en şiddetli reaksiyonlara neden olduğu ve büyüme oranı ve son ürünün kalitesini etkilediği bildirilmiştir (Gudding vd., 1999).

Zeytun (1999), iki farklı yersiniosis aşısının Göreceli Korunma Oranları (RPS) açısından etkinlikleri araştırılmış. 1 litre aşı/ 9 litre su oranında aşılar immersiyon yöntemi ile uygulanmıştır. Bağışıklık oluşumu için 34 gün beklendikten sonra 10^9 CFU/ml *Y. ruckeri* ile eprüvasyon yapılmıştır. Sonuç olarak her iki aşısında Göreceli Korunma Oranları (RPS) % 84 olarak eşit çıkmış.

Altun (2001), serotip I ve serotip II özellikte olan iki *Y. ruckeri* izolatından üç farklı deneysel aşı hazırlamıştır. Deneysel aşuların gökkuşağı alabalıklarına (immersiyon ve enjeksiyon yöntemleriyle) uygulanması sonucunda, serotip I'den hazırlanmış olan aşının istenilen düzeyde koruma sağlayamadığını (serotip farklılıklarının önemli olduğunu) tespit etmiştir. Serotip I ve II'nin kombinasyonundan hazırlanan aşının ise diğer aşılardan daha yüksek koruma sağladığını saptamıştır.

Demirtaş (2006), gökkuşağı alabalıklarında yersiniosis hastalığına karşı *Y. ruckeri* serotip I ve sahadan izole edilen *Y. ruckeri* suşlarından hazırlanan aşuların balıkların bağışıklık sistemini nasıl etkiledikleri karşılaştırmalı olarak incelemiştir. Araştırmada ülkemizden izole edilen *Y. ruckeri* ve Danimarka'dan izole edilen referans *Y. ruckeri* suşlarından hazırlanan aşularla balıklar oral, immersiyon ve enjeksiyon yöntemiyle aşılanmıştır. Aşuların etkinliklerinin değerlendirilmesi için oral yöntemle aşılanan balıklara 70. gün, immersiyon yöntemi ile aşılanan balıklarda 28. ve 75. günler, enjeksiyon yöntemi ile aşılanan balıklarda 45. ve 105. günler eprüvasyona maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda saha suşlarından hazırlanan aşuların (her üç aşılama yönteminde de) daha iyi koruma sağladığı tespit edilmiştir. Uygulanan polivalan (karma) aşularında monovalan aşular kadar iyi bir koruma sağladığı gözlenmiştir.

Deshmukh vd. (2012), gökkuşağı alabalıkları ticari olarak satılan *Y. ruckeri* biyotip 1 (AquaVac[®] ERM) veya biyotip 1 ve 2 karışımı (AquaVac[®] RELERA[™]) aşularla 30 saniye daldırma yöntemiyle aşılanmışlardır. Aşılama işleminden sonra balıkla 4, 6 ve 8 ay sonra veya her ikisini içeren aşularla aşılamadan sonra, *Y. ruckeri* serotip O1, biyotip 2 (10^6 ile 10^7 CFU/balık) ile intraperitoneal olarak enjekte etmişlerdir. Balıklardaki yaşama oranları AquaVac[®] ERM ile aşılanan balıklarda 4 ve 6 ay sonra yaşama oranı %40 civarında iken AquaVac[®] RELERA ile aşılanan balıklarda bu oran %60 civarında bulunmuştur.

Strøm vd. (2013), yersiniosisiz hastalığına karşı içinde *Y. ruckeri* biyotip 1 ve 2 eşit miktarda için bulduran deneysel aşı ile ticari “state of the art” aşının etkileri karşılaştırılmıştır. Araştırmada daldırma ve banyo yöntemleri kullanılmıştır. Balıklar 1:10 oranında dilüe edilmiş aşı solüsyonuyla 30 saniye süreyle daldırma ve 5 dakika banyo

yöntemiyle aşılmıştır. İki ay sonra tüm gruplar *Y. ruckeri* biyotip2 ile banyo yöntemi uygulanarak epruvasyon yapılmıştır. Epruvasyon verilerine göre ne ticari “state of the art” aşı ne de deneysel aşlarının yeterli koruma sağlamadığını bildirmiştir.

Yersinia ruckeri'ye karşı ilk aşı denemeleri başladığında inaktif aşlarınıyüksek oranda koruma sağladığı rapor edilirken son zamanlarda yapılan çalışmalarda inaktif aşların sağladığı korumanın düşük olduğu görülmektedir. Korumanın düşmesinin nedenlerinden bir tanesinde bakterilerin sürekli ekolojik şartlardan dolayı mutasyona uğrayarak yapısal değişikliklere gidiyor olması gösterilebilir.

1.7. Çalışmanın Amacı ve Gerekçesi

TUİK (2012) verilerine göre yılda 107936 ton alabalık yetiştiriciliği yapılmakta olan ülkemizde yersiniosis alabalık işletmelerinde önemli kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca, yersiniosis hastalığının bütün salmonidlerde ve kedi balığı, japon balığı, mersin balığı gibi salmonid olamayan balıklarda da hastalık meydana getirdiği ve büyük ekonomik kayıplara sebep olduğu bilinmektedir.

Patojenik balık hastalıklarından korunma ve tedavisinde antibiyotik gibi kemoterapötikler kullanılmakta, ancak bu kemoterapötiklerin kaslarda birikmesi, karaciğer başta olmak üzere deri ve bağırsak gibi organları tahrip etmesi, uzun süreli kullanımlarda bakterilerin bu ilaçlara karşı direnç kazanması, immun sistemi baskılaması, kısa bir süre için etkili olması, bütün enfeksiyonlara karşı kullanılamaması ve maliyetinin yüksek olması bu ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı antibiyotik gibi kemoterapötiklerin hastalıklara karşı korunmada kullanımının azaltılması ve aşı kullanımına karşı olan ilginin artırılması amaçlanmaktadır.

Bu araştırmada TUBİTAK 110O886 nolu projeden elde edilen aroA ve aroC mutant *Yersinia ruckeri* aşısının enjeksiyon, immersiyon ve yemle aşılama yöntemleri uygulanarak etkinliği belirlenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Aşı

Çalışmada kullanılan Yersiniosis aşısı 110O886 nolu TÜBİTAK projesinden elde edilmiş olup, aşı olarak kullanılan *Y. ruckeri* canlı ve aroA ve aroC mutanttır. aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri* içerisinde özel katkı maddeleri olan BHI sıvı besi yerinde 28°C'de bir gece çoğaltıldıktan sonra 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sonra PBS ile peletler yıkanmış ve mutant bakteriler aşı için hazır hale getirilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. aroA ve aroC Mutant *Y. ruckeri*'nin Virülanslığının Belirlenmesi

Mutasyona uğratılmamış wild-tip *Y. ruckeri* RB0708 ile bu bakterinin mutasyona uğratılmış formu arasında virülanslık farkı oluşup oluşmadığı aşağıdaki şekilde belirlenmiştir. Yaklaşık 10 g ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıkları 250 litrelik üç kapalı devre sistemine alınmış ve iki hafta burada tutularak laboratuvar şartlarına alışmaları sağlanmıştır. Adaptasyon süresince ve sonrasında vücut ağırlıklarının %3'ü kadar günde iki defa yemlenmiştir. Enjeksiyon yapmadan önce balıklar 50 mg/L MS222 ile bayıltılmıştır. Balıkların yüzde ellisini öldüren dozun (LD₅₀) bulunması için, balıklar 24gruba ayrılmış ve akarsu sistemine sahip her bir akvaryuma (40L) 10'ar balık stoklanmıştır. Bu amaçla, wild tip *Y. ruckeri* RB0708 ve aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri* de BHI'a inoküle edilmiş ve 22°C'de ki 80 X g'de çalışan çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteriler ayrı ayrı 4000 X g'de 5 dakika santrifüj edilmiş, peletler fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkanmıştır. *Y. ruckeri* RB0708 ile aşı olarak kullanılacak aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri* PBS ile 1x10², 1x10³, 1x10⁴, 1x10⁵, 1x10⁶, 1x10⁷ ve 1x10⁸CFU oranında ayrı ayrı seyreltikten sonra balıklara intraperitonealenjeksiyon yöntemiyle 100 µl solüsyon enjekte edilmiştir. Diğer bir grup

olan 10 kontrol balığa ise sadece 100 µl PBS enjekte edilmiştir. Denemeler iki tekerrür olarak yapılmıştır.

Enfeksiyondan sonra balıklar 21 gün süreyle her gün gözlemlenmiş ve ölmüş balıklar akvaryumlardan hemen alınarak bakteriyolojik yönden incelenmiştir. Deney süresince suyun sıcaklığı $16,1 \pm 1,2^\circ\text{C}$ olarak ölçülmüştür. Bu işlem 3 paralel halinde yapılmıştır. Deneme sonunda canlıların yüzde ellisini öldüren doz (LD_{50}) değeri belirlenmiştir.

2.2.2. aroA ve aroC Mutant Bakterilerin Persistansının Belirlenmesi

Persistansın belirlenmesi için ise 60 balığın her birine yukarıda belirlenen LD_{50} değeri ($2,3 \times 10^4$) CFU/balık *Y. ruckeri* RB0708 olacak şekilde 100 µl PBS solüsyonu IP olarak enjekte edilmiştir. Aynı işlem 60 balıkla aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri* için ($1,1 \times 10^7$ CFU) tekrarlanmış ve kontrol grubundaki 60 balığa ise sadece 100 µl PBS enjekte edilmiştir. 24 saat aralıklarla her bir gruptan 3'er balığın karaciğer, dalak ve böbreğinden TSA'ya ekim yapılmış ve 22°C de 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Böylece aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri* ile wild tip *Y. ruckeri* RB0708'nin balıkların hangi organlarında ne kadar süreyle kaldıkları tespit edilmiştir. Bu işlem 2 paralel halinde yapılmıştır.

2.2.3. aroA ve aroC Mutant Bakterilerin Fenotipik ve Genetik Olarak Belirlenmesi

Mutasyona uğratılan *Y. ruckeri* ile mutasyona uğratılmamış (wild-type) *Y. ruckeri* fenotipik ve genetik olarak karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda Gram boyama, sitokrom oksidaz, katalaz, β-galaktosidaz, arjinin dihidrolaz, lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz, sitrat kullanımı, H_2S üretimi, üreaz, triptofan deaminaz, indol üretimi, voges proskauer, jelatinaz, eskülin, glikoz, mannitol, inositol, sorbitol, ramnoz, sakkaroz, amigdalin, metil kırmızısı, xyloz, motilite, oksidasyon-fermantasyon ve arabinoz testleri yapılmıştır.

2.2.4. aroA ve aroC Mutant Bakterilerin İstikrarlılığı ya da Geriye Dönüşüm Olasılığının Belirlenmesi

Delesyonla aroA ve aroC mutant yapılan bakterilerin istikrarlılığının ne kadar devam ettiğini belirlemek için aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri*'nin 30 defa BHI broth da pasajı yapılmıştır. Bu bağlamda, 24 saat inkübe edilmiş mutant bakterilerin bulunduğu tüpten 50 µl alınarak yeni 2 ml'lik BHI broth tüpüne aktarılmıştır. Her beş pasaj sonunda her bir replikadan 500 µl alınarak 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılıp kaynatma yöntemiyle DNA elde edilmiştir. Kısaca kaynatma yöntemi özetlenecek olursa, inkübasyon sonunda brottan 0,5 mL alınarak 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 5000 X g'de 3 dakika santrifüj edilmiş, üstteki sıvı dökülmüş ve peletler 0,5 ml saf suda çözülerek 10 dakika su içerisinde kaynatılmıştır. Örnek soğutulduktan sonra 16000 X g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı kısım PZR'de kullanılmıştır.

Elde edilen ürünler jelde yürütüldüklerinde aroA ve aroC mutant bakterilerde bu gen bölgesi olmayacağından wild-tiple kıyaslandığında daha kısa PZR ürünü oluşmuştur.

2.2.5. PZR ile Mutant Doğrulama aroA ve aroC Mutant Bakterilerin Genotipik Olarak Belirlenmesi

Her bir PZR reaksiyonu 25 µL'den oluşmuştur. Her bir reaksiyonda 12,5 µL 2X PZR master mix (Qiagen), 1,0 µL primer karışımı, 9,5 µL saf su ve kaynatma yöntemiyle elde edilen DNA'dan 2 µL eklenmiştir. Reaksiyon toplamda 30 döngüde tamamlanmış olup döngüler 95°C'de 30 saniye denaturasyon, 45°C'de 1 dakika tutunma ve 72°C'de 3 dakika uzama şeklinde gerçekleşmiştir. Reaksiyon ilk döngüye başlamadan önce 95°C'de 5 dakika ve son döngüden sonrada 72°C de 10 dakika bekletilmiştir. Primer olarak da mutasyonda kullanılan en dıştaki primerler (5pF01 ve 3pR01) kullanılmıştır. Elde edilen ürünler %1'lik agarozda yürütüldükten sonra görüntülenmiştir (Şekil 1).

2.2.6. Balıkların Aşılınması ve Aşı Uygulama Yönteminin Etkinliğinin *Y. ruckeri* Aşısı İçin Belirlenmesi

Elde edilen mutant *Y. ruckeri*'nin alabalıklarda yersiniosis hastalıklarına karşı koruma sağlayıp sağlamadığını belirlemek için laboratuvar şartlarına adapte edilmiştir. 5,2±1 g ağırlığındaki balıklar mutant *Y. ruckeri* ile aşılınmıştır. Bu amaçla mutant bakteriler BHI brotta çoğaltılmış, santrifüj edilmiş, PBS ile yıkandıktan sonra PBS ile seyreltilmiştir.

2.2.6.1. Enjeksiyon Yöntemi ile Aşılama

Enjeksiyon yönteminde balıklar üç gruba ayrılmış her bir grupta dört adet 40 litrelik akvaryum kullanılmış ve her bir akvaryuma da 10 balık (5,2±1 g) stoklanmıştır. Gruplardan birisi negatif kontrol bir diğeri de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Enjeksiyon yapılmadan önce balıklar 50mg/L MS222 ile bayıltılmıştır. Negatif gruptaki balıklara hiçbir müdahale edilmezken, pozitif gruptaki balıklara sadece 100 µl PBS ip olarak enjekte edilmiştir. Diğer gruptaki balıklara ise 1,1x10⁴ CFU/0,1 ml mutant *Y. ruckeri* ip olarak verilmiştir.

2.2.6.2. İmmersiyon Yöntemi ile Aşılama

İmmersiyon yönteminde de balıklar üç gruba ayrılmış her bir grupta üç adet 40 litrelik akvaryum kullanılmış ve her bir akvaryuma da 10 balık (5,2±1 g) stoklanmıştır. Gruplardan birisi negatif kontrol bir diğeri de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif gruptaki balıklara hiçbir müdahale edilmezken, pozitif gruptaki balıklara sadece 100 ml PBS eklenmiştir. Deneyler akarsu sistemine sahip akvaryumlarda yapılmıştır. Deneme sırasında akvaryumlara gelen sular kapatılmış ve su seviyesi de 15 L'ye düşürüldükten sonra akvaryumlara 3 ayrı yoğunluktaki (1,1x10⁷, 10⁵ ve 10³CFU/ml) mutant *Y. ruckeri* ile 1 saat banyo yaptırılmıştır. Deneme sonunda akvaryumların suları tekrar açılmıştır.

2.2.6.3.Yemleme Yöntemi ile Aşılama

Yemleme yönteminde ise yine balıklar üç gruba ayrılmış her bir grupta üç adet 500 litrelik fiberglas tank kullanılmış ve her bir tanka da 50 balık ($5,2 \pm 1$ g) stoklanmıştır. Negatif gruptaki balıklar normal pelet yemle yemlenirken, pozitif gruptaki balıklar ise ekstradan 50 ml/kg yem olacak şekilde balık yağı katılmış pelet yemle beslenmiştir. Deneme grubundaki balıklar ise 3 adet tanka sırasıyla $1,1 \times 10^7$, 10^5 ve 10^3 CFU mutant *Y. ruckeri*/gram pelet yem ile günde 2 defa doyana kadar 5 gün yemlenmiştir. Bakteriler yeme 50 ml/kg yem olacak şekilde balık yağı ile katılmıştır.

Balıkların bağışıklık sisteminin gelişmesi için 3 hafta beklenmiş ve sonra negatif kontrol haricindeki diğer gruplardaki balıklara $1,1 \times 10^5$ CFU/balık wild tip *Y. ruckeri* ip olarak verilmiştir. Ölen balıklar kaydedilmiş ve ölümler olduğunda balıklardan Tryptic soy agara ekim yapılmış ve ölüm sebebi yukarda açıklanan biyokimyasal testlerle belirlenmiştir. Ayrıca izole edilen bakterinin *Y. ruckeri* olup olmadığı bakterinin DNA'sının kaynatma yöntemiyle izole edilerek PZR ile doğrulanmıştır (Altınok vd., 2001). Balıklar wild tip *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra 30 gün kontrol altında tutulmuştur. Deneme süresince suyun sıcaklığı $19 \pm 1^\circ\text{C}$ olarak ölçülmüştür. Balıklar vücut ağırlığının %3 kadar yemle günde iki defa yemlenmiştir.

Aşıların sağladığı göreceli korunma oranı (RPS) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{RPS} = [1 - (\text{Aşılı balıklardaki mortalite (\%)} / \text{Kontrol grubundaki mortalite (\%)})] \times 100$$

2.2.7. Kullanılan Aşının Koruma Süresinin Belirlenmesi

Yaklaşık bir yıl önce mutant *Y. ruckeri* ile aşılanan balıklar (n=150) ile negatif kontrol grubu (n=150) ve pozitif kontrol grubu (n=150) balıklar akarsuya sahip 500 litrelik tanklarda ayrı ayrı tutulmuştur. Bu balıklar bir yılın sonunda negatif kontrol haricindeki diğer gruplardaki balıklara (210 ± 15 g) $1,1 \times 10^5$ CFU/balık wild tip *Y. ruckeri* ip olarak verilmiş ve mutant aşıların ne kadar süreyle koruma sağladığı da tespit edilmiştir. Balık ölümleri onuncu günden sonra durmuş ve deneme 45 gün devam etmiştir. Deney süresince suyun sıcaklığı $18 \pm 2^\circ\text{C}$ civarında ölçülmüştür. Balıklar vücut ağırlığının %3'ü kadar yemle günde iki defa yemlenmiştir.

2.2.8. İstatistik

Mutant *Y. ruckeri* ile wild tip *Y. ruckeri*'nin balıklılar üzerine olan LD₅₀ değerleri probit analiz yöntemiyle (SPSS 2002, SPSS Chicago, IL, USA) hesaplanmıştır. Aşılana balıklarda ve kontrol balıklarında görülen ölümler ya da aşının sağladığı koruma Kaplan–Meier yaşama ve ölüm zamanı analizi testi ile analiz edilmiştir. Gruplar arasında önemli fark görüldüğünde ortalamalar Cox–Mantel testi (Statistica, Statsoft, Tulsa, OK, USA) ile analiz edilmiştir.

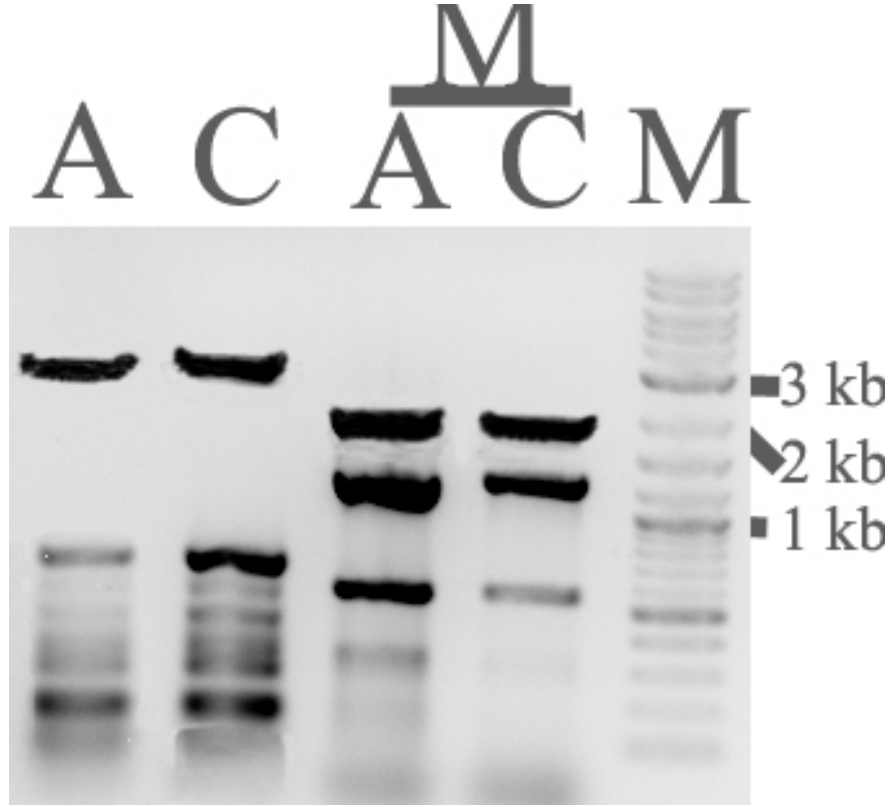
3. BULGULAR

3.1. Deneme Çalışmaları Bulguları

aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri*'nin virülanslığının belirlenmesi denemelerinde yüksek aşı konsantrasyonundaki balıklar ilk 3 gün içerisinde ölmüştür. En fazla ölüm 1×10^8 CFU konsantrasyonunda olurken 1×10^6 CFU konsantrasyonunda hiç balık ölmemiştir. Mutant *Y. ruckeri*'nin LD₅₀ değeri 1×10^7 CFU ($5,6 \times 10^6 - 1,6 \times 10^7$ CFU güven aralığında) bulunmuşken wild tip *Y. ruckeri*'nin LD₅₀ değeri $2,3 \times 10^4$ olarak bulunmuştur. Balıklar wild tip *Y. ruckeri* ile enfekte edildikten sonra ölümler ikinci gün başlamış ve on ikinci güne kadar devam etmiştir.

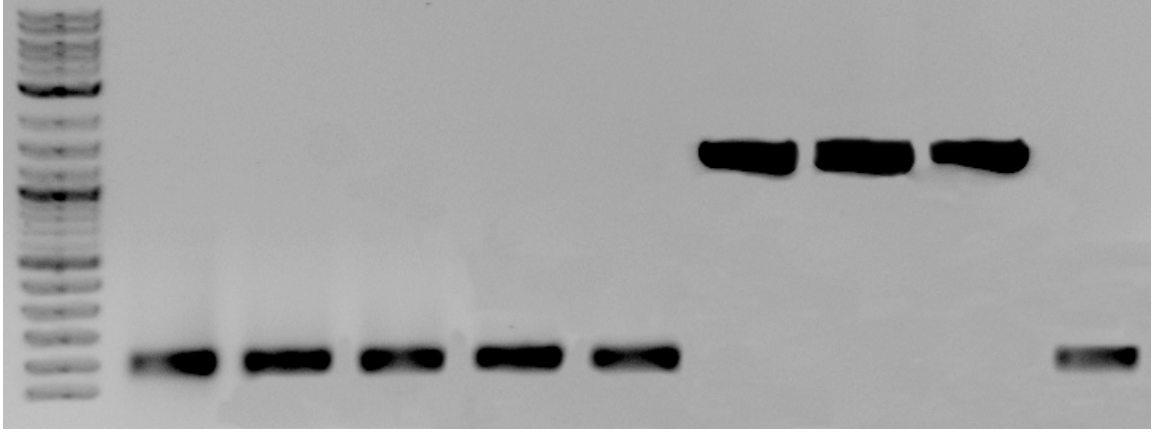
Persistansın belirlenmesi çalışmalarında ise ilk 3 gün balıkların karaciğer, dalak ve böbreğinden mutant *Y. ruckeri* izole edilebilirken üçüncü günden sonra izole edilememiştir. Diğer taraftan wild tip *Y. ruckeri* RB0708 balıklarının iç organlarından 15 gün süreyle izole edilmiştir.

İzole edilen bakteriler fenotipik olarak tanımlandığı gibi PZR ile de teyit edilmiştir. Mutant ile wild-tip *Y. ruckeri* arasında herhangi bir biyokimyasal farklılık bulunamamıştır. aroA ve aroC mutant bakterilerin istikrarlılığı ya da geriye dönüşüm olasılığının araştırılması sonucunda mutant bakterilerin eski hali olan wild-tip'e dönüşmedikleri belirlenmiştir. Bakterilerin spesifik gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması sonucunda elde edilen PZR ürünleri jelde yürütüldüklerinde aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri*'de bu gen bölgesi olmayacağından wild-tiple kıyaslandığında daha kısa PZR ürünü oluşmuştur. Başka bir deyişle, aroA ve aroC genlerinde mutasyon olduğunda 2100 baz çifti (bp) uzunlukta fragment oluşurken mutasyon olmayanlarda ise 3300 bp uzunluğunda bantlar oluşmuştur (Şekil 1).



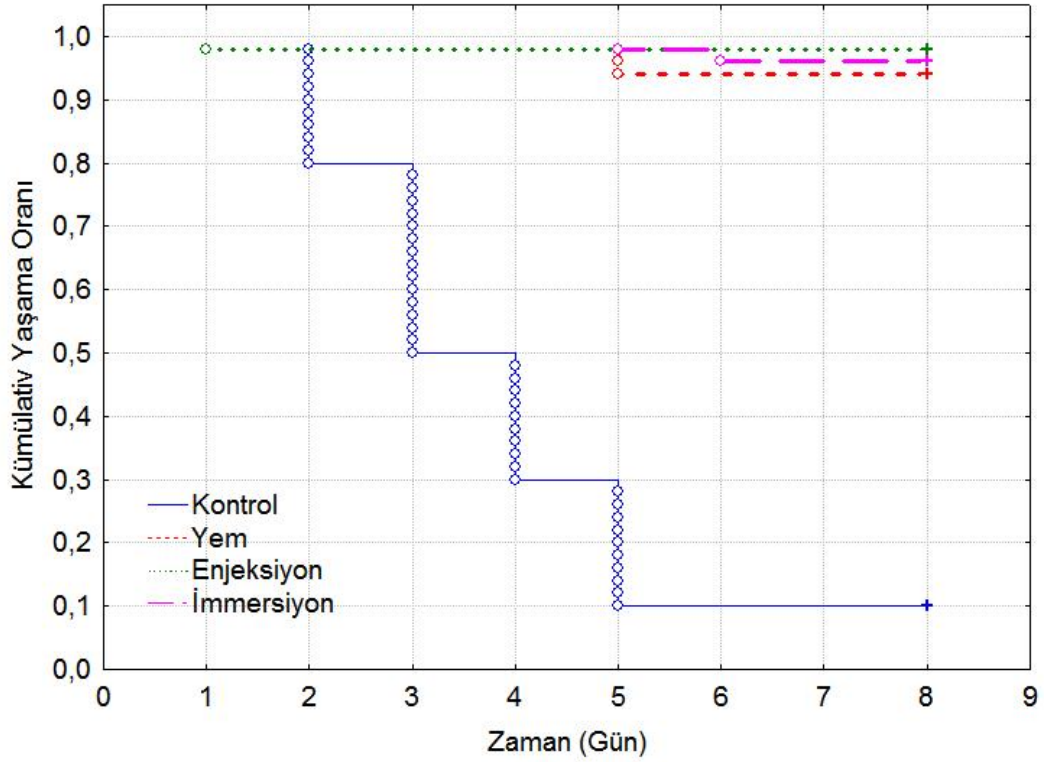
Şekil1. aroA (A) ve aroC (C) geninin 5pF01 ve 3pR01 primerleri kullanılarak yapılan amplifikasyonun inverted görüntüsü. A ve C deki 3300 baz çiftlik fragmentler mutant olmayan bakterileri gösterirken MA ve MC deki 2100 baz çiftlik fragmentlerde mutasyonun olduğunu göstermektedir

Daha sonra mutasyonun gerçekte olup olmadığını belirlemek için sekans primerleri kullanılarak bakterilerin 200 baz çiftlik kısmı çoğaltılmış (Şekil 2) ve sekans edilmiştir. Sekans sonucunda 200 bazlık fragment delete olan oluşturan bakterilerde mutasyon olduğunu göstermektedir.



Şekil 2. aroA (A) ve aroC (C) geninin sekans primerleri kullanılarak yapılan amplifikasyonun inverted görüntüsü. İlk sütunda 1 kilobazlık marker bulunmaktadır. 2, 3 ve 4, 5, 6 ve 10. sütunlarda 200 bazlık amplifikasyon (aroA ve aroC mutant) oluşurken, 7, 8 ve 9. sütunlarda mutasyon (1600 baz çifti) oluşmamıştır

Yemle aşılama balıklarda sadece 5. gün $1,1 \times 10^7$ CFU *Y. ruckeri* ile enfekte edilen 1 balık ve $1,1 \times 10^5$ CFU *Y. ruckeri* ile enfekte edilen iki balık ölmüştür. Kontrol grubunda görülen ölüm oranı ise %90 olarak gerçekleşmiştir. İmmersiyon ile aşılama balıklarda ise sadece 6. günde en yüksek bakteri konsantrasyonunda 2 balık ölmüştür. Enjeksiyon yöntemi ile aşılandıktan sonra wild tip *Y. ruckeri* ile enfekte edilen balıklarda hiç ölüm görülmemiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Alabalıklarda aşının sağladığı yaşama oranını (Kaplan-Meier). Balıklar immersiyon, enjeksiyon ve yeme karıştırılan *Yersinia ruckeri* aşısı ile aşılandıktan 3 hafta sonra wild tip *Y. ruckeri* ile enfekte edildi. Altıncı günden sonra balıklarda ölüm görülmedi

Pozitif kontrol grubundaki ölümler ikinci gün başlamış ve 5. güne kadar devam etmiştir. Diğer gruptaki ölümler ise beşinci ve altıncı günlerde olmuştur. Deneme sonucunda; aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri* ile enjeksiyon, immersiyon ve yemleme yöntemleri ile aşılanan balıklardaki RPS değeri sırasıyla %100, %98 ve %97,7 olarak bulunmuştur. Farklı yoğunluktaki *Y. ruckeri* ile immersiyon ve yemleme yöntemiyle aşılanan balıklarda ki yaşama oranları arasında herhangi bir fark bulunamamıştır.

Bir yıl önce aşılanmış balıklarda hiç ölüm görülmezken pozitif kontrol grubundaki balıklarda ölüm oranı %80 olmuştur. Dolayısıyla aşılanan balıkların RPS değeri %100 olarak hesaplanmıştır.

4. TARTIŞMA

Akuakültür dünyanın birçok ülkesinde son yıllarda çok hızlı gelişen bir endüstri haline gelmiştir. Birçok ülkede tatlı su veya deniz balıklarının entansif yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde de, su ürünleri yetiştiriciliği sektörü son yıllarda büyük aşamalar kat etmiştir (Aydın vd., 2005). Kültür balıkçılığı nedeniyle çok sayıda balığın bir arada ve yakın temas halinde bulunması, doğada (dere, göl, gölet, deniz, vs) serbest yaşayanlara oranla, daha fazla hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Balıkların içinde yaşadıkları ortamın (tuzlu su, acı su, tatlı su) sınırlı olan besleyici, fiziksel, kimyasal, biyotik ve abiyotik yaşam koşullarının olumsuz yönde değişmesi bunların kısa süre içinde düzelmemesi ve devam etmesi bulaşıcı olmayan hastalıkların oluşumuna ve bu durumun balıkların bağışıklık durumlarını negatif yönde etkilediğinden de bulaşıcı olan hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır.

Kültür balıkçılığında hastalık oluştuğundan sonra onu tedavi etmek çok zor olup, uzun ve yorucu bir çalışmayı gerektirmektedir. Balıklarda herhangi bir nedenden dolayı meydana gelen ve önemli ekonomik kayıplar oluşturan enfeksiyonlara karşı hem koruyucu hem de tedavi edici amaçlı sülfonamidler, tetrasiklinler ve nitrofuranlar gibi çeşitli kemoterapötik maddeler uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Ancak kemoterapötiklerin önemli yan etkilerinin olması, balıklarda özellikle böbrek ve karaciğer başta olmak üzere bağırsak ve deri gibi organları tahrip etmesi, kaslarda birikmesi, uzun süreli kullanımlarda bakterilerin bu ilaçlara karşı direnç kazanması ve havuzlarda dibe çökerek sediment oluşturması, immun sistemi baskılaması, kısa bir süre için etkili olması, bütün enfeksiyonlara karşı kullanılamaması bu ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır (Yonar, 2008). Bu bağlamda kullanılan antibiyotiklerin azaltılması daha çevreci ve ekonomik olan, balıkları uzun süre hastalıklardan koruyan aşuların geliştirilmesi gerekmektedir. Balık yetiştiriciliği alanında gelişmiş ülkelerde antibiyotik yerine aşılama yapılmaktadır. Örneğin Norveç'te aşı uygulamalarının geliştirilmesinden sonra, ilaç kullanımının 47 ton aktif maddeden 1 tona düştüğü bildirilmiştir (Gudding vd., 1999).

Yersiniosis hastalığına karşı ilk aşı denemeleri Ross ve Klontz (1965) tarafından yapılmıştır. Bu aşı fenolle öldürülmüş bakteriden hazırlanan ve yeme katılan (10 kg yeme 15 ml *Yersinia ruckeri*) oral bir preparasyondur. Gökkuşluğu alabalıkları ilk 2 hafta boyunca

haftada 5 gün, çalışmanın devamında da hafta da 1 kez bu yemle beslenmiştir. 70 gün sonra balıklarda %90 koruma gösterdiği ve bu korumanın 408 gün sürdüğü bildirilmiştir. Gravningen vd. (1998), yaptıkları bir çalışmada *Y. ruckeri* serotype 1 bakterisini %1'lik formalinle inaktive ederek hazırladığı aşıyı, gökkuşağı alabalıklarında oral yöntemi ile uygulamıştır. 9°C su sıcaklığında oral yöntemi ile balıklar aşılanmıştır. Aşılamadan 8 hafta sonra 12°C su sıcaklığında balıklar wild tip *Y. ruckeri* ile i.p. olarak eprüvasyon yapılmıştır. Eprüvasyondan 4 hafta sonra RPS değerleri %10 ile %90 arasında değişmiştir. Yapılan bu çalışmada ise yemle aşılama yöntemindeki RPS değeri %97,7 olarak bulunurken banyo yöntemi ile aşılama bu değer %98 olarak bulunmuştur. İki çalışma arasındaki RPS değeri farkının su sıcaklığından ve aşı tiplerinden (inaktive aşı) kaynaklandığı düşünülmektedir. Su sıcaklığı ile balıklardaki bağışıklığın gelişimi doğru orantılıdır. Gökkuşağı alabalıklarında su sıcaklığının bağışıklık üzerine etkilerini incelendiğinde bağışıklığın 18°C su sıcaklığında 5 günde, 10°C'de 10 günde gelişmektedir (Johnson vd.,1982b). Canlı atenüe aşılar antijenin aşılanmış balık popülasyonu içinde devamlılığını sağlar. Bu sayede bağışıklık cevabı daha güçlü ve uzun olur, basit dağıtım ve balık içinde çoğalmaları ve ayrıca düşük doz gereksinimleri nedeniyle de bazı ekonomik avantajlara da sahiptir (Marsden vd., 1998; Gudding vd., 1999; Neary vd., 2008).

Balıkları aşılama için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Johnson ve Amend (1983a), yaptıkları bir çalışmada inaktif *Y. ruckeri* solüsyonlarını 20 saniye süreyle banyo ve 2-5 saniye süreyle püskürtme yoluyla uygulamış ve oluşan bağışıklığı karşılaştırmıştır. Aşısız kontrol gruplarında mortalite %53 ile %66 arasında bulunurken aşı gruplarında ise mortalite %15 olmuştur. Banyo ile püskürtme yönteminin etkinliği karşılaştırıldığında, deneysel enfeksiyon sonucu oluşan mortalite oranları arasında önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir. Zeytun (1999), iki farklı yersiniosis aşısının Göreceli Korunma Oranı (RPS) açısından etkinlikleri araştırılmış. 1litre aşı/ 9 litre su oranında aşılar 15±1°C su sıcaklığında 4,2g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarına immersiyon yöntemi ile uygulanmıştır. Bağışıklık oluşumu için 34 gün beklendikten sonra 10⁹CFU/ml *Y. ruckeri* ile eprüvasyon yapılmıştır. Sonuç olarak her iki aşısında RPS % 84 olarak eşit çıkmıştır. Skov vd. (2012), yaptıkları bir çalışmada *Y. ruckeri* biotype 1 (AquaVac[®] ERM) bakterisini, 15±2°C su sıcaklığında 5,3-12,8g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarında immersiyon yöntemi ile uygulamıştır. İlk aşılama 6 hafta sonra 2,3 x 10⁸ CFU/mL civarındaki *Y. ruckeri* serovar I (suş 392/2003) bakterisi ile banyo yöntemiyle eprüvasyon yapılmıştır. Eprüvasyondan 28 gün sonra RPS değerleri %85 olarak bulunmuştur. Raida ve

Buchmann (2008a), yaptıkları bir çalışmada farklı sıcaklıklarda (5, 15 ve 25°C) 4-6g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarını *Yersinia ruckeri*'ye karşı banyo yöntemi ile aşımıştır. Aşı olarak *Y. ruckeri* (serotipe 1) bakterin (Pharmaq AS, Norway)'i 1:10 dilüsyonla 10 dakika uygulamıştır. Aşılardan 4 ay ve 8 ay sonra i.p 5×10^5 CFU/balık ve banyo yöntemiyle 1×10^7 CFU/mL epruvasyon yapılmış ve optimum 15°C'de RPS değerleri %75-77 arasında bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada epruvasyon denemeleri sırasında su sıcaklığının 19°C olmasına rağmen immersiyon aşılama yöntemindeki RPS değeri %98 olarak bulunmuştur. Çalışmada da aynı ağırlıktaki balık kullanılmasına rağmen ve bu çalışmada su sıcaklığının yüksek olmasına karşın, aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri* aşısının yüksek koruma sağlamanın nedeni bu aşının canlı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu sıcaklık alabalıkların yaşayabileceği üst sınır olarak bilinmektedir ve bu sıcaklıkta sağlanan yüksek koruma aşının yersiniosis'e karşı güçlü koruma sağladığının kanıtıdır.

Balık büyüklüğü ile balıklardaki bağışıklığın doğru orantılı olarak gelişmektedir. Bruno ve Munro (1989) 2g ve 4g atlantik salmonlarında lisanslı bir yersiniosis aşısı (Aquaculture Vaccines Saffron Walden, UK) ile yaptıkları aşılama sonucunda 4gramlık balıklarda RPS %87-90 ve 2 gramlık balıklarda ise RPS %65-76 olarak bulunmuştur. Austin vd. (2003), yaptıkları bir çalışmada *Y. ruckeri* ticari aşısı (Aquaculture Vaccines), inaktive *Y. ruckeri* EX5 izolatından hazırlanmış aşısı, ticari aşısı ve inaktive EX5 karışımında hazırlanmış aşıları, 15°C su sıcaklığında 10g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarında immersiyon yöntemi ile uygulamıştır. İlk aşılardan 28 gün sonra *Y. ruckeri* T1 ve *Y. ruckeri* YR1 bakterileri (5×10^4 hücre/ mL) i.p. olarak epruvasyon yapılmıştır. Epruvasyondan 14 gün sonra RPS değerleri ticari aşısı için %47(*Y. ruckeri* T1) %95 (*Y. ruckeri* YR1), *Y. ruckeri* EX5 için %76 (*Y. ruckeri* T1) %58 (*Y. ruckeri* YR1), ticari ve inaktive EX5 karışımı için %56 (*Y. ruckeri* T1) %97 (*Y. ruckeri* YR1) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan balıkların Austin vd. (2003)'nin yapmış olduğu çalışmadan küçük olmasına rağmen ve su sıcaklığının onlarınkinden yüksek olmasına rağmen aroA ve aroC mutant *Y. ruckeri* aşısının yüksek koruma sağlamanın nedeni bu aşının canlı olmasından kaynaklanmaktadır. Canlı aşılarda normal wild tip *Y. ruckeri*'den hiç farklı olmayıp sadece mutant aşılarda çoğalma yetenekleri yok edildiğinden çoğalamamaktadır ve en fazla balıklarda 3 gün kalabildiğinden balıklardaki bağışıklık sistemide bu zaman zarfında gelişmektedir.

Deshmukh vd. (2012), $15 \pm 1^\circ\text{C}$ su sıcaklığında 5g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarını ticari olarak satılan *Y. ruckeri* biotype 1 (AquaVac[®] ERM) veya biyotip 1 ve

2 karışımı (AquaVac® RELERA™) aşularla 30 saniye daldırma yöntemiyle aşılamışlardır. Aşılama işleminden sonra balıklarla 4, 6 ve 8 ay sonra veya her ikisini içeren aşularla aşılamadan sonra, *Y. ruckeri* serotip O1, biyotip 2 (10^6 ila 10^7 CFU/balık) ile intraperitoneal olarak enjekte etmişlerdir. Balıklardaki yaşama oranları AquaVac® ERM ile aşılanan balıklarda 4 ve 6 ay sonra yaşama oranı %40 civarında iken AquaVac® RELERA ile aşılanan balıklarda bu oran %60 civarında bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada ise balıklar aşılandıktan bir yıl sonra *Y. ruckeri* ile enfekte edildiğinde balıklardaki RPS değeri %100 olarak bulunmuştur. Bu değer daha önce yapılan tüm çalışmalardan daha yüksek bulunmuştur. Diğer çalışmalarla bu çalışma arasındaki RPS değeri farkının aşı tiplerinden (inaktive aşı – canlı aşı) kaynaklandığı düşünülmektedir.

Johnson ve Amend (1983b), yaptıkları bir diğer çalışmada enjeksiyon ve banyo yöntemlerini karşılaştırmış, 1:10 oranında dilüe edilen bakterinin intraperitoneal olarak verilmesinin, 1:10 ve 1:20 dilüsyonda 20 saniye banyo yoluyla yapılan aşılamaya göre daha iyi bir koruma oluşturduğunu bildirmiştir. Erdal (1989) tarafından yapılan araştırmada, 20-30 g ağırlığındaki *Salmo salar*'ları 6 farklı *Y. ruckeri* serotipi ile aşılamıştır. Serotip I ve II'den hazırlanan kombine aşı LD₅₀ dozu ile balıklara intraperitoneal yolla verildiğinde balıklarda SerotipI'e (Hagerman) karşı %79 koruma sağlarken, Norveç'ten izole edilen SerotipI'e karşı %71, SerotipII'ye karşı %93, SerotipIII'e karşı %98 koruma sağlamıştır. Raida ve Buchmann (2008b), yaptıkları bir çalışmada *Y. ruckeri* serovar I bakterisini, 13°C su sıcaklığında 4-6g ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarına enjeksiyon yöntemi ile uygulamıştır. Enjeksiyon yöntemini 5×10^5 (CFU/balık) olarak uygulanmıştır. İlk aşılamadan 35 gün sonra 5×10^5 CFU/balık şeklinde i.p. olarak eprüvasyon yapılmıştır. Eprüvasyondan 28 gün sonraki RPS değerler %79 olarak bulunmuştur. Chettri vd (2013), yaptıkları bir çalışmada *Y. ruckeri* biyotip 1 ve 2 karışımı (AquaVac® RELERA™) aşını 12-13°C su sıcaklığında 6,3-7,8g ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarında immersiyon, enjeksiyon ve banyo yöntemleri ile uygulamıştır. İlk aşılamadan 3, 5 ve 7 ay sonra $8,5 \times 10^6$ CFU/balık, $10,6 \times 10^6$ CFU/balık ve 1×10^8 CFU/balık şeklinde i.p. olarak üç eprüvasyon yapılmıştır. RPS değerleri immersiyon yöntemi için %19-52 arasında, enjeksiyon yöntemi için %61-98 arasında ve banyo yöntemi için %9 olarak bulunmuştur. Scott vd. (2013), yaptıkları bir çalışmada formalinle inaktive edilmiş *Y. ruckeri* biyotip 1, non-motile *Y. ruckeri* biyotip 1 ve *Y. ruckeri* biyotip 2 izolatından hazırlanmış aşular, 12±1°C su sıcaklığında 5-6g ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarına i.p. enjeksiyon yöntemi ile uygulamıştır. İ.p. enjeksiyon yöntemi aşuları 5×10^7 CFU/ balık

olarak uygulanmıştır. İlk aşılama 28 gün sonra *Y. ruckeri* biyotip 1YR1 (9×10^5 CFU/balık), *Y. ruckeri* biyotip 2 R1 ($4,5 \times 10^5$ CFU/balık) bakterileri ile i.p. olarak epruvasyon yapılmıştır. Epruvasyondan 14 gün sonra RPS değerleri *Y. ruckeri* biyotip 1 için %62 (*Y. ruckeri* YR1) %23 (*Y. ruckeri* R1), non-motile *Y. ruckeri* biyotip 1 için %41 (*Y. ruckeri* YR1) -%4 (*Y. ruckeri* R1) ve *Y. ruckeri* biyotip 2 için %94 (*Y. ruckeri* YR1) %42 (*Y. ruckeri* R1) olarak bulunmuştur. Demirtaş (2006), gökkuşağı alabalıklarında yersiniozis hastalığına karşı *Y. ruckeri* serotip I ve sahadan izole edilen *Y. ruckeri* suşlarından hazırlanan aşılamanın balıkların bağışıklık sistemini nasıl etkilediğini karşılaştırmalı olarak incelemiştir. Araştırmada hazırlanan aşılama 12°C su sıcaklığında 6-10g ağırlığındaki balıklara oral, immersiyon ve enjeksiyon yöntemleriyle uygulanmıştır. Çalışma sonucunda enjeksiyon aşılama yapılan gruplarda koruma diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur. Enjeksiyon aşılama 45. günde elde edilen RPS değerleri 77-89 arasında olup bu değerler 105. günde 87-97 RPS'ye çıkmıştır. İmmersiyon aşılama 28. günde elde edilen RPS değerleri 59-75 arasında olup 75. günde 79-85 RPS'ye çıkmış ve enjeksiyon aşılama göre daha düşük bulunmuştur. Oral aşılama ise 70. günde elde edilen RPS değerleri 55-72 arasında elde edilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada enjeksiyon, immersiyon ve yemle aşılama yöntemlerindeki RPS değeri sırasıyla %100, %98 ve %97,7 olarak bulunmuştur. İki çalışma arasındaki RPS değerleri farkının su sıcaklığının bağışıklık üzerine etkisinden ve aşı tiplerinden (inaktive aşı) kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmada ise aşı uygulama yöntemlerinden enjeksiyon, immersiyon ve yemle oral aşılama yöntemlerinden daha iyi olmasına rağmen her 3 aşılama yöntemi ile elde edilen RPS sonuçları diğer çalışmalardan daha yüksektir. Bunun sebebi kullanılan aşının canlı olmasından kaynaklanmış olabilir.

Temprano vd. (2005), yaptıkları bir çalışmada *Y. ruckeri* 21102 O1 bakterisinden hazırlanmış aroA mutant aşı, 16°C su sıcaklığında 17-25g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarında intraperitoneal enjeksiyon yöntemi ile uygulanmıştır. Aşılama denemesinden önce aroA mutant *Y. ruckeri* aşısının ve epruvasyonda kullanılacak *Y. ruckeri* 21202 bakterisinin virülanslığının belirlenmesi için denemeler yapılmıştır. Bu denemelerde *Y. ruckeri* 21202 bakterisi ve aroA mutant *Y. ruckeri* aşısı $10^3 - 10^8$ CFU oranında ayrı ayrı seyreltikten sonra 16°C su sıcaklığında 17-25g ağırlığındaki balıklara intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle 100 µl solüsyon enjekte edilmiştir. Enfeksiyondan 7 gün sonra LD₅₀ değerleri aroA mutant *Y. ruckeri* aşısı için $5,18 \times 10^7$ CFU bulunmuşken wild tip *Y. ruckeri* 21202'nin LD₅₀ değeri $3,16 \times 10^4$ olarak bulunmuştur. Aşı $10^5, 10^6, 10^7$ CFU/0,1 ml

olarak uygulamıştır. İlk aşılama 4 hafta sonra *Y. ruckeri* 21202 bakterisiyle 7×10^5 CFU ve 5×10^6 CFU i.p. olarak epruvasyon yapılmıştır. Epruvasyondan 21 gün sonra RPS değerleri 10^5 CFU için %87,5 (7×10^5 CFU) %85 (5×10^6 CFU), 10^6 CFU için %87,5 (7×10^5 CFU) %85 (5×10^6 CFU), 10^7 CFU için %93,75 (7×10^5 CFU) %90 (5×10^6 CFU) olarak bulunmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada enjeksiyon aşılama yöntemindeki RPS değeri %100 olarak bulunmuştur. İki çalışma arasındaki RPS değeri farkının su sıcaklığının bağışıklık üzerine etkisinden, aşılama için verilen dozların yüksek olmasından (10^5 , 10^6 , 10^7 CFU) ve epruvasyon için verilen dozun yüksek olmasından (5×10^6 CFU) kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada elde edilen aşının LD₅₀ değeri Temprano vd. (2005)'in yapmış olduğu denemelerle aynı bulunmuştur, Fakat bu çalışmadaki RPS değeri daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni *Y ruckeri*'nin hem aroA ve hem de aroC genlerinin delete edilmesinden kaynaklanmış olabilir.

5. SONUÇLAR

Türkiye’de 100.239 tonu içsularda, 7697 tonu denizlerde olmak üzere toplamda 107.936 ton alabalık yetiştiriciliği yapılmaktadır (TUIK, 2012). Yetiştiriciliği yapılan bu azımsanamayacak sayıdaki alabalığın en büyük problemlerinden biri patojenik hastalıklardır. Yüksek stok yoğunluğu, sınırlı olan besleyici, fiziksel, kimyasal, biyotik ve abiyotikoptimal yaşam koşullarının olumsuz yönde ve uzun süreli değişmesi, özellikle, birçok patojenik hastalığın çıkmasınedenen olmaktadır. Bu patojenik hastalıkların tedavisi zor ve maliyetli olmaktadır. Patojenik hastalıklardan hem koruyucu hem de tedavi edici olarak antibiyotikler gibi kemoterapötikler uzun zamanda beri kullanılmaktadır. Bu kemoterapötiklerin kaslarda birikmesi, karaciğer başta olmak üzere deri ve bağırsak gibi organları tahrip etmesi, uzun süreli kullanımlarda bakterilerin bu ilaçlara karşı direnç kazanması, immun sistemi baskılaması, kısa bir süre için etkili olması, bütün enfeksiyonlara karşı kullanılamaması ve maliyetinin yüksek olması bu ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı aşılama karşı olan ilgi giderek artmıştır.

Bu çalışmada aroA ve aroC mutant *Yersinia ruckeri* aşısının enjeksiyon, immersiyon ve yemle aşılama yöntemleri uygulanması sonucu elde edilen göreceli korunma oranları (RPS) karşılaştırılmıştır. Elde edilen RPS sonuçları aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

1. Aşının yapılan enfeksiyondan 21 gün sonra LD₅₀ değeri 1×10^7 CFU ($5,6 \times 10^6 - 1,6 \times 10^7$ CFU güven aralığında) bulunmuştur.
2. Aşıların etkinliğini ölçmek için yapılacak enfeksiyon çalışmasında kullanılacak wild-tip *Y. ruckeri* RB0708 bakterisinin LD₅₀ değeri $2,3 \times 10^4$ olarak bulunmuştur.
3. Kullanılan üç aşılama yönteminden elde edilen en büyük RPS değeri enjeksiyon yöntemi ile aşılama elde edilmiştir.
4. Enjeksiyon yöntemi ile aşılama enfeksiyondan 30 gün sonra elde edilen RPS değeri %100 olarak bulunmuştur.
5. İmmersiyon yöntemi ile aşılama enfeksiyondan 30 gün sonra elde edilen RPS değeri % 98 olarak bulunmuştur.
6. Yemleme yöntemi ile aşılama enfeksiyondan 30 gün sonra elde edilen RPS değeri %97,7 olarak bulunmuştur.

7. Kullanılan aşidan yüksek ve uzun süreli bir koruma elde edilmiştir. Özellikle ilk aşılanan balıkların 1 yıl sonra enfeksiyonu sonucunda kontrol grubunda %80 mortalite olmasına rağmen aşılı balıklarda hiç mortalite görülmediği tespit edilmiştir. Dolayısıyla aşılanan balıkların RPS değeri %100 olarak hesaplanmıştır.
8. Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan ve TÜBİTAK projesinden elde edilen mutant yersiniosis aşısı, balıklarda güvenle kullanılabilir ve balıklar yersiniosis hastalığından tamamen korunabileceği tespit edilmiştir.

6. ÖNERİLER

Hızla gelişmekte olan su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe üretimi sınırlandıran ve ekonomik anlamda darbe vuran önemli sorunlardan biri tedavisi zor ve maliyetli olan patojenik balık hastalıklarıdır. Dünyada ilk defa 1950'li yıllarda Amerika'nın Idaho eyaletinde ülkemizde ilk defa 1991 yılında Denizli yöresinde ortaya çıkan *Y. ruckeri*, ülkemizde ve dünyada geniş bir yayılım göstermektedir. *Y. ruckeri*, yersiniosis hastalığına neden olmaktadır. Yersiniosis hastalığına karşı etkin korunmaya yönelik bu çalışma önemli sonuçları ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar temelinde su ürünleri sektöründeki bilinçli üreticilere, konu ile ilgilenecek araştırmacılara ve sektörle ilgili yasal düzenlemelere katkı sağlayabilecek öneriler şöyle sıralanabilir;

1. Yetiştiriciler öncelikle balık hastalıkları konusunda iyi bir eğitimden geçirilmeli, hastalıkların bulaşma yolları, hijyenin bulaşmadaki önemi ve hastalıklardan korunma ve kontrolleri konusunda bilgilendirilmelidirler.

2. Bu çalışmada aroA ve aroC mutant *Yersinia ruckeri* aşısının enjeksiyon, immersiyon ve yemle aşılama yöntemlerinin etkinlikleri konusunda bilgi verilmiştir. Üretim aşamasında sıklıkla karşılaşılan diğer balık patojenleri içinde benzer çalışmalar yapılmalıdır.

3. Balık hastalıklarının koruma ve tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin kaslarda birikmesi, karaciğer başta olmak üzere deri ve bağırsak gibi organları tahrip etmesi, uzun süreli kullanımlarda bakterilerin bu ilaçlara karşı direnç kazanması, immun sistemi baskılaması, kısa bir süre için etkili olması, bütün enfeksiyonlara karşı kullanılamaması ve maliyetinin yüksek olması bu ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı hastalıklardan korunmak için aşılar uygulanmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- Adams, A. ve Thompson, K.D., 2006. Biotechnology offers revolution to fish health management, Trends in Biotechnology, 24, 5, 201-205.
- Altinok, I., Grizzle, J.M. ve Liu, Z., 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in Rainbow Trout Blood by Use of Polymerase Chain Reaction, Dis. Aquat. Org., 44, 29-34.
- Altun, S.,2001. *Yersinia ruckeri* Suşlarının Bazı Antijenik ve Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, S.D.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Altun, S., Kubilay, A. ve Diler, Ö., 2010. *Yersinia ruckeri* Suşlarının Fenotipik ve Serolojik Özelliklerinin İncelenmesi, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16(B), 223-229.
- Amend, F.D., Johnson, A.K., Croy, R.T. ve McCarthy, H.D., 1983. Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins, J Fish Dis., 6, 337 - 344.
- Anderson, D.P., 1974, Fish Immunology. T. F. H. Publications, Inc. Ltd. p. 239.
- Arda, M., Seçer, S. ve Sarıeyyüpoğlu, M., 2005. Balık Hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara, 230s.
- Ateşoğlu, A., 1996. Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarının Kuruluşu ve Özellikleri, Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi, 20, 34.
- Austin, B. ve Austin, D.A.,1987.Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish Ellis Harwood Ltd. Chichester, 364 p.
- Austin, B. ve Austin, D.A., 1993. Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish. Second Edition. Ellis Norwood Ltd., New York, London, 381 p.
- Austin, B. ve Cross, N., 1998. Infection of pronephros cell cultures derived from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) with bacterial fish pathogens: a comparison with whole fish infectivity studies, Method Cell Biol., 19, 317-324.
- Austin, B. ve Austin, D.A.,1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish, Second edition. Ellis Horwood Limited Chichester, 457pp.U.K.
- Austin, D.A., Robertson, P.A.W. ve Austin, B., 2003. Recovery of a New Biogroup of *Yersinia ruckeri* from Diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), System. Appl. Microbiol., 26, 127-131.
- Austin, B. ve Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 4. Edition Springer Publishing, New York.

- Aydın, F., Köksal, G., Demir, N., Bekcan, S., Kırkağaç, M., Gözgözoğlu, E., Erbaş, S., Deniz, H., Maltaş, Ö. ve Arpa, H., 2005. Su ürünleri yetiştiriciliği ve politikalar. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, Ocak, Ankara, Bildiriler Kitabı I: 791-801.
- Balows, A., Truper, G.H., Dworkin, M., Harder, W. ve Hleifer, H.K., 1991. The Prokaryotes. 2nd. Edition, Newyork, pp.2687 – 2689.
- Barug, D., Jong, J., Kies, A.K. ve Verstegen, M.W.A., 2006. Antimicrobial growth promoters. Where do we go from here?. Wageningen Academic Publishers. 422 pp.
- Berc, A., Petrinc, Z., Matasfn, Z. ve Kozaric, Z., 1999. *Yersinia ruckeri* septicaemia in experimentally infected Carp (*Cyprinus caprio* L.) fingerlings, Acta Vet Hunga, 47, 2, 161 -172.
- Bruno, D.W. ve Munro, A.L.S., 1989. Immunity in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., Fry Following Vaccination Against *Yersinia ruckeri*, and the Influence of Body Weight and Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) on the Detection of Carriers, Aquaculture, 81, 205-211.
- Bullock, G.L., Shotts, B.E. ve Starliper, C., 1981. Biochemical, serological and virulence studies with *Yersinia ruckeri*, Procc.Fifth Ann. FHS/AFS Workshop, Starkville, MS, pp: 53 - 54.
- Busch, R.A. ve Ling, A.J., 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of Enteric Redmouth Disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), J.Fish Res. Board. Can., 32, 2429-2432.
- Busch, R.A., 1981. The Current Status of Diagnostic Serology for the Major Bacterial Diseases of Fishes. International Symposium on Fish Biologics. Serodiagnostics and Vaccines. Developments in Biological Standardization, 49, 85-96, Wa. USA.
- Busch, R.A., 1982. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: Antigenes of fish pathogens. Development and production of vaccines and serodiagnostics. Symposium International de Tallories. (ed. D. P. Anderson, et al.),. Fondation Marcel Merieux, Lyon, 202 – 223 pp.
- Carson, J. ve Wilson, T., 2002. Yersiniozis in fish, Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures, p: 1-12.
- Cengizler, İ., 2000. Balık Hastalıkları Ders Kitabı, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, Yayın No:7, s: 17, Adana.
- Chettri, J.K., Deshmukh, S., Holten-Andersen, L., Jafaar, R.M., Dalsgaard, I. ve Buchmann, K., 2013. Comparative evaluation of administration methods for a vaccine protecting rainbow trout against *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 infections, Veterinary Immunology and Immunopathology, 154, 42-47.

- Daily, J.G., Griffiths, S.G., Kew, A.K., Moore, A.R. ve Olivier, G., 2001. Characterization of attenuated *Renibacterium salmoninarum* strains and their use as live vaccines. Diseases of Aquatic Organisms, 44,121-126.
- Danley, L.M., Goodwin, E.A. ve Kilian, S.H., 1999. Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*, J Fish Dis., 22, 451 – 456.
- Davenport, J., Black, K., Burnell, G., Cross, T., Culloty, S., Ekaratne, S., Furness, B., Mulcahy, M. ve Tretmeyer, H., 2003. The ecological issues, Aquaculture, Blackwell Publ, USA, 89.
- Davies, R.L. ve Frerichs, G.N., 1989. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas, Journal of Fish Diseases, 12, 357 – 365.
- Demirtaş, T.Y.,2006. Gökkusağı Alabalıklarında Enterik Kızılığız Hastalığına Karşı *Yersinia ruckeri* Serotip I ve Saha Suşlarından Hazırlanan Monovalan ve Polivalan Aşıların Bağışıklık Güçlerinin Karşılaştırmalı İncelenmeleri, Doktora Tezi, A.M.Ü., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Desbordes, P., 1986. Conditions de survie de *Yersinia ruckeri* agent de l'enterosepticemie hémorragique (E.S.H) des salmonides,dans les milieux naturels. Thesis Doct.Vet,Nantes,France Ecole.Nationale-Veterinaire,p.77.
- Deshmukh, S., Raida, M.K., Dalsgaard, I., Chettri, J.K., Kania, P.W. ve Buchmann, K., 2012. Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*),Veterinary Immunology and Immunopathology, 145, 379-385.
- 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., 1981. Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes, Developmental Biological Standardisation, 49, 337-352.
- Ellis, A.E., 1988a. General Principles of Fish Vaccination. In:Fish Vaccination, (ELLIS, A.E., ed.) Academic Press Ltd. 1-19p. London.
- Ellis, A.E., 1988b. Vaccination Againts Enteric Redmouth Disease (ERM) in Fish Vaccination, Academic Pres, London, 85-92.
- Ellis, A.E., 1997. Vaccination Against Bacteria. Fish Vaccination Training Course 14 - 17 April, Netherland.
- Ellis, A.E., 1999. Immunity to Bacteria In Fish, Fish & Shellfish Immunology, 9, 291-308.
- Ellis, A.E., 2001. Innate Host Mechanisms of Fish Against Viruses and Bacteria, Developmental and Comparative Immunology, 25, 827 - 839.

- Emre, Y. ve Kürüm, V., 1998. Havuz ve Kafeslerde Alabalık Yetiştiriciliği Teknikleri, 4, Minpa Matbaacılık Tic. Ltd. Şti., Rüzgarlı Soydaşlar Sk. No: 4/12 Ulus-Ankara.
- Erdal, J.L.. 1989. Vaccination of Atlantik Salmon (*Salmo salar* L.) Against Different Serovar of *Yersinia ruckeri*. In: The IV. Conference of EAFP, Disease of Fish and Shellfish, September, Santiago de Compostela, Book of Abstract: 78.
- Ewing, H.W., Ross, J.A., Brenner, J.D. ve Fanning, R.G., 1978. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium, Int J Syst Bacterid, 28, 1, 37-44.
- Frerichs, N.G. ve Collins,R.O., 1984. Enteric redmouth disease in Scotland. Vet Rec. 14: 45 – 47.
- Frerichs, N.G., Stewart, A.J. ve Collins,R.O., 1985. Atypical infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with *Yersinia ruckeri*, J Fish Dis., 8, 383 -387.
- Furones, D.M., Gilpin, L.M. ve Munn, B.C., 1993. Culture media for the differentiation of isolates of *Yersinia ruckeri*, based on detection of a virulence factor, J Bacteriol, 74, 360-366.
- Giorgetti, G., Ceschia, G. ve Bovo, G., 1985. First isolation of *Yersinia ruckeri* in farmed rainbow trout in Italy. Fish and Shellfish Pathology. Academic Pres London, 161-166.
- Good, M.G., Thorburn, A.M. ve Stevenson, W.M., 2001. Host factors associated with the detection of *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri* in Ontario, Canada goverment fish hatcheries, Prev Vet Med, 49, 165-173.
- Gravningen, B.K.,Kestin, S., Thorarinsson, R. ve Syvertsen, C., 1998. Oral vaccination against enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). The effect of vaccine dose rate on protection against the disease, J. Appl. Ichthyol., 14, 163-166.
- Gudding, R., Lillehaug, A. ve Evensen, Q., 1999. Recent developments in fish vaccinology, Vet. Immunol Immunopathol, 72, 203-212.
- Hietala, J., Valtonen, T.E. ve Aaltonen, T., 1995. Experimental infection of brown trout, *Salmo trutta* L., using a Finnish *Yersinia ruckeri* isolate, Aquaculture, 136, 11 – 20.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sueath, P.H.A., Satley, J.T. ve Williams, S.T., 1994. Bargey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Williams and Witkins, A, Waverly Company, 787.
- Horne, M.T. ve Barnes, A.C., 1999. Enteric redmouth disease. In (eds.Woo, P.T.K., Bruno, D.W.) Fish diseases and Disorders, Vol: 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections, CAB international, 455-477.
- Inglis, V., Roberts, R.J. ve Bromage, N.R., 1993. Bacterial Diseases of Fish, Halsted Pres, New York.

- Iwama, G. ve Nakanishi, T., 1996. The Fish Immun System : Organism , Pathogen And Environment. Academic Press, Sandiego, London, Boston, Newyourk, Sdney, Tokyo, Toronto, 375.
- Janeway, C.A. ve 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., Flynn, J.K. ve Amend, D.F., 1982a. Duration of Immunity in Salmonids Vaccinated by Direct Immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* Bacterins, J. Fish Dis., 5, 207-213.
- Johnson, K.A., Flynn, J.K. ve Amend, D.F., 1982b. Onset of Immunity in Salmonid Fry Vaccinated by Direct Immersion in *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* Bacterins, J. Fish Dis., 5, 197-205.
- Johnson, K.A. ve Amend, D.F., 1983a. Comparison of Efficacy of Several Delivery Methods Using *Yersinia ruckeri* Bacterin on Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson, J. Fish Dis., 6, 331-336.
- Johnson, K.A. ve Amend, D.F., 1983b. Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* Bacterins Applied by Oral and Anal Intubation of Salmonids, J. Fish Dis., 6, 473-476.
- Joosten, P.H.M., Tiemersma, E., Threels, A., Caumartin-Dhieux, C. ve Rombout, J. H.W.M., 1997. Oral Vaccination Of Fish Against *Vibrio anguillarum* Using Alginate Microparticles, Fish & Shellfish Immunology, 7, 471-485.
- Kav, K. ve Erganiş, O., 2007. Balıklarda Aşılama Teknikleri, Vet. Bil. Derg., 21, 2, 95-102.
- Kayis, S., Capkin, E., Altinok, I. ve Balta, F., 2009. Bacteria and bacterial diseases of rainbow trout in the Southern Black Sea Region of Turkey - A Survey, The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh ,61,4, 341-346.
- Kayış, Ş., 2009. Trabzon ve Rize İlleri'nde Bulunan Bazı Alabalık İşletmelerinde Görülen Bakteriyel Hastalıkların Tespiti ve Bazı Etkenlerinin Çoklu PCR İle Teşhisi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Kubilay, A., 1997. Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) patojen bakteri *Yersinia ruckeri*'ye Karşı Antikor Üretimi ve Tespiti Üzerinde Bir Araştırma, Doktora Tezi, S.D.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Lan, M.Z., Peng, X., Xiang, M.Y., Xia, Z.Y., Bo, B., Jie, L., Li, X.Y. ve Jun, Z.P., 2007. Construction and characterization of a live, attenuated esrB mutant of *Edwardsiella tarda* and its potential as a vaccine against the haemorrhagic septicaemia in turbot, *Scophthamus maximus* (L.),Fish and Shellfish Immunology, 23, 521-530.

- Lasee, B.A., 1995. Introduction to Fish Health Management, U.S. Fish and Wildlife Service La Crosse Fish Health Center 555, Lester Avenue Onalaska, Wisconsin, 54650.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K. ve LaPatra, S.E., 2002. DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout, Fish and Shellfish Immunology, 12, 439-453.
- Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview), Fish and Shellfish Immunology, 20, 37-151.
- Marsden, M.J., Vaughan, L.M., Fitzpatrick, R.M., Foster, T.J. ve Secombes, C.J., 1998. Potency testing of a live, genetically attenuated vaccine for salmonids, Vaccine, 16, 1087-1094.
- McCardle, J.F. ve Martin, C.D., 1985. Isolation of *Yersinia ruckeri* Type I (Hagerman strain) from Gold fish *Carassius auratus*, Bull.Eur.Ass.Fish Pathol., 5, 10-11.
- Midtlyng, P.J., 1997. Novel Vaccines & New Vaccination Strategies For Fish, Bulletin Of The European Association Of Fish Pathologists, 17,6 , 239 - 243.
- Minbay, A., 1988. İmmunoloji Ders Notları. Uludağ Üniv. Vet. Fak. Yay., 131s. Bursa.
- Navot, N., Kimmel, E. ve Avtalion, R.R., 2004. Enhancement of antigen uptake and antibody production in goldfish (*Carassius auratus*) following bath immunization and ultrasound treatments, Vaccine, 22, 2660-2666.
- Neary, E.T., Develi, N. ve Yüksel, S.A., 2008. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılan Aşılar, GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi, 25, 2, 29-35.
- Noga, J.E., Levine, F.J., Townsend, K., Bullis, A.R., Carlson, P.C. ve Corbett, T.W., 1998. Kidney biopsy: A nonlethal method for diagnosing *Yersinia ruckeri* infection (enteric redmouth disease) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Am J Vet Res., 49, 3, 363 – 365.
- O'Leary, P.J., Rohovec, J.S. ve Fryer, J.L., 1979. A further characterisation of *Yersinia ruckeri*, Fish Pathology, 14, 71-78.
- Pelczar, M.I., Chan, E.C.S. ve Krieg, N.R., 1986. Microbiology. Bound in Singapura by Forng and Sons Printers Pte. Ltd., 918p. Singapura.
- Petrie, J., Bruno, W.D. ve Hastings, S.T., 1996. Isolation of *Yersinia ruckeri* from wild Atlantic salmon, *Salmo salar.*, In Scotland. Bull.Eur.Ass.Fish Pathol., 16,3, 83 – 84.
- Plumb, J.A., 1999. Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes Iowa State University Press, Ames, IO, USA.
- Post, G., 1987. Bacterial Diseases of Fishes. Textbook of Fish Health. T.F.H. Publications, 41-43p.

- Quentel, C. and Vigneulle, M., 1997. Antigen uptake and immune responses after oral vaccination, Dev Biol Stand., 90, 69-78.
- Raida, M.K. ve Buchmann, K., 2008a. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression, Vaccine, 26, 1050-1062.
- Raida, M.K. ve Buchmann, K., 2008b. Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*, Fish & Shellfish Immunology, 25, 533-541.
- Ribelin, E.W. ve Migaki, G., 1975. The pathology of Fish Fishes The Universty of Wisconsin Press. London.
- Rintamaki, P., Valtonen, T.E. ve Frerichs, N.G., 1986. Occurence of *Yersinia ruckeri* infection in farmed whitefish, *Coregonus peled* Gmelin and *Coregonus muksun* Pallas, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in northern Finland, J Fish Dis., 9, 137-140.
- Roberts, S.M., 1983. A report of an epizootic in hatchery reared rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at an English trout farm, caused by *Yersinia ruckeri*, J Fish Dis., 6, 551 - 552.
- Roberts, R.J. ve Shephard, C.J., 1997. Handbook of Trout and Salmon Disease, Third Edition, Fishing News Boks, A Division of Blackwell Science Ltd., 179.
- Rodgers, J.C., 1991. The usage of vaccination and antimicrobial agents for control of *Yersinia ruckeri*, J Fish Dis., 14, 291 - 301.
- Rodgers, J.C., 1992. Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidomiological studies, J Fish Dis., 15, 243-254.
- Romalde, J.L., Barja, J.L., Magarinos, B. ve Toranzo, A.E., 1994. Starvation-survival processes of the bacterial fish pathogen, *Yersina ruckeri*, Systematic and Applied Microbiology, 17, 161-168.
- Ross, A.J. ve Klontz, G.W.. 1965. Oral Immunisation of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Against the Etiologic Agent of Redmouth Disease, J. Fish Res. Board. Can., 22, 3, 713-719.
- Ross, A.J., Rucker, R.R. ve Ewing, W.N., 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout, Canadian Journal of Microbiology, 12, 763-770.
- Rucker, R.R., 1966. Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Bull. Off. Int. Epizot., 65, 825 - 830.
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants, Aquaculture, 172, 63-92.

- Sanders, E. ve Fryer, J.L., 1988. Bacteria of Fish. In: Methods in Aquatic Bacteriology, (Austin, B., ed.) John Wiley & Sons, Cichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 115-170p.
- Schill, W.B., Bullock, G.L. ve Anderson, D.P., 1989. Serology. In: Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish. (Austin, B. and Austin, D.A., eds.) 98-112.
- Scott, C.J.W., Austin, B., Austin, D.A., Peter, C. ve Morris, P.C., 2013. Non-adjuvanted flagellin elicits a non-specific protective immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) towards bacterial infections, Vaccine, 31, 3262–3267.
- Seven, İ., 2004. Rize İli Sınırları İçerisinde Alabalık Yetiştiriciliği Yapan İşletmelerin Yapısal ve Ekonomik Analizi, Lisans Tezi, KTÜ Rize Su Ürünleri Fakültesi, Rize.
- Skov, J., Kania, P.W., Holten-Andersen, L., Fouz, B. ve Kurt Buchmann, K., 2012. Immunomodulatory effects of dietary β -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*, Fish & Shellfish Immunology, 33, 111-120.
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E. ve Frost, P., 2005. Vaccines for fish in aquaculture, Expert Rev. Vaccines, 4, 1, 89-101.
- Stevenson, R.M. ve Airdrie, W.D., 1984. Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. J Fish Dis., 7, 247 - 254.
- Strøm, H.K., Ohtani, M., Neumann, L., Villumsen, K.R. ve Raida, M.K., 2013. Immersion and bath vaccination against Enteric Redmouth disease (ERM) provides insufficient protection against bath challenge with *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2, Fish & Shellfish Immunology, 34, 1692–1752.
- Tebbit, G.L., Erickson, J.D. ve Vandewater, R.B., 1981. Development and Use of *Yersinia ruckeri* Vaccines to Control Enteric Redmouth Disease In: Anderson, D.P. and Hennessen, W. (ed.). Proceeding of the International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, April, Bildiriler Kitabı: 395-401.
- Temprano, A., Riaño, J., Yugueros, J., González, P., Castro, L., Villena, A., Luengo, J.M. ve 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.
- Timur, G. ve Timur, M., 1985. Eğirdir Gölü Sudak (*Stizostedion lucioperca* L. 1758) Balıklarında Yüksek Mortaliteye Neden Olan Bakteriyel Hemorajik Septisemi Hastalığı Üzerinde Bir Araştırma, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 32, 33-41.
- Timur, M. ve Timur, G., 2003. Balık Hastalıkları Kitabı, TC. İstanbul Üniversitesi Yayınları, Rektörlük Yayın No: 4426, Su Ürünleri Yayın No: 5, 238, İstanbul.

- Tobback, E., 2009. Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Ghent University, Faculty of Veterinary Medicine. Ph.D. Thesis, 155p.
- Tokşen, E., 1999. Ege Bölgesinde Yetiştiriciliği Yapılan Çipura ve Levrek Balıklarının Solungaçlarında Görülen Metazoan Parazitler ve Tedavisi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Toranzo, A.E., Santos, Y. ve Barja, J., 1997. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. Dev Biol Stand, 90, 93- 105.
- Toranzo, A.E., Magarinos, B. ve Romalde, J.L., 2005. A Review of The Main Bacterial Fish Diseases in Mariculture Systems, Aquaculture, 246, 37-61.
- Trust, T.J., 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish, Annual of Review Microbiology, 40, 479-502.
- TÜİK, 2012. T.C. Türkiye İstatistik Kurumu, Su Ürünleri İstatistikleri.
- Valtonen, T.E., Rintamaki, P. ve Koskivaara, M., 1992. Occurrence and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* at fish farms in northern and central Finland, J Fish Dis., 15, 163-171.
- Vinitnantharat, S., 2001. Immunological methods of disease control, Aquatic Animal Health Division, Alparma Inc, 103-109.
- Vuillaume, A., Brun, R., Chene, P. ve Sochon, L.R., 1987. First isolation of *Yersinia ruckeri* from sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt, In South West of France, Bull.Eur.Ass.Fish Pathol., 7, 1, 18.
- Waltman, D.W. ve Shotts, E.B., 1984. A Medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*, Can J Fish Aquat Sci., 41, 804 - 806.
- Williams, M.A. ve Hoole, D., 1995. Immunolabelling of fish host molecules on the tegumental surface of *Ligula intestinalis* (cestoda: Pseudophyllidea), International Journal for Parasitology, 25, 249-256.
- Willumsen, B., 1989. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*, J Fish Dis., 12, 275 -277.
- Yazıcı, M., 2004. Levrek Balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) Pastörellozis'e Karşı Alternatif Aşılama Yöntemleri Üzerine Bir Araştırma, Doktora Tezi, İ.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Yonar, M.E., 2008, *Yersinia ruckeri* İle Enfekte Edilen Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin Tedavisinde Proposilin Kullanılması, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Elazığ.

Zeytun, İ., 1999. Gökkuşığı Alabalıklarında (*O. mykiss* W) Farklı Yersiniozis Aşılarının Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Niğde-Bor'da doğdu. İlköğrenimini Bor'da tamamladı. Lise eğitimini Bor Akın Gönen Anadolu Lisesi, Fen Bilimleri bölümünde tamamlayarak, 2005 yılında girmiş olduğu Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünde Lisans eğitimini 2009 yılında tamamladı. Mezuniyetinden bir yıl sonra 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Lisansüstü eğitime başladı. Halen burada eğitimine devam etmekte olup orta derecede İngilizce bilmektedir.