



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Yüksek Lisans Tezi

**LEVREK BALIKLARINDA (*Dicentrarchus labrax L.*) KARMA
AŞILARA KARŞI OLUŞAN ANTİKOR REAKSİYONUNUN
SEROLOJİK YÖNTEMLERLE TESPİTİ**

Ece SÖNMEZ

Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Su Ürünleri Hastalıkları Programı

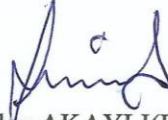
**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülay AKAYLI**

Temmuz, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 11.07.2019 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Yetiştiriciliğı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Su Ürünleri Hastalıkları Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Tülay AKAYLI(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi



Prof. Dr. Jale KORUN
Akdeniz Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Hafize Sibel ÖZESEN ÇOLAK
İstanbul Üniversitesi
Su Bilimleri Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 115O129 numaralı TÜBİTAK 1002-Hızlı Destek projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

"Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca her konuda desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Tülay AKAYLI'ya, değerli katlılarından dolayı jüri üyeleri sayın Prof. Dr. Jale KORUN ve Doç. Dr. H. Sibel ÖZESEN ÇOLAK'a, lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresince her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm değerli hocalarım Araş. Gör. Dr. Çiğdem ÜRKÜ ve Araş. Gör. Dr. Özgür ÇANAK'a, değerli arkadaşım Yüksek Mühendis Sena Zeynep GÜMÜŞÇEKİÇ GÖKEN'e, çalışmada kullandığımız kültür levrek balıklarını temin etmemize yardımcı olan Su Ürünleri Mühendisi Rıza Ertuğrul MUTLU'ya ve Sait BAŞTAŞ'a, çalışmamızda ihtiyacımız olan bakteriyi temin ettiğimiz İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde çalışan sayın Dr. Meriç Lütfü ARSEVER'e teşekkürü borç bilirim.

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca aynı yolda yürüdüğüm, her zaman yardım ve desteklerini gördüğüm sevgili arkadaşlarıma ve son olarak hayattaki en büyük şansım olan, eğitim hayatım boyunca benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen çok kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2019

Ece SÖNMEZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. LEVREK BALIĞI'NIN (<i>DICENTRARCHUS LABRAX</i>) MORFOLOJİK VE BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ	6
2.2. LEVREK BALIKLARINDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL HASTALIKLAR.....	8
2.2.1. Vibriosis	10
2.2.1.1 Hastalığın Etkeni	11
2.2.1.2 Hastalığın Klinik Bulguları	11
2.2.1.3 Hastalığın Teşhisi	12
2.2.1.4 Hastalığın Kontrol ve Tedavisi	12
2.2.2. Pasteurellosis	13
2.2.2.1 Hastalığın Etkeni	14
2.2.2.2 Hastalığın Klinik Bulguları	14
2.2.2.3 Hastalığın Teşhisi	15
2.2.2.4 Hastalığın Kontrol ve Tedavisi	15
2.3 BALIKLARDA BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ	16
2.3.1. Doğal Bağışıklık (Spesifik Olmayan)	16
2.3.2. Kazanılmış Bağışıklık (Spesifik).....	18
2.3.2.1. Humoral Bağışıklık	18
2.3.2.2. Hücresel Bağışıklık	19
2.3.3. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Aşı Kullanımı	20
2.3.3.1 Bakteriyel Balık Aşılı	22

2.4. BAKTERİYEL BALIK HASTALIKLARINDA KULLANILAN SEROLOJİK TEKNİKLER.....	25
2.4.1. Aglütinasyon Teknikleri.....	26
2.4.1.1. <i>Lam Aglütinasyon</i>	26
2.4.1.2. <i>Micro-well Aglütinasyon</i>	27
2.4.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	27
2.4.3. Western Blot Tekniği	28
2.4.4. Floresan Antikor Testi (FAT).....	28
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	30
3.1. MALZEME	30
3.1.1. Balık Materyali Temini	30
3.1.2. Araştırmanın Yapıldığı Yer	30
3.1.3. Balıklardan Kan ve Serum Örneklerinin Elde Edilmesi.....	30
3.1.4. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar, Antiserum ve Konjugatlar.....	31
3.2. YÖNTEM.....	32
3.2.1. Bakteriyolojik Çalışmalar.....	32
3.2.2. Serolojik İnceleme.....	33
3.2.2.1. <i>Lam Aglütinasyon Testi</i>	33
3.2.2.2. <i>Micro-well Aglütinasyon Testi</i>	34
3.2.2.3. <i>Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. BAKTERİYOLOJİK BULGULAR.....	36
4.2. SEROLOJİK BULGULAR.....	42
4.2.1. <i>Lam Aglütinasyon Testi</i> Bulguları	42
4.2.2. <i>Micro-well Aglütinasyon Testi</i> Bulguları	43
4.2.3. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i> Bulguları	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Levrek balığının (<i>Dicentrarchus labrax</i> , L.) dıştan görüntüsü (FAO).....	7
Şekil 3.1: Çiftlik ortamında balıklardan kan alma işlemi.....	31
Şekil 3.2: Çiftlik ortamında balıklardan bakteriyolojik ekimlerin yapımı.....	33
Şekil 4.1: (a) <i>V. anguillarum</i> (V) ve (b) <i>P. piscicida</i> (P) kolonilerinin petrideki (TSA) görünümü.....	37
Şekil 4.2: <i>V. anguillarum</i> (V) ve <i>P. piscicida</i> (P) suşlarının TCBS besiyerindeki görünümü.....	37
Şekil 4.3: Gram-negatif boyanma özelliği gösteren, virgül şekilli <i>V. anguillarum</i> 'a ait bakteri hücrelerinin görünümü (X1000).....	39
Şekil 4.4: Gram-negatif boyanma özelliği gösteren <i>P. piscicida</i> 'ya ait bakteri hücrelerinin görünümü (X1000).....	39
Şekil 4.5: Metil Red (MR) testinde K (kontrol), <i>V. anguillarum</i> (V) negatif (-) ve <i>P. piscicida</i> (P) pozitif (+) reaksiyon sonucu.	40
Şekil 4.6: İndol testinde K (kontrol), <i>V. anguillarum</i> (V) pozitif (+) ve <i>P. piscicida</i> (P) negatif (-) reaksiyon sonucu.	40
Şekil 4.7: ONPG testinde K (kontrol), <i>V. anguillarum</i> (V) pozitif (+) ve <i>P. piscicida</i> (P) negatif (-) reaksiyon sonucu.	41
Şekil 4.8: Sukroz testinde K(kontrol), <i>V. anguillarum</i> (V) pozitif (+) ve <i>P. piscicida</i> (P) negatif (-) reaksiyon sonucu.	41
Şekil 4.9: Aşılanmış balıktaki granümatöz lezyonların görüntüsü.	42
Şekil 4.10: Lam aglütinasyon testindeki reaksiyonun ışıklı mikroskop altındaki görüntüsü. (a) pozitif reaksiyon (<i>V. anguillarum</i>), (b) zayıf reaksiyon (<i>P. piscicida</i>), (c) negatif reaksiyon.	43
Şekil 4.11: <i>V. anguillarum</i> antijenine (V) ait micro-well plağının görüntüsü.	44
Şekil 4.12: <i>P. piscicida</i> antijenine (P) ait micro-well plağının görüntüsü.	44
Şekil 4.13: <i>V. anguillarum</i> antijeniyle kaplı ELISA plağının görünümü.	46
Şekil 4.14: Aşılanmamış ve aşılanmış balıklarda <i>V. anguillarum</i> 'a karşı serumda oluşan antikor titrelerinin aylara göre dağılımı.....	46

Şekil 4.15: <i>P. piscicida</i> antijeniyle kaplı ELISA plağının görünümü.....	47
Şekil 4.16: Aşılanmamış ve aşılanmış balıklarda <i>P. piscicida</i> 'a karşı serumda oluşan antikor titrelerinin aylara göre dağılımı.....	47



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan kültür levrek balıklarının 2000-2017 yılları arası üretim miktarları (ton) (TUIK,2019).	8
Tablo 2.2: Bakteriyel balık aşıları (Sommerset ve diğ., 2005; Andreoni ve Magnani., 2014).....	25
Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan referans bakterilerin ayırt edici karakteristik özellikleri.....	38
Tablo 4.2: <i>V. anguillarum</i> ve <i>P. piscicida</i> ’ya karşı aşılanmış balıkların micro-well testindeki antikor titreleri.	45

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
‰	: Binde
°C	: Derece Santigrat
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
g	: Gram
l	: Litre
mg	: Miligram
nm	: Nanometre
ppm	: Milyonda bir

Kisaltmalar	Açıklama
BSA	: Bovine Serum Albumin
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
FAO	: Food and Agriculture Organization
FAT	: Floresan Antikor Testi
HRPO	: Horseradish peroxydase
IgM	: İmmunoglobulin-M
Mab	: Monoclonal Antibody
NaCl	: Sodyum Klorür
OPD	: Orto-fenilendiamin dihidroklorid
PCR	: Polymerase Chain Reaction
TCBS	: Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar
TSA	: Trypticase (Tryptone) Soy Agar
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LEVREK BALIKLARINDA (*Dicentrarchus labrax* L.) KARMA AŞILARA KARŞI OLUŞAN ANTİKOR REAKSİYONUNUN SEROLOJİK YÖNTEMLERLE TESPİTİ

Ece SÖNMEZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tülay AKAYLI

Bu çalışma ile yurdumuzdaki kültür levrek balıklarının vibriosis ve pasteurellosis gibi bakteriyel hastalıklara karşı direncinin artırılması için geliştirilmiş olan ticari bivalent bir aşının, bir yıl süre ile koruyuculuğu araştırılmıştır. *Vibrio (Listonella) anguillarum* serotip O1 ve *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*'ya karşı bir kez enjeksiyon yöntemiyle aşılaman levrek balıklarında, immün sistemin önemli bir parametresi olan antikor seviyesi, çeşitli serolojik metotlar kullanılarak tespit edilmiştir.

2015-2016 yıllarını kapsayan bir yıllık proje örnekleme süresince Ege Bölgesi'nde bulunan özel bir levrek balığı çiftliğinde 5 defa saha örnekleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu örneklemelemlerde kafeslerde bulunan ağırlıkları 10-100 g arasında değişen 60 adet aşılınmış ve 20 adet aşılınmamış balıktan kan örnekleri alınmıştır. Kontrol ve bakteriyolojik inceleme amacıyla her örneklemede 2'şer adet balığın iç organlarından ekimler yapılmıştır. Daha sonrasında ise alınan kan örnekleri santrifüj edilmiş ve bu serumlar lam aglütinasyon, micro-well aglütinasyon ve Enzim Bağlayıcı İmmunosorbent Deney (ELISA) gibi serolojik yöntemlerde kullanılmıştır.

Aşılınmış balıklarda aşılardan sonraki 4. ayı kapsayan dönemde *V. anguillarum*'a karşı antikor seviyesinin oldukça yüksek olmasına bağlı olarak aşının koruyucu etkisinin bu dönemde yüksek olduğu

(1,17) ancak bir yıllık sürenin sonunda bu etkinin bazı balıklarda yüksek bazı balıklarda ise düşük olduğu (0,7) gözlenmiştir. Bununla birlikte aşılanmış balıkların bir yıllık sürede *P. piscicida* aşısına karşı düşük antikor seviyesi geliştirdiği ve aşının yüksek koruma sağlayamadığı gözlenmiştir. ELISA'nın lam ve mikro-well aglütinasyon yöntemlerine göre daha duyarlı olduğu görülmüştür. Bakteriyolojik incelemeler sonucunda aşı içinde bulunan patojen bakterilerin incelenen balıklardan izole edilmemiş olması, bu bivalent aşının güvenilirliğinin göstergesidir.

Sonuç olarak; yüksek lisans tez çalışması olarak yürütülen bu projede elde edilen veriler doğrultusunda, ülkemizdeki kültür levrek balıklarında kullanılan ticari bivalent aşının *V. anguillarum*'a karşı koruyucu etkisinin, *P. piscicida*'ya göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, incelediğimiz aşılanmış balıklarda pasteurellosise karşı düşük antikor seviyesi gözlenmiş olmasına rağmen bu balıklardan yapılan bakteriyolojik ekimler sonucunda bu patojene rastlanılmamıştır.

Temmuz 2019, 80. sayfa.

Anahtar kelimeler: Kültür levrek balığı, *Dicentrarchus labrax*, bivalent aşı, *V. anguillarum*, *P. piscicida*, seroloji, ELISA, aglütinasyon

SUMMARY

M.Sc. THESIS

DETECTION OF ANTIBODY REACTION OF SEA BASS (*Dicentrarchus labrax* L.) AGAINST COMBINED VACCINE BY SEROLOGICAL METHODS

Ece SÖNMEZ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Aquaculture and Fish Diseases

Supervisor : Prof. Dr. Tülay AKAYLI

With this study, the protection level of a commercial bivalent vaccine which was developed to boost the resistance of cultured sea bass against bacterial diseases such as vibriosis and pasteurellosis, was determined for a one year duration. The antibody level, an important specific immune system parameter which was developed in sea bass samples that were once vaccinated by injection against *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* serotype O1 and *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* was determined by using various serologic methods.

During the one-year field study period between 2015 and 2016, 5 sampling studies were performed in a commercial sea bass farm that is located in the Aegean Region of Turkey. In these sampling studies, blood samples were collected from a total of 60 vaccinated and 20 non-vaccinated fish samples weighing between 10-100 gr that were reared in floating cages. For bacterial investigation, inoculations were made from the internal organs of 2 fish samples in each sampling study. Later, blood samples were centrifuged and sera were used in serologic methods such as slide-agglutination, micro-well agglutination and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

Due to observation of an extremely high antibody level against *V. anguillarum* 4 months after the injection, a high protective level (1,17) was determined in that period, but however, at the end of the one-year period after injection it was also determined that this level is still high in some samples but low (0,7) in some other samples. Besides, during a one year period, a relatively low antibody level was developed against *P. piscicida* and so a low protective level against this bacterium was observed. It was determined that ELISA is a more sensitive method than slide and micro-well agglutination. Pathogen bacterial species that were included in the vaccine were not recovered in bacterial investigations and it is a proof of reliability of this bivalent vaccine.

Depending on the results of this project, which was carried out as a MSc. thesis study, it was observed that the protective level of commercial vaccine used in sea bass cultured in Turkey is higher against *V. anguillarum* than *P. piscicida*. Besides, despite a lower antibody level against pasteurellosis was determined, this pathogen was not recovered in bacterial inoculations.

July 2019, 80 pages.

Keywords: Cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, bivalent vaccine, *V. anguillarum*, *P. piscicida*, serology, ELISA, agglutination

1. GİRİŞ

Bilinçsiz avlanmaya bağlı olarak denizlerden elde edilen doğal su ürünleri stoklarının hızla azalması nedeni ile dünyada ve yurdumuzda deniz balığı yetiştiriciliği gün geçtikçe önem kazanmış ve büyük bir büyüme göstermiştir (Çelikkale, 1999; Alpbaz, 2005). Levrek balığı (*Dicentrarchus labrax* L.) teleost balıkların Moronidae familyasının *Dicentrarchus* genusuna mensup bir balık türüdür (Froese ve Pauly, 2019). Bu balıklar Atlantik okyanusunda Fas kıyılarından Baltık Denizi'ne kadar uzanan geniş bir alanda yayılım göstermektedir. Akdeniz kıyılarında da var olan bu tür ülkemizin tüm sularında yaşamaktadır (Barnabé, 1990; Çelikkale ve diğ., 1999). Levrek balığı yetiştiriciliği su ürünleri sektörünün gelişmiş olduğu Avrupa ülkelerinde yumurtadan pazara kadar olan dönemleri ile ticari anlamda yaygınlık kazanan ilk deniz balığı türüdür (Hoşsucu ve diğ., 1990; Alpbaz, 2005). Su ürünleri yetiştiriciliğinin yurdumuzda gelişimine bağlı olarak levrek balığının kültürü üzerindeki çalışmalar 1980'li yıllarda başlamış ve gelişen kafes teknolojisine bağlı olarak bu balığın üretiminde büyük bir artış görülmüştür (Çelikkale, 1999; Alpbaz, 2005; Memiş, 2010).

Balıkların yaşadığı sucul ekosistemde fırsatçı ve patojen olmak üzere iki farklı bakteri grubu doğal olarak bulunmaktadır. Fakat bu bakteriler yetersiz oksijen seviyesi, su kirliliği ve stres gibi olumsuz faktörleri içeren ve yoğun olarak su ürünleri yetiştiriciliğinin yapıldığı ortamlarda hastalığa neden olmaktadır (Buller 2004; Austin ve Austin, 2016). Kültür balıklarında aniden ortaya çıkan ve sepsisemik enfeksiyona neden olan bakteriyel hastalıklar su ürünleri sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Kissil ve diğ., 2000; Buller 2004; Noga, 2010; Austin ve Austin, 2016). Son yıllarda yetiştiriciliğinde büyük artış görülen levrek balığında karşımıza çıkan en büyük ekonomik kayıplar vibriosis ve pasteurellosis gibi bakteriyel hastalıklardan kaynaklanmaktadır (Toranzo ve Barja; 1990, Bakopoulos ve diğ., 1995; Korun ve diğ., 2005; Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2016). *Vibrio anguillarum* ve *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*'nın neden olduğu enfeksiyonlar önceleri farklı antibiyotiklerle kolayca kontrol altına alınabilmiş, ancak daha sonra antibiyotiklerin uzun süre ve bilinçsiz kullanımına bağlı olarak bakterilerde direnç plazmidleri (R-plasmid) geliştirmesi yanı sıra suda kirlilik oluşturmaları, balıkta kalıntı bırakması ve bu haldeki balıkların tüketilmesinin insan sağlığı için zararlı hale gelmesi gibi bir çok olumsuzlukları da beraberinde getirmiştir (Bakopoulos ve diğ., 1995; Magarinos ve diğ., 1996; Thyssen ve Ollevier, 2001).

Bu yüzden hastalıkların kontrolünde aşılar, probiyotikler, immunostimulanlar gibi farklı koruyucu önlemlerin uygulanması hastalığın ilaçla tedavisinden daha cazip hale gelmiştir (Magnadottir, 2010; Gudding ve Goodrich, 2014).

Vibriosis; *Vibrio* cinsi bakterilerin neden olduğu, deniz ve acısu balıklarında çok sık görülen kronik veya akut seyreden önemli bir bakteriyel hastalıktır (Snieszko ve Axelrod, 1971; Inglis ve diğ., 1993; Actis ve diğ., 1999, Kent ve Poppe, 2002). Hastalığın en önemli etkeni *V. anguillarum* (*Listonella. anguillarum*) adlı bakteridir ve bu patojen 48'den fazla farklı balık türünde hastalık oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu bakterinin 23 adet serotipi bulunmuştur (Pedersen ve diğ., 1999a; Austin ve Austin, 2016). Bunların farklı toksin üretmesi nedeni ile meydana getirdikleri enfeksiyonların tedavisi ve kontrolü de zorlaşmaktadır (Actis ve diğ., 1999). Ülkemizde ise bu bakteri farklı araştırmacılar tarafından yetiştiriciliği yapılan kültür levrek balıklarından izole edilmiş ve bu etkenin işletmelerde ciddi kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Çağırğan, 1993; Korun ve Timur, 2005; Demircan ve Candan, 2006).

Pasteurella piscicida'nın neden olduğu pasteurellosis doğadaki ve kültürü yapılan deniz balıklarını tehdit eden önemli bakteriyel hastalıklardan olup hastalık pseudotüberkülozis olarak da adlandırılır (Magarinos ve diğ., 1996; Austin ve Austin, 2016). Hastalık etkeni sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*), kültür çipura (*Sparus aurata*) ve levrek balıklarında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Christofilogiannis, 1993; Çağırğan, 1993; Candan ve diğ., 1996; Magarinos ve diğ., 1996, Kawakami ve Sakai, 1996, Timur ve diğ., 1999). Ülkemizde ise kültürü yapılan levrek balıklarında pasteurellosis hastalığının görüldüğüne dair çeşitli çalışmalar mevcuttur (Çağırğan, 1993; Candan ve diğ., 1996; Timur ve diğ., 1999; Korun ve Timur, 2005).

Balık hastalıkları yetiştiricilik için önemli bir konudur. Üretim süresince hastalıklardan korunmak için işletmede optimum yetiştiricilik koşullarının sağlanması, hijyen kurallarına dikkat edilmesi, aşı ve immunostimulanların kullanılmasına bağlı olarak balığın bağışıklık sisteminin geliştirilmesi tavsiye edilmektedir (Timur ve Timur, 2003; Candan ve Karataş, 2010; Roberts, 2012). Balıkların bağışıklık sistemi diğer omurgalılarda olduğu gibi, spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sistemi olarak iki temel gruba ayrılmaktadır. Spesifik bağışıklık cevabın gelişimi canlılarda aşılama uygulamasının temel prensibini oluşturur ve aşılarda kullanımı bakteriyel balık hastalıklarından korunmak için oldukça etkili bir yöntemdir (Anderson, 1974; Ellis, 1999; Magnadottir, 2010).

Günümüzde kültür deniz balıklarında görülen vibriosis ve pasteurellosis gibi bakteriyel hastalıklara karşı geliştirilen ve spesifik bağışıklık sistemini uyaran etkili ticari aşılar yaygın olarak kullanılmaktadır (Dos Santos, 2000; Bakopoulos ve diğ., 2003). Balık yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde ticari balık aşılarının uygulanması ile balığın bağışıklık sisteminin uyarılması, hastalıklara karşı spesifik antikorların üretilmesi, antibiyotik kullanımının kısıtlanması, balıklarda kayıp miktarının azalması ile üretimde artış ve kalitenin yükseltilmesine bağlı olarak üretim maliyetinin düşürülmesi mümkün olmaktadır (Van Muiswinkel, 2008; Candan ve Karataş, 2010; Magnadottir, 2010).

Balıklarda banyo, enjeksiyon ve oral yolla olmak üzere farklı aşılama yöntemleri uygulanmaktadır (Ellis, 1988; Joosten ve diğ., 1997; Midtlyng, 1997). Kullanılan balık aşıları önceleri tek bir patojeni hedef alırken (monovalent), gelişen aşı teknolojileri sayesinde birden fazla patojeni hedef alan karma aşılar (bivalent) da kullanılmaktadır (Ellis, 1999; Galeotti ve diğ., 2013; Marana ve diğ., 2019).

Vibriosis aşıları morina (*Gadus morhua*), sazan (*Cyprinus carpio*), salmonid ve yılan (*Anguilla anguilla*) ve yassı balıklar gibi çok sayıdaki balık türünde etkili olarak kullanılmaktadır (Knapspskog ve diğ., 1993; Joosten ve diğ., 1997; Mikkelsen ve diğ., 2007, Sheng ve diğ., 2019). Pasteurellosis'in önlenmesinde de araştırmacılar kendi üretmiş oldukları aşılar yanı sıra ticari aşılarda etkinliğini tespit etmek için levrek ve çipura balıklarında bir çok çalışma yapmışlardır (Magarinos ve diğ., 1994; Magarinos ve diğ., 1999; Dos Santos, 2000; Dos Santos, 2001; Bakopoulos ve diğ., 2003).

Gravningen ve diğ. (1998) levrek balıklarında görülen vibriosis ve pasteurellosis hastalıklarına karşı bu proje kapsamında incelenen, yurtdışındaki ticari bir firmanın ürettiği ve *V. anguillarum* serotip O1 ve *P. piscicida*'ya karşı geliştirilen bivalent aşılarda yavru levrek balıklarındaki koruyucu etkisini deneysel olarak araştırmışlardır. Galeotti ve diğ. (2013) ise ergin levrek balıklarında farklı bir firmanın ürettiği *V. anguillarum* serotip O1 ve O2'ye karşı hazırlanan vibriosis aşısının etkisini araştırmıştır. Karma aşılarda ilgili olarak Bakopoulos ve diğ. (2017) çipura balığında *V. anguillarum* O1 ve *Photobacterium damsela* supbs. *piscicida* patojenleri içeren aşılarda etkisini incelerken, Marana ve diğ. (2019) ise çalışmalarında gökkuşağı alabalıklarında *V. anguillarum*, *A. salmonicida* ve *Y. ruckeri* patojenlerini içeren aşılarda etkisini mukayese etmişlerdir. Kültürü yapılan levrek balıklarında ise *V. anguillarum* ve *P. piscicida*'ya karşı farklı araştırmacıların da çalışmaları mevcuttur (Mosca ve diğ., 2014;

Spinos ve diğ., 2017). Yurdumuzda ise Çamlıbel (2002) ve Yazıcı (2004) levrek yavrularında, Ekici ve Diler (2010) ve Altınok ve diğ. (2013, 2014) ise gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *V. anguillarum*'a karşı yeni aşı geliştirilmesi üzerine deneysel çalışmalar yapmışlardır. Yazıcı ve Candan (2006) ise karada bulunan bir levrek işletmesinde kurdukları deneysel düzenek ile balıklarda ticari olarak temin ettikleri pasteurellosis aşısının etkisini farklı aşılama yöntemlerini kullanarak (banyo, enjeksiyon ve oral) karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır.

Bilim insanları aşılannmış balıklarda gelişen antikor seviyelerinin tespiti için farklı serolojik teknikleri kullanarak aşının etkinliğini araştırmışlardır (Knappskog ve diğ., 1993; Mikkelsen ve diğ., 2007). 1960'lı yıllardan bu yana kullanılan farklı aglütinasyon çeşitleri ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibi serolojik yöntemler balık patojenlerinin teşhisinde, balık serumlarında spesifik patojenlere karşı oluşan antikorların tayininde, aşılarn geliştirilmesinde ve serotiplendirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Del Pozo, 2005; Timur ve Timur, 2003). Farklı araştırmacılar balık patojeni olan *V. anguillarum*'un teşhisi ve serotiplendirmesi yanı sıra aşının etkinliğinin tespitinde bu teknikleri tercih etmişlerdir (Schill ve diğ., 1989; Sorensen ve Larsen, 1986; Toranzo ve diğ., 1987; Knappskog ve diğ., 1993). Andreoni ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada *P. piscicida* aşısının levrek balıklarındaki koruyucu etkisini ELISA'yı kullanarak araştırmışlardır. Yurdumuzda ise bu tekniğı Akaylı (2001) kültür çipura balıklarında vibriosisin teşhisinde tercih ederken Kubilay (1997) gökkuşağı alabalıklarında yersiniosis'e karşı geliştirdiğı aşının etkinliğinin tespitinde kullanmıştır.

Kültür balıklarında uygulanan aşılama çalışmalarında başarı sağlamak için; balığın bağışıklık sistemi ile patojen bakteri arasındaki ilişkinin anlaşılması ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. İdeal bir aşı güvenli, yeterli, kolay üretilebilir ve kolay uygulanabilir, ölümleri önlemede etkili olmalı ve uzun süreli koruma sağlamalıdır (Anderson, 1974; Evelyn, 1997; Leong ve diğ., 1997; Sommerset, 2005). Yurdumuzda daha önceki yıllarda yapılan kültür balıklarındaki aşılama çalışmaları incelendiğinde bu çalışmaların daha çok laboratuvar ortamında deneysel boyuttaki çalışmaları kapsadığı gözlenirken; havuz veya kafes ortamı doğal ortamda yetiştirilen kültür tatlı su ve deniz balıklarında (levrek balığı gibi) kullanılan ticari aşılarn etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliğı sektörünün önde gelen firmalarının yetkilileri çalıştay ve kongre gibi bilimsel

toplantılarda yurt dışından getirtmiş oldukları ticari balık aşılarının güvenilirliği ile ilgili şüphe duyduklarını belirtmiş ve bu aşların uzun süreli koruyucu etkisinin olup olmadığı ile ilgili üniversitelerden bilimsel anlamda desteğe ihtiyaç duyduklarını ifade etmişlerdir.

Bu çalışma ile Ege Bölgesi'ndeki özel sektöre ait bir kültür levreği işletmesinde bulunan, *V. anguillarum* serotip O1 ve *P. piscicida*'ya karşı hazırlanan ticari bivalent aşının enjeksiyon yöntemi ile uygulandığı levrek balıklarında gelişen bağışıklık sisteminin göstergesi olan antikor seviyesinin farklı serolojik yöntemler (lam aglütinasyon, micro- well aglütinasyon ve ELISA) kullanılarak ölçülmesine bağlı olarak aşının bir yıllık sürede koruyucu etkisi araştırılmıştır. Aşılanmış balıklardan yapılacak olan bakteriyolojik incelemeler sonucunda aşların içinde bulundurduğu patojen bakterilerin izole edilip edilmemesi de aşının güvenilirliğinin belirlenmesinde çalışmamıza ışık tutarken ülkemizde ticari olarak kullanılan bivalent bakteriyel aşların etkinliğinin kapsamlı bir şekilde ortaya çıkarılmasında gösterge olacaktır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasından elde edilen veriler doğrultusunda yurdumuzda kültürü yapılan levrek ve çipura gibi deniz balıklarında risk teşkil eden vibriosis ve pasteurellosis hastalıklarına karşı geliştirilmiş olan ticari bivalent aşının etkinliğinin ve güvenilirliğinin tespit edilmesi ile aşılama çalışmalarının geliştirilmesine olumlu katkıda bulunulması hedeflenmektedir. Böylece ülkemizde özellikle yavru ve pazar boyundaki kültür levrek balıklarında ciddi ekonomik kayıplara neden olan bu hastalıkların önlenmesine çalışılacaktır. Bu tez çalışması verileri ile yurdumuzdaki yetiştiricilik sektörüne katkı sağlanması yanı sıra daha sonraki yıllarda bu konu ile ilgili yapılacak yurtiçi ve yurtdışındaki çalışmalara ışık tutması da hedeflenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. LEVREK BALIĞI'NIN (*Dicentrarchus labrax*) MORFOLOJİK VE BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Deniz levreği dünyada Kuzey Atlantik'ten tüm Akdeniz'e kadar yaygın olan balık türüdür (FAO, 2019). Lateral olarak hafifçe yassılaşmış bir vücut yapısına sahip olan bu balığın sırtı metalik maviden yeşilimsi gri renge kadar değişiklik gösterir. Yanları gümüşü, karın kısmı ise beyazdır. Vücudu düzgün hatlı olan bu balık ctenoid pullarla örtülüdür. Sırtta diken ve yumuşak şualı olmak üzere iki dorsal yüzgeci bulunur. Dik dorsal yüzgeç sekiz ya da dokuz diken şualı olup ikinci dorsal yüzgeç yumuşak şualıdır. Tek olan anal yüzgeç üç kuvvetli dikene, operkular ve preoperkular kemikleri ise keskin dikenlere sahiptir (Benegal, 1972; Barnabé, 1990). Levrek balıklarında solungaç kapağının üst kısmında siyahımsı bir benek vardır. Genç bireylerin vücudunda bulunan siyah benekler balık yaşlandıkça kaybolur. Boyları 1m'ye kadar ulaşabilir (Barnabé, 1990; Alpbaz, 2005). Levrek balığı Perciformes ordosunun Moronidae familyasının *Dicentrarchus* genusuna mensuptur (Froese ve Pauly, 2019). Ülkemizde boyları 40 cm'ye kadar ulaşabilen bu balığın sistematikteki yeri aşağıda gösterilmiştir (Froese ve Pauly, 2019) (Şekil 2.1).

Levrek balığının sistematikte yeri (Froese ve Pauly, 2019)

Regnum: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Üst sınıf: Gnathostomata

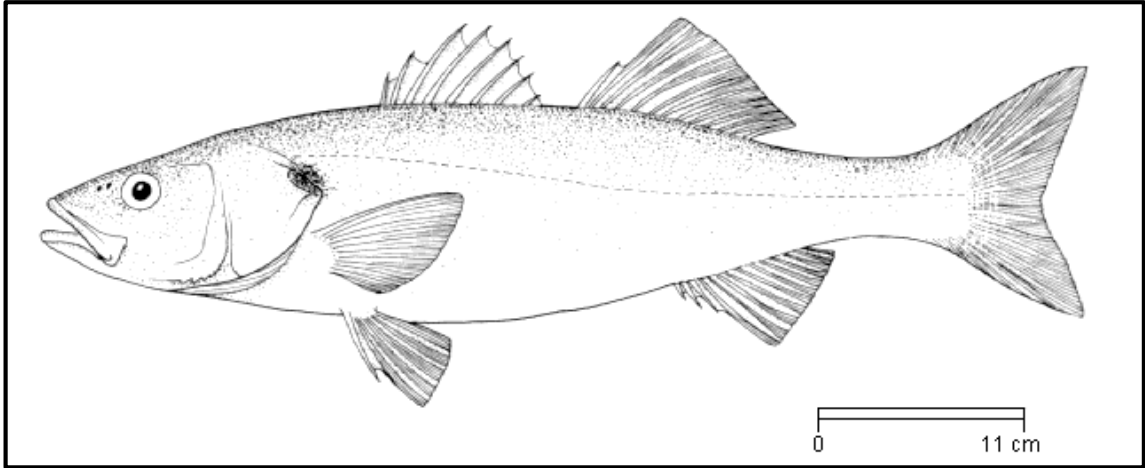
Sınıf: Actinopterygii

Ordo: Perciformes

Familia: Moronidae

Genus: *Dicentrarchus*

Species: *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)



Şekil 2.1: Levrek balığının (*Dicentrarchus labrax*, L.) dıştan görüntüsü (FAO).

Karnivor bir balık olan deniz levreği genç dönemlerinde kabuklulardan Crangon gibi küçük karidesler, Gammarus gibi küçük amphipodlar ve Ligia gibi isopodlarla, ergin dönemlerinde ise sardalya, hamsi, kaya balığı gibi balıkların yanı sıra yengeç, karides, kafadan bacaklılardan sübye ve kalamar gibi omurgasız hayvanlarla beslenirler (Barnabé, 1990; Alpbaz, 2005). Levrek balığının ağzı geniştir, damak (palatinum) ve dilde dişleri bulunur (Barnabé, 1990). Kumlu, çamurlu sığ biyotoplarda sıcaklığa ve tuzluluğa gösterdiği tolerans ile nehir ağzlarında ve lagünlerde yaşayan, havaların soğumasıyla birlikte derin sulara göç eden levrek balıkları 2-32°C arasındaki su sıcaklıklarında yaşar ve 11-14°C su sıcaklığında yumurta bırakırlar. Doğada bu su sıcaklığına bağlı olarak Eylül ayında yumurtlama başlar, mart ayı başlarına kadar devam eder. Levrek balıklarında optimum büyüme sıcaklığı ise 20-25°C arasındadır (Alpbaz, 2005).

Ayrı eşeyli olan levrek balıklarında erkek balıklar hayatlarının ikinci yılından itibaren sperm vermeye başlarken, dişiler ancak üçüncü yılda yumurta bırakırlar. Dişi balıklarda burun yapısı daha sivridir ve vücutları daha geniş yapılıdır. Erkekler ise ince uzun vücutludur. Dişi levrek balıkları yumurtlama döneminde bir kaç saat içinde tüm yumurtalarını dökerler, Akdeniz’de yumurtlama işlemi ocak-mart ayları arası gerçekleşir (Barnabé, 1990; Alpbaz, 2005). Levrek balığı ile ilgili ilk yetiştiricilik çalışmaları Fransa’da yapılmıştır. Günümüzde levrek balığı İspanya, Portekiz, Yunanistan ve Türkiye gibi diğer Akdeniz ülkelerinde yumurtadan pazar boyuna kadar yetiştiriciliğini içeren geniş bir endüstri kolu haline gelmiştir (Barnabé, 1990; Alpbaz, 2005). Ekstansif, yarı entansif ve entansif olarak yapılan levrek yetiştiriciliği ülkemizde ilk olarak 1980’li yılların ortalarında doğadan toplanan yavruların kafeslerde büyütülmesi şeklinde başlamıştır (Alpbaz, 2005). Tablo 1.’de de belirtildiği gibi TUIK

verilerine göre yurdumuzdaki deniz kafeslerinde 2018 yılında 116,915 ton levrek üretimi yapılmıştır (TÜİK, 2019).

Tablo 2.1: Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan kültür levrek balıklarının 2000-2017 yılları arası üretim miktarları (ton) (TÜİK,2019).

Yıllar	Üretim Miktarları (ton)
2000	17.877
2001	15.546
2002	14.339
2003	20.982
2004	26.297
2005	37.290
2006	38.408
2007	41.900
2008	49.270
2009	46.554
2010	50.796
2011	47.013
2012	65.512
2013	67.913
2014	74.653
2015	75,164
2016	80,847
2017	99,971
2018	116,915

2.2. LEVREK BALIKLARINDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL HASTALIKLAR

Balık sağlığı ile uğraşan bilim insanları hasta kültür levrek balıklarında hastalık etkeni olarak daha çok Gram-negatif balık patojenlerinin varlığını rapor etmişlerdir. Denizde kültürü yapılan levrek balıklarında vibriosis ilk olarak Breuil ve Haffner tarafından (1989) güney Fransa’da bildirilmiştir. Ülkemizde vibriosis ilk olarak Ege kıyılarındaki işletmelerde yetiştiriciliği yapılan çipura balıklarında tanımlanmıştır (Candan, 1993; Akaylı, 2001). Yurdumuzda kültür levrek balıklarında vibriosis'e neden olan *Vibrio* türleri arasında *V. anguillarum* (Çağırman ve Yürekli Türk, 1996; Akan ve diğ., 1996; Korun, 2004; Demircan, 2004; Demircan ve Candan, 2006; Korun, 2006; Korun ve Timur, 2008); *Vibrio ordalii* (Timur ve diğ., 2007), *V. harveyi* (Korun ve Timur, 2008) ve *V. alginolyticus* (Korun ve Timur, 2008) çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Pasterullosis ilk defa 1963 yılında Amerika'nın doğu kıyılarındaki beyaz levrek (*Morone americanus*) ve çizgili levrek (*M. saxatilis*) balıklarında yoğun olarak ölümlere neden olmuştur (Snieszko ve diğ., 1964; Janssen ve Surgalla, 1968). *P. piscicida* çipura, levrek, çizgili levrek, sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*) ve dil balıklarında; *Pasteurella skyensis* ise sadece Atlantik salmon balıklarında bu hastalığın etkeni olarak bildirilmiştir (Toranzo ve diğ., 2005). Ülkemizde pasteurolosis Timur ve diğ. (1999) tarafından Yalova'daki bir kamu işletmesinde kültürü yapılan dokuz aylık levrek balıklarında *Ichthyophonus hoferi* ile birlikte karma enfeksiyon şeklinde ölümlere neden olduğu; kuzey Ege denizinde yetiştirilen levrek balıklarında Candan ve diğ. (1996) tarafından, daha sonra da Ege denizinde yetiştirilen levrek balıklarında düşük su sıcaklığında Korun ve Timur (2005) tarafından bildirilmiştir.

Mycobacteriosis; subakuttan kroniğe kadar değişik formlarda görüldüğü bildirilen bir hastalıktır (Toranzo ve diğ., 2005). *Mycobacterium marinum*'dan kaynaklanan mycobacteriosis günümüze kadar kültür levrek, kalkan (*Scophthalmus maximus*) ve Atlantik salmon balıklarında bildirilmiştir (Toranzo ve diğ., 2005). Balık tüberkülozuna neden olan *M. marinum*, Akdeniz'de kültürü yapılan levrek balıklarında ve Kızıldeniz'de İsrail kıyılarındaki kültürü yapılan levrek balıklarında önemli bir tehdit olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Colorni ve diğ., 1993; Colorni ve diğ., 1996). İsrail'in yanı sıra Akdeniz'de kültür levrek balıklarında Yunanistan ve İtalya'da (Colorni, 1992; Sechi ve diğ., 2002) balık tüberkülozu bildirilmiştir. Yurdumuzda ise kültür levrek balıklarında yapılan histolojik çalışmalar ile hastalık bildirilmiştir (Korun ve diğ., 2005).

Rickettsia-benzeri organizmalar levrek balıklarında ilk olarak 1994 yılında Güney Fransa'da rapor edilmiştir. 30-70 g ağırlığa sahip anormal yüzme hareketi gösteren ölmek üzere olan juvenil hasta balıklarda %20 oranında ölüm oranı bildirilmiştir (Comps ve diğ., 1996). Levrek balıklarında ikinci rapor Yunanistan'dan bildirilmiştir (Athanassopoulou ve diğ., 1999). Ülkemizde ilk olarak 2003 yılında Karadeniz kıyılarındaki yüzer kafeslerde yetiştiriciliği yapılan levrek balıklarında *V. anguillarum* veya *P. piscicida* birlikte karma enfeksiyon olarak bu hastalık bildirilmiş olup daha sonra Ege Denizi'nde bir işletmedeki kültür levrek balıklarında da yoğun ölümlere neden olduğu tespit edilmiştir (Timur ve diğ., 2005; Timur ve diğ., 2013).

Streptococcosis doğadaki çeşitli balıklarda ve kültür balıklarında yaygın bir şekilde görülen önemli bir hastalıktır (Romalde ve Toranzo, 1999; Romalde ve Toranzo, 2002). *Streptococcus iniae* sarıkuyruk, levrek, asya levreği (*Lates calcarifer*) ve pisi balıklarında (*Scophthalmus*

rhombus); *Streptococcus parauberis* kalkan; *Streptococcus phocae* ise Atlantik salmon balıklarında bu hastalığın etkeni olarak bildirilmiştir (Toranzo ve diğ., 2005). Balıklarda görülen streptococ enfeksiyonlarının ana etiyolojik etkenlerinden biri olan *S. iniae*'nin Akdeniz'de ve Kızıldeniz'de İsrail kıyılarında kültürü yapılan levrek balıklarında hastalığa neden olduğu ilk olarak Colorni ve diğ. (2002) tarafından rapor edilmiştir. Ülkemizde ise kültürü yapılan sinarit (*Dentex dentex*) ve granyöz (*Argyrosomus regius*) balıklarında *Enterococcus aquimarinus* ve *E. casseliflavus*'un neden olduğu streptococcosis (Ürkü, 2017), levrek balıklarında *Lactococcus garvieae* (Göken, 2016), çipura ve levrek balıklarından *Staphylococcus epidermidis* (Kubilay ve Uluköy, 2004) ve diğer *Staphylococcus* spp. türlerinin staphylococcosise neden olduğu rapor edilmiştir (Çanak ve Timur, 2017).

Timur ve diğ. (2007) Karadeniz'de kültürü yapılan levrek balıklarında ölümlere neden olan eritrositik inkulüzyon cisimcik (EIB) sendromu gösteren balıklarda *V. anguillarum*, *P. piscicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *V. damsela*, *A. sobria* gibi bakteriyel balık patojenlerinden bir veya birkaçının yanı sıra inceledikleri bazı balıklarda *Staphylococcus epidermidis*'i de izole etmişlerdir. Ayrıca yurdumuzdaki hasta kültür levrek balıklarında farklı araştırmacılar *A. hydrophila* (Şahrikoğlu ve Candan, 2002), *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (Karataş ve diğ., 2005), *Shewanella putrefaciens* (Korun ve diğ., 2009) ve *Tenacibaculum maritimum*'u da bildirmişlerdir (Timur ve diğ., 2007; Yardımcı, 2011).

2.2.1. Vibriosis

Vibriosis; *Vibrio* cinsi bakterilerin neden olduğu, deniz ve acısu balıklarında çok sık görülen kronik veya akut seyreden önemli bir bakteriyel hastalıktır (Snieszko ve Axelrod, 1971; Inglis ve diğ., 1993; Actis ve diğ., 1999; Kent ve Poppe, 2002). Vibriosis'e neden olan *V. anguillarum* ilk kez Bergman tarafından 1909 yılında Baltık Denizi'ndeki hasta yılan balıklarının patojeni olarak bildirilmiştir. Bu bildirimden önce, Canestrini (1893), 1817 yılından beri göç eden yılan balıklarında (*Anguilla vulgaris*) görülen epizootikleri tanımlayarak, Gram-negatif, basil şeklinde ve hareketli olan bu bakteriyi *Bacillus anguillarum* olarak bildirmiş ve hastalığın patolojisi yanı sıra bakterinin karakteristik özelliklerinin aynı olduğunu bildirmiştir (Austin ve Austin, 2016). Daha sonraki yıllarda literatürlerde etkenin adı *Beneckea anguillara* biyotip I olarak da geçmektedir. 1985 yılında McDowell ve Colwell adlı araştırmacıların yapmış olduğu rRNA filogenetik çalışmaları sonucunda bu bakteri adının *Listonella anguillarum* olarak isimlendirilebileceği belirtilmiş olsa da, birçok araştırmacı bu bakterinin *V. anguillarum* olarak

Vibrio genusu içinde yer almasını uygun bulmaktadır (Actis ve diğ., 1999; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2016).

2.2.1.1 Hastalığın Etkeni

Hastalığın başlıca etkeni *V. anguillarum* adlı bakteridir ve bu patojen 48'den fazla farklı balık türünde hastalık oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu bakterinin 23 adet serotipi bulunmuştur (Pedersen ve diğ., 1999; Austin ve Austin, 2016). Bunların farklı toksin üretmesi nedeni ile meydana getirdikleri enfeksiyonların tedavisi ve kontrolü de zorlaşmaktadır (Actis ve diğ., 1999). *V. anguillarum* serotip O1 başlıca salmonid balıkların ve kalkan balıklarının (*Psetta maxima*) patojeni, serotip O2 ise salmonid balıkların ve deniz balıklarının yaygın patojeni olarak bildirilmiştir (Myhr ve diğ., 1991; Knappskog ve diğ., 1993; Larsen ve diğ., 1994). Denizde kültürü yapılan levrek balıklarında vibriosis ilk olarak Breul ve Haffner tarafından (1989) Güney Fransa'da bildirilmiştir. Ülkemizde ise bu bakteri farklı araştırmacılar tarafından yetiştiriciliği yapılan kültür levrek balıklarından izole edilmiş ve bu etkenin işletmelerde ciddi kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Çağırğan, 1993; Korun ve Timur, 2005; Demircan ve Candan, 2006).

V. anguillarum aynı zamanda deniz ortamında doğal olarak var olan bir bakteridir. Denizde su sıcaklığı 10 °C'nin üstüne çıktığında, çözülmüş oksijen yetersizliğinde, yoğun stok nedeniyle balıklarda stres geliştiğinde, hijyen yetersizliğinde görüldüğü rapor edilen bu patojenin tatlı suda ise 1-4 °C gibi düşük sıcaklıklarda görüldüğü bildirilmiştir (Snieszko ve Axelrod, 1971; Kent ve Poppe, 2002; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2016). Patojen bakterinin yaz ayları boyunca sağlıklı balığın mukus, solungaç ve bağırsağından olduğu kadar sudan, sedimentten ve planktondan da bol miktarda izole edilmiştir. Bununla beraber bu çevresel izolatların çoğunlukla balık için patojen olduğu ve denizde 50 aydan daha uzun süre hayatta kalabildiği ve çoğalabildiği bildirilmiştir (Actis ve diğ., 1999; Pedersen ve diğ., 1999; Noga, 2010).

2.2.1.2 Hastalığın Klinik Bulguları

Vibriosisde ölüm oranı genellikle yüksektir, öncelikle perakut vakalarda %80'e ulaşır. Hatta tedavi uygulandığında %10-20 kayıp genellikle görülür, akut vakalarda ölüm oranı birkaç gün içinde gelişirken kronik hastalık çıkışlarında daha uzun sürede ölüm oranı görülür. Ölüm oranı çoğunlukla stok yoğunluğu yüksek olduğunda daha yüksektir (Bruno ve diğ., 1997). Vibriosisde

görülen eksternal belirtiler diğer Gram-negatif bakterilerin oluşturduğu bulgulara benzerlik gösterir. Enfekte balıkların yüzgeç diplerinde, ağız içinde, alt çenede, alt çene olukları boyunca, operkulum ve anüs etrafında kızarıklık (eritem) görülür. Furunkulden farklı olmayan çıban şeklindeki lezyonlar deri altında ve kaslarda olabilir. Çıban şeklindeki bu lezyonlar dışarı açılabilir ve nekrotik deri büyük açık yaralar bırakarak kopup ayrılır. Hastalığın internal belirtileri arasında periton ve viseral organlarda peteşi ve eritem bulunur. Bağırsaklar genellikle kızarık ve sıvı ile doludur. Kasların kesit yüzeyleri peteşiyal hemorajiden büyük kırmızı çıban benzeri lezyonlara kadar değişen farklı lezyonlar gösterir (Post ve diğ., 1987; Austin ve Austin, 2016).

2.2.1.3 Hastalığın Teşhisi

Tahmini teşhis; virgül şekilli bakterilerin haemopoietik dokularda (böbreğin ön bölgesi ve dalakta) görülmesi ile yapılır. Uygun kültür vasatlarında koloniler elde edilir. Biyokimyasal testler ve sero-aglütinasyon ile teşhis edilir. Antibiyogram testleri de tavsiye edilecek kemoterapatik ilacın belirlenmesine yardımcı olur (Noga, 2010; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2016).

Vibriosisin teşhisi; patojen bakterinin izolasyonu, identifikasyonu ve histopatolojik bulgular ile yapılır (Post, 1987) Balığın iç organlarından yapılan ekim sonucunda 22 °C'de 24-46 saat için kıvrık şekilli bakteri kolonileri elde edilir. Hastalığa neden olan *Vibrio* suşlarının izolasyonu enfekte balığın karaciğer, dalak ve böbreğinden, kanından ve vücut yüzeyindeki ülserlerinden ekimler yapılarak gerçekleştirilir. Vibrioların izolasyonu için TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar) agar selektif bir ortam olarak tanımlanmıştır. Besiyerinde bakterilerin üremesinden sonra yapılan biyokimyasal testler ve sero-aglütinasyon çalışmaları da identifikasyonu sağlar. Ayrıca diğer enfeksiyöz balık hastalıklarının teşhisinde olduğu gibi ELISA da bu hastalığın teşhisinde kullanılan en önemli ve yaygın serolojik tekniktir (Knappskog ve diğ., 1993, Austin ve Austin, 2016).

2.2.1.4 Hastalığın Kontrol ve Tedavisi

Vibriosis'in kontrolü diğer bakteriyel sepsisemilerde olduğu gibi suyun kalitesinin ve yetiştiricilik uygulamalarının iyileştirilmesi ve düşük stok yoğunluğu ile sağlanır. Bu şartların sağlanamadığı durumlarda çıkması mümkün olan hastalığın tedavisinde oral antibiyotik ile tedavi tek çözümdür (Inglis ve diğ., 1993; Bruno ve diğ., 1997). Diğer balık patojenlerinin

sebebi olduğu hastalıklardaki gibi vibriosisde de antibiyotiklere karşı geliştirilen direnç önemli bir problemdir (Ellis, 1999). Özellikle salmonid balıklarda etkili olan *V. anguillarum* ve *V. salmonicida* suşlarının kullanımı yaygın olan oxytetracycline, sulfonamid ve oksolinik asit gibi antibiyotiklere karşı direnç geliştirdikleri bildirilmiştir (Inglis ve diğ., 1993).

Son 20 yıl içerisinde vibriosisin önlenmesi konusundaki çalışmaların büyük kısmını immünizasyon ile ilgili olduğu görülmektedir. Kuzey Yarımküre'deki *V. anguillarum* ve *V. ordalii*'den kaynaklanan rutin lisanslı aşılar bu hastalığa karşı oldukça etkilidir. Norveç'te çeşitli *Vibrio* türlerine karşı tek bir bakteriye karşı geliştirilen monovalent aşılar yanı sıra birden çok etkene karşı hazırlanan tekli veya karma aşılar da üretilmektedir (Mosca ve diğ., 2014, Spinos ve diğ., 2017). Aşıların vibriosis'e karşı koruma sağlama süresi limitlidir. Aşılamadan 1.5-2 yıl sonra *V. anguillarum*'a karşı koruyuculuğun azaldığı bildirilmektedir (Knappskog ve diğ., 1993, Bruno ve diğ., 1997, Sommerset ve diğ., 2005).

2.2.2. Pasteurellosis

Pasterullosis; doğada ve kültürü yapılan deniz balıklarında bildirilen etkeni *P. piscicida* olan sistemik bir hastalıktır. Kronik formunda hasta balıkların iç organlarında beyazımsı tüberküller görüldüğünden yaygın bir şekilde yalancı tüberküloz (pseudotüberküloz) adıyla anılmaktadır.

Pasteurellosis; halofilik bir bakteri olan *P. piscicida*'nın etkeni olduğu ve bakteriyel sepsis ile karakterize bir hastalıktır (Toranzo ve diğ., 1991, Austin ve Austin, 2016; Inglis ve diğ., 1993; Magarinos ve diğ., 1994). Jhansen ve Surgella (1968) tarafından hastalık etkeni önceleri *P. piscicida* olarak adlandırıldığı için hastalık pasteurellosis olarak adlandırılmıştır (Bakopoulos ve diğ., 1995; Thyssen ve Ollevier, 2001). Hastalığın kronik formunda, hasta balıkların iç organlarında, bakterilerin kümeleşmesinden oluşmuş beyazımsı tüberküllerden dolayı hastalığa pseudotüberküloz adı verilmiştir (Magarinos ve diğ., 1992; Austin ve Austin, 2016; Inglis ve diğ., 1993). Ancak hastalık etkeninin ismi *P. piscicida* olarak değiştirildikten sonra hastalık photobacteriosis olarak adlandırılmıştır (Thyssen ve Ollevier, 2001; Elkamel, 2002).

Pasteurellosis'in ilk olarak ortaya çıktığı Amerika Birleşik Devletleri'nde, daha sonra yayılma gösterdiği Avrupa ülkelerinde ve Japonya'da bu hastalığa karşı birçok antibiyotik kullanılmıştır. Hastalığın ilk görüldüğü zamanlarda etken bu antibiyotiklerle kolayca kontrol altına alınabilmiş ancak antibiyotiklerin uzun süreli ve bilinçsiz kullanımı bir çok

olumsuzlukları da beraberinde getirmiştir (Bakopoulos ve diğ., 1995; Magarinos ve diğ., 1996; Thyssen ve Ollevier, 2001; Austin ve Austin, 2016). Hastalığın daha önceleri görüldüğü Japonya’ da bakteri suşlarında bu durum çok çarpıcı bir şekilde ortaya konmuştur. Japonya’ da hastalığın ilk görülmesinden sadece 16 yıl sonra bakterilerin duyarlı olduğu antibiyotik sayısı yok denecek kadar azalmıştır. Benzer eğilimler Avrupa izolatlarında da dikkati çekmeye başlamıştır (Bakopoulos ve diğ., 1995).

2.2.2.1 Hastalığın Etkeni

Gram-negatif ve hareketsiz basil yapısında olan *P. piscicida*’nın neden olduğu pasteurellosis doğadaki ve kültürü yapılan deniz balıklarını tehdit eden önemli bakteriyel hastalıklardan olup hastalık önceleri pseudotüberkülozis olarak adlandırılmıştır (Magarinos ve diğ., 1996; Austin ve Austin, 2016). Pasteurellosis yaz sıcaklıkları ile yakından alakalı olup su kalitesinin düşük olduğu yüksek sıcaklıklar (23 °C üzeri) ve tuzluluklarda (‰ 20-30) meydana gelir ancak hastalığın üretim bölgelerinde endemik hale gelmesi ile üretim yoğunluğundaki artış daha düşük su sıcaklıklarında da kayıplara neden olarak artık enfeksiyonun 18 °C’de de görüldüğüne dair yayınlar mevcuttur (Toranzo ve diğ., 1991; Magarinos ve diğ., 1996; Noga, 2010).

Pasteurellosis ilk defa 1963 yılında Amerika Birleşik Devletleri’nde bulunan beyaz levrek (*Morene americanus*) ve çizgili levrek (*M. saxatilis*) doğal popülasyonlarında yoğun ölümlere neden olmuştur (Toranzo ve diğ., 1991; Austin ve Austin, 2016; Kawakami ve Sakai, 1998). 1969 yılından itibaren çok önemli bir hastalık haline gelerek başlıca sarı kuyruk (*S. quinquerediata*) balıklarını etkilemekte olup 1990 yılından itibaren Avrupa’da kültür çipura balıklarında, deniz levreklerinde ve Amerika Birleşik Devletleri’nde de melez çizgili levreklerde (*M. americanus*, *M. saxatilis*) ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Christofilogiannis, 1993; Magorinos ve diğ., 1996; Daly, 1999; Kawakami ve Sakai, 1998). Ülkemizde ise kültürü yapılan levrek balıklarında pasteurellosis hastalığının görüldüğüne dair çeşitli çalışmalar mevcuttur (Çağırğan, 1993; Candan ve diğ., 1996; Timur ve diğ., 1999; Korun ve Timur, 2005). (Çolak, 1999, Özese ve Timur, 2007) yürütmüş olduğu doktora tezinde kültür levreklerindeki pasteurellosisin patojenitesi ile ilgili deneysel bir çalışmayı gerçekleştirmiştir.

2.2.2.2 Hastalığın Klinik Bulguları

P. piscicida tarafından oluşturulan pasteurellosis, doğa ve kültür deniz balıklarını en çok tehdit eden hastalıklardan biri olup kronik formda hasta balıkların iç organlarında beyazımsı

tüberküllerin görülmesi hastalığın pseudotüberkülozis olarak da adlandırılmasının ana nedenidir (Magarinos ve diğ., 1996; Austin ve Austin, 2016). Pasteurellosis sepsisemi ile seyreden bir hastalıktır. Hastalığın patolojik bulgularının hastalığın akut ve kronik formuna göre değişiklik gösterdiği bildirilmektedir. Pasteurellosis enfekte balıklarda sepsisemiye neden olurken akut vakalarda ise sadece birkaç patolojik belirti gösterir. Solungaç kapağı etrafında veya yüzgeç diplerinde küçük hemorajiler, deride anormal pigmentasyon, dalak ve böbrekte genişlemelerin görüldüğü rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 2016; Magarinos ve diğ., 1996; Noga, 2010). Kronik formda ise böbrek, dalak ve karaciğerde multifokal nekroz görüldüğü ve bu kronik lezyonların iç organlarda 0.5 ile 3.5 mm çapındaki beyaz tüberküllerin varlığı ile karakterize edildiği bildirilmiştir. Kronik formda iç organlarda görüldüğü bildirilen bu lezyonların bakteri kümelerinden ve nekrotik fagositik hücrelerden oluştuğu ancak bu durumun genel bir özellik olmadığı, balık türüne, enfeksiyonun doğal ya da deneysel olarak gelişmesine ve hasta balıklara enfeksiyonun durdurulması için antibiyotik tedavisinin uygulanıp uygulanmadığına göre değişiklik gösterdiği rapor edilmiştir (Toranzo ve diğ., 1991; Magarinos ve diğ., 1996; Daly, 1999; Austin ve Austin, 2016).

2.2.2.3 Hastalığın Teşhisi

Bu hastalıkta bakteriyolojik ve histopatolojik çalışmalar teşhis için önem taşır. Çünkü bazı balık türlerinde özellikle dalak ve böbrekte granüloma benzeri lezyonların şekillenmesi yanı sıra visceral organlarda yaygın hemorajik ve nekrotik lezyonlar görülmektedir (Inglis ve diğ., 1993; Daly, 1999; Austin ve Austin, 2016). Bu balıklarda etkenin izolasyonu ile teşhis kesinleşir. Bu teknikler yanı sıra FAT (Floresan Antikor Testi) (Bakopoulos ve diğ., 1997), PCR (Polymerase Chain Reaction) (Dos Santos, 2000) ve ELISA gibi serolojik çalışmalar kullanılmıştır (Romalde ve diğ., 1999; Korun, 2004).

2.2.2.4 Hastalığın Kontrol ve Tedavisi

Antibiyotik ve diğer kemoterapetik maddeler pasteurellosisin tedavisinde yaygın şekilde kullanılmıştır. Bu amaçla oxolinic acid, flumequin, güçlendirilmiş sulfonamidler, nitrofuranlar ve oksitetrasiklin bu hastalığın tedavisinde etkili olarak kullanılmaktadır. Fakat son yıllarda yapılan antibiyotik duyarlılığı ile ilgili çalışmalar mevcut ilaçlarla başarılı ve etkin bir tedavinin güç olacağı üzerine yoğunlaşmıştır (Thyssen ve Ollevier, 2001). Hastalığın kimyasal yollarla kontrol edilmesinde yaşanan sıkıntılar aşılamaı tercih edilen yöntem yapmıştır. Hastalığa

karşı geliştirilen aşı çalışmalarında oldukça önemli başarılar kazanılmıştır (Magarinos ve diğ., 1994; Daly, 1999; Magarinos ve diğ., 1999; Dos Santos, 2001; Elkamel, 2002; Morinigo ve diğ., 2002; Bakopoulos ve diğ., 2003). Kültürü yapılan levrek balıklarında ise *P. piscicida* ile birlikte *V. anguillarum*'u da içeren bivalent aşılara ilgili çalışmalar mevcuttur (Mosca ve diğ., 2014, Spinos ve diğ., 2017).

2.3 BALIKLARDA BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ

İmmünoloji diğer adıyla bağışıklık bilimi canlının vücuduna giren veya dışarıdan verilen ve antijen olarak adlandırılan yabancı maddelere (mikroorganizma, toksin, protein, polisakkarit vs.) karşı vücudun bütün genel ve özel savunma mekanizmalarını kullanarak üretmiş olduğu spesifik immünoglobülinler (antikorlar) yardımıyla canlının savunma mekanizmasının (bağışıklık sistemi) çalışmasını inceleyen bir bilim dalıdır. Aynı zamanda zararlı etkenlere karşı konak canlının (insan, hayvan ve balık) karşı koyması, direnç göstermesi, kendini koruması ve zararlı etkeni yok etmesi gibi yöntemlerle immün cevap oluşturmalarını da incelemektedir (Anderson, 1974; Dalmo ve diğ., 1997; Ellis, 1999; Dos Santos, 2000).

Doğadaki ve kültürü yapılan balıkların yaşadığı tatlı su veya deniz ortamlarında, enfeksiyona yol açan fırsatçı veya zorunlu patojen mikroorganizmalar farklı virüs, bakteri, mantar ve parazit türlerini içermektedir. Balıklarda bu mikroorganizmaların vücuda girişinde ilk olarak fiziksel bariyerlerden olan pullar ve deriler görev alırken, kimyasal olarak ise bu görevi mukus yapmaktadır (Anderson, 1974; Dalmo ve diğ., 1997; Ellis, 1999; Ellis, 2001). Omurgalılarda olduğu gibi balıklardaki bağışıklık sistemi doğal (spesifik olmayan) ve kazanılmış (spesifik) bağışıklık sistemi olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadır (Iwama ve Nakanishi 1996; Dalmo ve diğ., 1997; Ellis, 1999; Van Muiswinkel, 2008).

2.3.1. Doğal Bağışıklık (Spesifik Olmayan)

Spesifik olmayan bağışıklık sistemi yani doğal bağışıklık; kalıtsal olarak anneden yavruya aktarılan bir bağışıklık çeşididir. Bu tip bağışıklıkta canlıda hastalığa neden olan antijen tekrar verildiğinde spesifik bir hafıza yaratmaz. Balıkların doğal bağışıklık sisteminde görev alan başlıca organ, doku ve hücreler; böbrek, dalak ve karaciğer yanısıra epitelial bariyerler ve fagositik hücrelerden oluşmaktadır (Anderson, 1974; Van Muiswinkel, 1997; Ellis, 1999; Magnadottir, 2010).

Balıkların bulunduğu ortamda çok sayıda patojen mikroorganizma (bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi) mevcuttur ve balıklar bu mikroorganizmalarla temas halindedir. Bu tip mikroorganizmaların çoğu saprofitik özellik gösterirken, diğer bir kısmı ise balıklarda patojendir. Ancak her ikisi de enfekte ettikleri balıkların iç organlarına ait dokularını sindirebilme ve parçalama yeteneğine sahiptirler. Balıklar normal koşullar altında sahip oldukları yukarıda belirtilen doğal savunma mekanizmalarıyla çevrelerinde bulunan bu patojen mikroorganizmalara karşı kendilerini savunma yeteneğine sahiptirler (Anderson, 1974; Ellis 1999).

Bununla birlikte balıkların derisinde bulunan epitelial hücrelerden olan dermis, epidermis, pullar ve mukus gibi yapılar da fiziksel ve kimyasal bariyerler olarak görev alır ve mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklara karşı doğal bağışıklık mekanizmasının gelişmesine öncülük ederler. Patojen bir mikroorganizma konakçı canlıya (insan, hayvan ve balık gibi) girdiğinde yukarıda belirtilen hücresel bariyerler yanısıra canlının sahip olduğu diğer serum faktörleri (humoral) de doğal savunma mekanizması aktive eden özellik göstermektedir. Humoral sistemi geliştiren serum faktörleri arasında en önemli mekanizmayı monosit, makrofaj ve nötrofil gibi hücrelerin sahip olduğu fagositik aktivite oluşturmaktadır (Anderson, 1974; Candan ve Karataş, 2010; Magnadottir, 2010).

Balıkların vücut sıvıları aynı zamanda çeşitli mikrobiyal ürünlere ve mikroorganizmalara karşı reaksiyon oluşturan çeşitli proteinleri ve peptidleri içermektedir. Bu yapılar; doğal (humoral) bağışıklığın bir bölümünü oluştururken antimikrobiyal peptidler, lizozim, komplement, lektin, transferrin, pentraxin, C-reaktif proteinleri (CRP) ve serum amiloid proteini (SAP) ve antiproteazları kapsamaktadır (Anderson, 1974; Ellis, 1988).

Tüm canlılarda görülen inflamasyon ise patojen mikroorganizmanın konakçının vücuduna girmesinden sonra gelişen ve çok sayıdaki granülosit ve makrofaj hücrelerinin enfeksiyonun seyirine bağlı olarak biraraya toplanması sonucu balığın belirli bir bölgesinde görülen lokal bir savunma reaksiyonudur. İnflamasyon sonucunda aktif olarak rol alan bu hücreler sayesinde enfekte bölgenin diğer vücut kısımlarından ayrılarak kısmi bir korumaya alındığı ifade edilmektedir (Anderson, 1974; Magnadottir, 2010).

Canlılarda herhangi bir hastalık etkeni vücuda girdiğinde yukarıda belirtmiş olduğumuz gibi spesifik olmayan bağışıklık sistemini oluşturan organ, doku, hücre ve diğer yapılar devreye

girer. Ancak canlının hastalığa direnci, patojen mikroorganizmanın hastalık yapma yeteneği ve ortam şartlarının olumsuzluğu gibi nedenlere bağlı olarak enfeksiyonu durdurulamazsa spesifik olmayan bağışıklık sistemi yerine bu kez konakta spesifik bağışıklık sisteminin devreye girdiği bildirilmektedir (Iwama ve Nakanishi, 1996; Ellis, 2001; Magnadottir, 2010).

2.3.2. Kazanılmış Bağışıklık (Spesifik)

Kazanılmış yani spesifik bağışıklık sistemi ise canlının belirli hastalık etkenleri ile karşılaştıktan sonra ortaya çıkar. Bu sistemde enfekte canlı patojene karşı geliştirmiş olduğu savunma mekanizmasını kendisine ve bu hastalık etkenleri ile karşılaşmamış başka bir canlıya aktarma yeteneğine sahip bir direnç mekanizması geliştirmiştir (Anderson, 1974; Ellis, 1999).

Kazanılmış bağışıklık sistemi omurgasız canlılarda bulunmazken sadece omurgalılarda bulunur. Kazanılmış bağışıklık cevabının gelişimi canlılarda aşı uygulamalarının temel prensibini oluşturmaktadır (Anderson, 1974; Ellis, 1999; Watts ve diğ., 2001). Spesifik hafıza, lenfoid sistemdeki kazanılmış değişiklikleri kapsamaktadır. Kazanılmış bağışıklık yanıtı oluşturma yeteneğine sahip moleküller antijen olarak tanımlanmaktadır. Genellikle tüm protein molekülleri hatta mikroorganizmalar antijen olarak tanımlanırlarken bu tip antijenik yapılar spesifik bağışıklık sistemi tarafında geliştirilen ve çok farklı alanlara sahip büyük moleküllerden olan antikorlara bağlanırlar (Anderson, 1974; Ellis, 2001).

Kazanılmış bağışıklık sistemi spesifikliği ve hafıza oluşturmaıyla karakterize edilmektedir. Bu tip bağışıklık sistemi de spesifik olmayan bağışıklık sisteminde olduğu gibi çeşitli humoral ve hücrel (lökositler) faktörlerden oluşmaktadır (Anderson, 1974; Ellis, 1999; Watts ve diğ., 2001). Bu bağışıklık belirli bir antijene özgüdür ve antijenle tekrar karşılaşıldığında daha hızlı ve güçlü cevap oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu olaylar antikor ve T lenfositleri tarafından gerçekleştirilirken canlıda antijene özgü uzun süreli hafızanın gelişmesine neden olur. Bununla birlikte bu tip savunma sisteminde, organizmanın patojene karşı oluşturduğu birincil ve ikincil bağışıklık yanıtına göre sıvısal (humoral) veya hücrel (selüler) düzeyde olabilir (Ellis, 2001; Zapata ve diğ., 2006).

2.3.2.1. Humoral Bağışıklık

Humoral bağışıklık, organizmanın hücre dışında bulunan antijenlere karşı üretmiş oldukları glikoprotein yapısındaki antikorlar (immünglobulinler) sayesinde yapmış olduğu savunma

şeklidir. Kanda bulunan antikorlar, patojenlerin konak hücrelerini enfekte etmesini engeller, toksin ve enfekte hücrelerin vücuttan uzaklaştırılmasını sağlarlar (Anderson, 1974; Ellis, 1999; Tort ve diğ., 2003).

Antikorların canlının vücuduna ilk girmesi halinde öncelikle T ve B lenfosit hücreleri birlikte reaksiyon verirler. Daha sonraki aşamada ise B lenfositler plazma hücrelerine veya hafıza hücrelerine dönüşürler. Plazma hücreleri kendilerinin oluşmasını uyaran antijene özgü özel antikorlar üretirler ve aynı antijenin vücuda bir kez daha girmesi halinde hafıza hücrelerine dönüşebilecek özelliğe sahip hücrelerdir. T hücreleri yardımcı hücreler olarak adlandırılan, antijenin varlığına bağlı olarak çoğalan, farklı fonksiyona sahip hücrelerdir. Uzun süre hayatta kalabilen yardımcı hafıza hücrelerine dönüşerek, bu sayede antijenin vücuda girdiği ikinci bir uyarıda sayıları çoğalarak B hücreleri ile beraber görev alırlar. Böylece antikor üretimi daha hızlı şekilde gerçekleşir ve birinci uyarıya göre daha yüksek bir reaksiyon oluşur. Hafıza hücrelerinin bu kabiliyeti dolayısıyla artan bir koruma ve humoral bağışıklık elde edilir (Ellis, 1999).

2.3.2.2. Hücresel Bağışıklık

Hücresel bağışıklık cevabı, fagositer hücrelerde hücre içi yaşam gösteren veya fagositer olmayan hücreleri enfekte eden mikroorganizmalara karşı yapılan T lenfosit hücreleri aracılığıyla bir savunma mekanizmasıdır. Balıklardaki hücresel bağışıklıktan timusdan köken alan T lenfositleri sorumludur. Bu hücrelerin oluşturduğu gruplar T yardımcı hücreleri oluşturur ve bu yapılar hücresel bağışıklıktan da sorumludur. Hücresel bağışıklık esas olarak; herhangi bir antijene (bakteri, virüs gibi) karşı makrofajların bu antijeni içine alarak fagosit etme yeteneğine dayanır.

Canlının vücuduna patojen özellik gösteren herhangi bir antijen ilk kez girdiğinde hücresel bağışıklık uyarısında T lenfosit klonları farklı fonksiyonlu hücre gruplarına dönüşerek hücresel yanıt oluşturur. Bunlar lenfokin üreten hücreler, sitotoksik hücreler ve supresör (baskılayıcı) hücrelerdir. Lenfokin üreten hücreler makrofajların spesifik olmayan kapasitelerini artırır, sitotoksik hücreler yabancı hücreleri lizis ile ortadan kaldırır, supresör (baskılayıcı) hücreler ise antikor ve lenfokin üretimini gerektiğinde yönlendirerek sona erdirilmesini sağlayan hücrelerdir (Iwama ve Nakanishi, 1996; Ellis, 2001; Candan ve Karataş, 2010). Savunma mekanizmasının ilk basamağı tüm spesifik olmayan faktörleri içermesine rağmen bu faktörlerin

aktiviteleri ve miktarları enfeksiyon boyunca değişebilir. Lenfoid sistemde kazanılmış değişiklikleri içeren spesifik immun mekanizma savunma mekanizmasının ikinci basamağını oluşturur (Anderson, 1974; Ellis, 2001).

Balık ve diğer canlılarda kullanılan aşı uygulamalarının amacı canlının humoral ve hücrel düzeydeki spesifik bağışıklık sistemini güçlendirerek hastalık etkenlerine karşı spesifik bağışıklık cevabının gelişimine katkıda bulunmaktır (Ellis, 2001; Tort ve diğ., 2003; Magnadottir, 2010). Balık aşıları ile ilgili çalışmaları *A. salmonicida* (Marquis ve Lallier, 1989), *V. anguillarum* (Harrell ve diğ., 1975; Çamlıbel, 2002) *Yersinia ruckeri* (Olesen, 1991; Kubilay ve Timur, 2001), *Flavobacterium psychrophilum* (LaFrentz ve diğ., 2003) gibi balık patojenlerine karşı koruyucu bağışıklık sistemindeki gelişen spesifik antikorların rolünü tanımlamak için kullanılmıştır.

2.3.3. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Aşı Kullanımı

Aşılar; hastalık etkeni mikroorganizmalar ve onların antijen unsurlarından hazırlanmış olan, bir hayvana verildiği zaman hastalık meydana getirmeden bağışıklık kazandıran maddelerdir. Aşılamanın ana amacı belirli bir hastalığa karşı spesifik ve uzun süreli koruma oluşturmaktır. Özgüllük ve hafıza, aşılama yoluyla kazanılmış bağışıklık oluşumunu sağlayan iki anahtar elemandır. Bu sayede antijenle (patojen veya onun ürünleri) ikinci kez karşılaşıldığında daha kuvvetli ve daha hızlı bağışıklık cevabı oluşumunun sağlandığı görülmektedir (Ellis, 1988; Watts ve diğ., 2001). Mikroorganizmalar tarafından oluşturulan hastalıklara karşı vücut, bağışıklık sistemi ile yanıt verir. Bağışıklık sisteminin hastalık etkeni vücuda girmeden, yani hastalık gelişmeden, etkeni tanıması ve onu yenecek yanıtı geliştirmesi (örneğin vücutun gerekli antikor üretmesi), aşılamanın temel ilkesidir. (Ellis, 1999; Evelyn, 1997; Joosten, 1997; Sommerset ve diğ., 2005; Gudding ve Goodrich, 2014).

Balıklar için ilk aşılama çalışmaları 1930'larda Kuzey Amerika' daki salmonid kuluçkahanelerinde furunculosis'e karşı yapılmıştır (Ellis, 1988). Bilimsel anlamda ilk balık aşısı çalışmaları Duff (1942) tarafından alabalıkta *Bacterium salmonicida*'ya karşı gerçekleştirilmiştir (Ellis, 1988; Ellis 1999; Joosten ve diğ., 1997). Daha sonra 1950'lerde antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasıyla balık aşılmasına ilgi azalmıştır. 1960'larda salmon yetiştiriciliği büyük ölçeklerde yapılmaya başladığında, ortaya çıkan vibriosis, furunculosis ve yersiniosis gibi temel balık hastalıkları antibiyotiklerle kolayca kontrol altına

alınabilmiştir. Ancak salmon sanayisi 1970'lerde hızlı bir şekilde gelişerek 1980' in başlarında bu bakteriyel patojenler, birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiştir (Ellis, 1988, Klein ve diğ., 1996). Buna ilaveten kimyasal etkenlerle tedavi güçleşmiş ve daha pahalı bir yöntem olmuştur. Antibiyotiğe karşı oluşan bu direnç, su ürünlerindeki hastalıkların kontrolünde aşılamanın çok arzu edilen bir yöntem olmasını sağlamıştır (Bakopoulos, 1995; Thyssen ve Ollevier, 2001).

Balıklar çeşitli faktörlerden dolayı değişik aşılama yöntemleriyle aşılanmaktadır. Bu faktörler arasında ortam şartları, balık türleri, balık büyüklükleri ve farklı hastalıklara karşı aşılama sayılabilir. Temel aşılama yöntemleri, enjeksiyon, immersiyon, yeme katılarak verilen oral yolla yapılmaktadır. Enjeksiyon yöntemiyle yapılan aşılama çalışmalarında aşının etkinliğini arttırmak için Freund's Complete Adjuvant, su-yağ emülsiyonları ve mineral yağ gibi adjuvantlar kullanılmaktadır. Ancak bu maddelerin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır (Ellis, 1988; Joosten, 1997; Midtlyng, 1997).

Geliştirilmiş formüllere göre aşılar monovalent ve polivalent olarak hazırlanır. Monovalent aşılar tek bir patojene ait antijenik ürünler bulunurken, polivalent aşılar birden fazla patojene ait antijenik ürünler bulunur. Polivalent aşılar aynı anda, konağın hassas olduğu birden fazla hastalık etkenine karşı koruma sağladığı için daha çok tercih edilmektedir (Sommerset ve diğ., 2005; Gudding ve Goodrich, 2014).

Balık aşılarının başarılı kullanımına bağlı olarak işletmelerde hastalıklardan kaynaklanan ölüm ve verim kayıplarının, balık ve diğer deniz ürünlerinde direnç sorunlarının, tedavi için kullanılan giderlerin ve ilaç kullanılması sonucu oluşan çevre kirliliğinin azaldığı bununla birlikte yemden yararlanmanın artmasıyla balığın daha hızlı şekilde gelişme gösterdiği bildirilmektedir. Tüketici sağlığı üzerinde aşıların herhangi bir olumsuz etkisi yoktur (Evelyn, 1997; Magnadottir, 2010).

Su ürünlerinde kullanılan aşıların çoğu salmonidler, özellikle gökkuşağı alabalığı ve Atlantik salmonlar (*Salmo salar* L.) için geliştirilmiştir. Son yıllarda çipura, levrek, kalkan (*Scophthalmus maximus*), morina, yayın (*Silurus glanis*) gibi farklı balık türlerinin de yetiştiriciliği yoğun bir şekilde yapıldığı için bu türlerde de çeşitli aşı çalışmaları bulunmaktadır. Bu günümüzde aşıların kullanımında artışa yol açmıştır. Ayrıca yoğun bir şekilde yetiştiriliciliğine başlanan

farklı balık türlerinde de hastalığın kontrolü için yeni aşılarda kullanıma gereksinim duyulmaktadır (Ellis, 1999; Magarinos ve diğ., 1999).

Su ürünlerinde kullanılan ticari aşılarda hemen hepsi üretim maliyetinin düşüklüğünden dolayı bakteriyel hastalıklara karşı geliştirilmiştir. Büyük fermentörlerde bakterilerin çok miktarda kültüre alınması, toksinlerin ve bakteri hücrelerinin kimyasal olarak (genellikle formalin kullanılmasıyla) inaktive edilmesi düşük maliyetlerle yapılabilmektedir (Ellis, 1988). Böyle basit aşılarda bakterin olarak adlandırılmakta ve yersiniosis, vibriosis ve soğuk su vibriosisine karşı yüksek miktarda etkili koruma sağlamaktadır (Ellis, 1988; Evelyn, 1997).

Günümüzde ticari aşılarda çoğu enjeksiyon ve immersiyonla verilecek şekilde formüle edilmiştir (Joosten ve diğ., 1995; Joosten ve diğ., 1997; Midtlyng, 1997). Vibriosis ve yersiniosis aşılarda immersiyon ve enjeksiyonla etkili bir şekilde verilebilmektedir. Bununla birlikte soğuk su vibriosisi ve furunkulosis gibi bazı aşılarda optimal etkiyi elde etmek için enjeksiyon içinde adjuvant da bulundurulması gerekmektedir (Ellis, 1988).

Aşının başarısını etkileyen birçok faktör vardır. Öncelikle hiçbir aşı % 100 koruma sağlamaz. Balığın sağlık durumu ile ilgili faktörler, hastalık etkeni (bakteriyel, viral), yetiştirme şartları ile ilgili faktörler, stres, beslenme yetersizlikleri başarıyı etkiler. Ayrıca sudaki kirleticiler, ağır metaller, antibiyotikler, çevre (sıcaklık, pH, sertlik, CO₂ miktarı) da etkilidir (Anderson, 1974; Johnson ve diğ., 1982; Ellis, 1988). Aşı ile ilgili faktörler; antijenin dozu, antijenin özelliği, aşının uygulanış şekli, aşıda adjuvantların ya da immunostimulanların varlığı da aşı ile ilgili faktörler arasındadır. Aşının verdiği koruyuculuğun sağlıklı bir şekilde yorumlanması için; aşı herhangi bir patojen içermeyen sağlıklı balıklara yapılmalıdır, balığın büyüklüğü ve bölgenin bulaşıklığı göz önüne alınarak aşılamada en uygun yöntem seçilmelidir, stres faktörleri (oksijen, ağır metal ve organik kirlilik gibi) olmamalıdır, aşılarda direkt gün ışığından korunmalı, kesinlikle dondurulmamalıdır, aşı şişesi açıldığında tüketilmelidir ve aşılamada prospektüslere kesinlikle uyulmalıdır (Anderson, 1974; Johnson ve diğ., 1982; Ellis, 1988; Larsen, 1988; Salati ve diğ., 1989; Schill ve diğ., 1989).

2.3.3.1 Bakteriyel Balık Aşılarda

Günümüzde balık yetiştiriciliği endüstrisinde karşılaşılan çeşitli bakteriyel hastalık sebeplerine yönelik aşı çalışmaları yapılmaktadır (Ellis, 1999; Andreoni ve Magnani, 2014; Sommerset ve diğ., 2005). Son 20 yıl içerisinde vibriosisin önlenmesi konusundaki çalışmaların büyük kısmını

aşılama ile ilgili olduğu görülmektedir. Kuzey Yarımküre'deki *V. anguillarum* ve *V. ordalii*'den kaynaklanan rutin lisanslı aşılar bu hastalığa karşı oldukça etkilidir. Norveç'te çeşitli *Vibrio* türlerine karşı kombine aşılar bulunmaktadır. Fakat aşılarda hastalığa karşı koruma sağlama süresi limitlidir. Aşılamadan 1.5- 2 yıl sonra koruyuculuk azalarak kaybolur (Bruno ve diğ., 1997; Sommerset ve diğ., 2005). Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliği yapılan bölgelerdeki firma yetkilileri ile gerçekleştirilen görüşmelerde edinilen bilgilere göre ülkemiz deniz balığı yetiştiriciliğinde genellikle yurtdışından getirilen *V. anguillarum* ve *P. damsela* subsp. *damsela*'ya karşı etkili olan ticari aşılar kullanılmaktadır.

V. anguillarum'a karşı geliştirilen aşılar morina (Espelid ve diğ., 1991; Knapsskog ve diğ., 1993; Schroder ve diğ., 2006; Mikkelsen ve diğ., 2007; Gudmundsdottir ve diğ., 2009), kalkan (Estevez ve diğ., 1994), Atlantik somon balığı (Hoel ve diğ., 1997), Afrika kedi balığı (African catfish) (Vervarcke ve diğ., 2004) ve levrek balığı (Angelidis, 2006; Angelidis ve diğ., 2006; Galeotti ve diğ., 2013; Hassanin ve diğ., 2014) gibi farklı balık türlerinde başarıyla kullanılmaktadır. Ayrıca *V. ordalii* (Velji ve diğ., 1990) coho somon balığında (*Onchorhynchus kisutch*), *V. salmonicida* (Lillehaug, 1990) atlantik somon balığında (*Salmo salar* L.), (Schroder ve diğ., 1992) morina balığında, *V. vulnificus* (Collado ve diğ., 2000; Esteve-Gassent ve diğ., 2004) yılan balığında (*Anguilla anguilla*), *V. harveyi* (Arijo ve diğ., 2005) dil balığında (*Solea senegalensis*) ve *V. alginolyticus* (Morinigo ve diğ., 2002; Hassanin ve diğ., 2014) çipura balıklarında yaptıkları çalışmalarda gibi farklı *Vibrio* patojenlerine hazırlanan monovalent ticari veya bireysel olarak aşılar da mevcuttur.

Joosten ve diğ. (1995, 1997) çipura, sazan ve alabalık gibi çeşitli balık türleriyle ilgili yaptıkları çalışmalarda *V. anguillarum* ile hazırlanan alginat mikropartikülleri içeren iki farklı aşıyı oral yöntemle uygulamış ve oral aşılamada korumada etkili bir alternatif yöntem olduğu sonucunu elde etmiştir. Gravningen ve diğ. (1998) ve Afonso ve diğ. (2005) levrek balıklarında görülen vibriosis ve pasteurellosis hastalıklarına karşı bu proje kapsamındaki gibi *V. anguillarum* ve *P. piscicida*'ya karşı geliştirilen bivalent aşılarda yavru levrek balıklarındaki koruyucu etkisini deneysel olarak araştırmışlardır. Morinigo ve diğ. (2002) yavru çipura balıklarında *V. alginolyticus* ve *P. piscicida*'yı içeren bivalent aşının etkisini incelemiştir.

Yurdumuzda ise Çamlıbel (2002) *V. anguillarum* bakterisi ile hazırlanan immersiyon yöntemiyle aşılanan 6-9 g levrek balıklarında serolojik testlerde yüksek aglütinasyon titreleri elde etmiştir. Çağırman (2004) levrek yavrularında vibriosis'e karşı aşı geliştirilmesi çalışması

yapmıştır. Ekici ve Diler (2010) gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) aşılama yöntemlerinin yaşama oranı üzerine etkisini araştırmıştır. Altınok ve diğ. (2013, 2014) ise alabalıklarda *V. anguillarum*'a karşı yeni aşı geliştirilmesi üzerine deneysel çalışmalar yapmışlardır.

Pasteurellosise neden olan *P. piscicida* suşlarının sarıkuyruk balıklarında yapılan incelemeler sonucunda R-direnç plazmidleri geliştirdiği için suşların ilaca direnç kazanmasına bağlı olarak 1980'li yılların başlarında itibaren bu hastalığa yönelik aşılama çalışmaları başlamıştır (Fukuda ve Kusuda, 1981; Fukuda ve Kusuda, 1985). Daha sonraki yıllarda ise pasteurellosisin önlenmesinde aşı etkinliğini analiz etmek için çipura (Magarinos ve diğ., 1994; Magarinos ve diğ., 1999; Dos Santos ve diğ., 2001; Morinigo ve diğ., 2002), levrek (Gravningen ve diğ., 1998; Bakopoulos ve diğ., 2003; Bakopoulos ve diğ., 2015; Andreoni ve diğ., 2013), sarıkuyruk (Gravningen ve diğ., 2008), kobi (*Rachycentron canadum* L.) (Ho ve diğ., 2011), dil balığı (Arijo ve diğ., 2005) gibi balık türleri ile ilgili bir çok farklı çalışma yapılmıştır.

Magarinos ve diğ. (1994), çipura yavrularında pasteurellosis hastalığına karşı en yüksek korumayı intraperitoneal enjeksiyonla yapılan aşılama elde etmişlerdir. Ancak larva aşamasındaki çipura balıklarında ise immersiyon yöntemiyle aşılanmanın daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir (Magarinos ve diğ., 1999). Bakopoulos ve diğ. (2003) kendi hazırladığı besiyerinde ürettiği bakterilerle hazırladığı aşığı, ticari olarak kullanılan pasteurellosis aşısıyla, oral, immersiyon ve enjeksiyon yöntemlerini kullanarak levrek balıklarına uygulamış ve sonuçları karşılaştırmıştır. Sonuçlar banyo ile aşılanan yavru levrek balıklarında ve enjeksiyonla aşılanan daha büyük balıklarda kendi ürettikleri aşının ticari olandan daha başarılı olduğunu göstermektedir.

Yurdumuzda ise Yazıcı (2004) doktora tez çalışmasında levrek balıklarında pasteurellosise karşı alternatif aşılama yöntemleri üzerine araştırma yapmıştır. PLG (polylactide-co-glycolide) polimerleriyle kapsüllenmiş aşılarda liyofilize edilerek yeme karıştırılıp pasteurellosise karşı oral aşı şeklinde uygulanmasının diğer mikrokapsülasyon yöntemlerine bir alternatif olabileceğini bu çalışma ile ortaya konmuştur. Yazıcı ve Candan (2006) pasteurellosise karşı alternatif aşılama yöntemleri üzerine bir çalışma yapmışlar ve farklı yollarla (oral, immersiyon, enjeksiyon) uyguladıkları aşılarından en iyi sonucu enjeksiyonla aşılamada elde ettikleri hayatta kalma oranlarıyla bulmuşlardır.

1990'ların başında ticari olarak üretilmiş ilk balık aşısı *V. anguillarum* serotip O1 ve O2 için üretilen aşıdır. Daha sonraki yıllarda ise *P. piscicida* içinde ticari aşılar piyasaya sürülmüş ve uzun süre bu iki aşı çipura ve levrek için lisans sahibi tek aşılar olarak sektörde kullanılmıştır (Sommerset ve diğ., 2005, Andreoni ve Magnani, 2014; Gudding ve Goodrich, 2014). Tablo 2.'de görüldüğü gibi günümüzde ticari boyutta üretilen veya ticari üretime geçilmemiş çok sayıda bakteriyel balık aşısı mevcuttur.

Tablo 2.2: Bakteriyel balık aşıları (Sommerset ve diğ., 2005; Andreoni ve Magnani., 2014).

Bakteriyel Patojen	Uygulanan Balık Türü	Ticari
Vibriosis	Salmonidler, morina	+
	Çipura/levrek, sarıkuyruk	+
Soğuk su vibriosisi	Salmonidler	+
Kış ülseri	Salmonidler	+
Furunculosis	Salmonidler	+
Atipik <i>Aeromonas salmonicida</i>	Salmonidler	+
	Çeşitli tatlı ve tuzlu su türleri	-
Piscirickettsiosis	Salmonidler	+
Flavobacteriosis	Salmonidler	-
Columnaris	Kanal yayın balığı, salmonidler	+
Gökkuşağı alabalığı fry sendromu	Salmonidler	-
Edwardsiella septisemisi	Kanal yayın balığı	-
	Yılan balığı, Japon dil balığı	-
Bakteriyel böbrek hastalığı	Salmonidler	+
Lactococciosis	Gökkuşağı alabalığı, sarıkuyruk	+
Pasteurellosis	Çipura/levrek, dil balığı	+
	Sarıkuyruk, cobia	-
Streptococciosis	Tilapya	+
	Asya deniz levreği, salmonidler	-

2.4. BAKTERİYEL BALIK HASTALIKLARINDA KULLANILAN SEROLOJİK TEKNİKLER

Günümüzde kültürü yapılan balıklarda hastalık teşhisinin hızlı bir şekilde yapılması büyük önem taşımaktadır (Austin ve Austin, 2016). Teşhis için geleneksel, serolojik ve moleküler olmak üzere birçok yöntem kullanılmaktadır. Hızlı teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi yetiştiricilikte risk oluşturan hastalıkların azaltılmasında önemli bir role sahiptir. Geleneksel metotlar olan bakteriyolojik, parazitolojik, mikolojik ve virolojik metotlar kültürü kolay yapılan patojenler için kullanılmasına rağmen bazı patojen türlerin identifikasyonu için bu yöntemler pahalı, zaman alıcı ayrıca uzmanlık gerektirmektedir (Anderson, 1974).

Serolojik teknikler balık hastalıklarına neden olan patojenlerinin belirlenmesinde kullanılan alternatif yöntemlerdir. Bu teknik hastalık oluşturan bakterilerin balıkta oluşturduğu yanıtın belirlenmesini sağlamaktadır. İnsan ve hayvanların serumlarında antikorların varlığı önceden patojenlere maruz kaldıklarını ifade eder ve bu metotlar insan ve veteriner hekimlikte hastalıkların teşhisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu testler kullanılarak balıklarda bağışıklık çalışmaları ile bağlantılı olarak balık hastalıklarının teşhisi yapılmakta ve böylece hastalıklara karşı önlemlerin alınması sağlamaktadır (Anderson, 1974; Adams ve diğ., 2008).

Günümüzde balık hastalıklarında lam aglütinasyon, micro-well aglütinasyon, ELISA, Floresan Antikor Tekniği (FAT), Western-blot, komplement fiksasyon, immunodiffüzyon, hemaglutinasyon ve presipitin reaksiyonu gibi çeşitli serolojik teknikler kullanılmaktadır (Anderson, 1974; Schill, 1989; Anderson, 1990; Timur ve Timur, 2003; Adams ve diğ., 2008; Austin ve Austin 2016).

2.4.1. Aglütinasyon Teknikleri

Lam, tüp, ve mikro-well aglütinasyon olmak üzere çeşitli aglutinasyon yöntemleri patojen suşların serolojik karşılaştırılmasında, bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde ve balık patojenlerine karşı serumda antikor aranmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Toranzo ve diğ., 1987; Schill, 1989; Anderson, 1990; Roberson, 1993).

2.4.1.1. Lam Aglütinasyon

Aglütinasyon; süspansiyon halindeki bakterilerin ortamda bulunan kendi antikorları ile birleşmesi halinde ortaya çıkan gözle görülebilir kümeler halindeki çökeltilerin oluşmasıdır (Anderson, 1974; Plumb ve Bowser, 1983; Austin ve Austin, 2016).

Balık hastalığı ile ilgili araştırmalarında en çok kullanılan serolojik yöntemlerden biri olan lam aglütinasyon, kan serumunda mevcut antikorun varlığını antikor kümeleri ya da antijen taşıyıcıları ile görülebilmesi prensibine dayanır. Oluşan çökelti kümeleri tabana çöker ve gözle veya mikroskopta tespit edilir (Anderson, 1974; Toranzo ve diğ., 1987; Roberson, 1993; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2016).

Bu yöntemi Kubilay ve Timur (2001) *Y. ruckeri*'ye karşı aşılanan gökkuşağı alabalıklarında, Çamlıbel (2002) ise *V. anguillarum*'a karşı aşılanan levrek balıklarında aşılama sonrasında serumda oluşan antikor varlığının araştırılmasında kullanılmışlardır.

2.4.1.2. Micro-well Aglütinasyon

Mikro-well aglütinasyon testi serolojik tanı ve sınıflandırmanın temelini oluşturan testlerden biridir ve balık sağlığı ile ilgili yapılan çalışmalarda antijene karşı serumda oluşan antikor titresini belirlemede kullanılır (Anderson, 1974; Schill ve diğ., 1989).

Micro-well aglütinasyon testi levrek balığında (Angelidis ve diğ., 2006) *V. anguillarum*, (Gravningen ve diğ., 2008) *P. piscicida*, çipura balığında (Magarinos ve diğ., 1994) *P. piscicida*, kalkan balığında (Estevez ve diğ., 1994) *V. anguillarum* aşısına karşı serumdaki antikor miktarını tespit etmek için kullanılmıştır. Yurdumuzda ise Kubilay (1997) doktora tez çalışmasında gökkuşağı alabalıklarında *Y. ruckeri* ve Çamlıbel (2002) yüksek lisans tez çalışmasında levrek balıklarında *V. anguillarum*'a karşı serumda oluşan antikor miktarını belirlemede bu tekniği kullanmışlardır.

2.4.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) balık hastalıkları çalışmalarında antijenin varlığını göstermek, serumdaki spesifik antikorların varlığını araştırmak ve hastalık etkenlerinin serotiplendirme çalışmalarında ve hastalıklara karşı aşı geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılan serolojik bir tekniktir (Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2016).

Antikor- antijen birleşmesini ortaya çıkarmak için test sırasında antikora bağlanabilen enzim ve ona uygun enzim substratı konur. Bu teknikte antikor molekülü direkt veya indirekt enzimle antijene bağlanır. Enzimle işaretlenmiş antikor ve antijen arasındaki reaksiyonu göstermek için enzim substratı eklenir. Enzim substrat ile reaksiyona girer ve renk değişimi ortaya çıkar. Bu renk değişimi spektrofotometrede okunur (Anderson, 1974; Timur ve Timur, 2003).

ELISA'nın *P. piscicida* (Bakopoulos ve diğ., 1997), *V. anguillarum* (Galeotti ve diğ., 2013) gibi balık patojenlerinin identifikasyonunda ve bazı *Vibrio* türlerinin serotiplendirilmesinde (Espelid ve diğ., 1991; Mikkelsen ve diğ., 2007) başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir.

Romestand ve diğ. (1993) vibriosis hastalığının hızlı teşhisinde bu tekniği kullanmıştır. Bazı araştırmacılar ise farklı balık türlerinde hastalıklara karşı geliştirilen aşı çalışmalarında serumdaki antikor seviyesini belirlemede bu tekniği kullanmışlar ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Gudmundsdottir ve diğ. (2009) morina balıklarına, Galeotti ve diğ. (2013) levrek balıklarına karşı geliştirdikleri *V. anguillarum* aşıları ile ilgili çalışmalarında bu tekniği kullanmış ve aşıya karşı gelişen serumdaki antikor seviyesini başarılı olarak tespit etmişlerdir. Bakoupoulos ve diğ. (2015) levrek balıklarında uyguladıkları *P. piscicida* aşısı ile ilgili yaptıkları çalışmada, Ho ve diğ. (2011) kobi (*Rachycentron canadum* L.) balıklarında, Andreoni ve diğ. (2013) ise levrek balıklarında *P. piscicida* aşısı çalışmalarında serumdaki antikor miktarını ölçerek aşının etkisini belirlemede bu tekniği kullanmışlardır. Yurdumuzda ise bu teknik Akaylı (2001) tarafından kültür çipura balıklarındaki vibriosisin teşhisinde kullanılmıştır.

2.4.3. Western Blot Tekniği

Western blotting testi ile bakteri türüne özgü proteinin, aynı türe karşı özel olarak geliştirilen monoklonal veya poliklonal antikorlar ile tespiti gerçekleştirilir (Brunette, 1981). Bu teknik çeşitli araştırmacılar tarafından *A. salmonicida* (Chart ve diğ., 1984), *V. anguillarum* (Cipriano ve diğ., 1985; Norqvist ve diğ., 1989; Santos ve diğ., 1997), *P. piscicida* (Bakopoulos ve diğ., 1997) ve *A. hydrophila* (Dooley ve diğ., 1986) gibi balık patojenlerinin teşhisinde ve teşhisin konfirmasyonunda, Knappskog ve diğ., (1993) morina balıklarında *V. anguillarum*'un izolasyonu ve serotiplendirme çalışmalarında, Ho ve diğ., (2011), *P. piscicida*'ya karşı aşı geliştirilmesi ile ilgili çalışmada, Mikkelsen ve diğ., (2011) ise vibriosise karşı aşılanan morina balıklarında aşıya özgü olarak oluşan spesifik antikorların tespitiyle ilgili çalışmada kullanmıştır.

2.4.4. Floresan Antikor Testi (FAT)

Floresan Antikor Tekniği (FAT) 1950'li yıllardan bu yana birçok bakteriyel balık hastalık etkenlerinin dokuda araştırılmasında veya balıklarda antijen ya da antikorların araştırılmasında kullanılmış ve hızlı sonuç alındığından dolayı sıklıkla tercih edilen bir yöntem olmuştur (Anderson, 1974; Anderson, 1990; Timur ve Timur, 2003; Kubilay ve Timur, 2001; Austin ve Austin, 2016). Floresan Antikor Tekniğinde antikor moleküllerinin bazı floresan boyalara olan duyarlılık özelliği ile antikorların spesifik antijenlere olan duyarlılık özelliklerinden yararlanılmaktadır. Floresan içeren boyalar antikorlara bağlanır ve antijen ile reaksiyona giren

antikorların görüldüğü bölgelerde UV ışığı floresan boyayı ortaya çıkarır. Bu teknikler direkt Floresan Antikor Tekniğı (FAT) ve indirekt (IFAT) boyama yöntemleri ile uygulanır (Anderson, 1974; Plumb ve Bowser, 1983).

Bu tekniğı (Nelson ve diğ., 1985) gökkuşuğı alabalıklarında *V. anguillarum*'un identifikasyonunda, yurdumuzda ise (Kubilay, 1997; Kubilay ve Timur, 2001) yersiniosisin teşhisinde ve *Y. ruckeri*'ye karşı aşılannmış gökkuşuğı alabalıklarında gelişen spesifik antikorların tespitinde kullanmışlardır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEME

3.1.1. Balık Materyali Temini

Bu projede incelenen levrek balıklarının temini için Temmuz 2015-Temmuz 2016 tarihlerini kapsayan 1 yıllık süreçte Ege Bölgesi'nde bulunan bir işletmeye 5 kez gidilerek aşılanmış ve aşılanmamış balıklardan (kontrol amacıyla) örnekleme yapılmıştır. Tez projesinin kabul edilme zamanına ve işletmenin aşılama takvimine bağlı olarak beş kez, belirlenen tarihlerde (temmuz, ekim, kasım, nisan ve haziran aylarında) bu işletmeye gidilmiştir. *V. anguillarum* serotip O1 ve *P. piscicida*'ya karşı geliştirilmiş karma aşıyla enjeksiyon yöntemiyle aşılanmış ağırlıkları 10-100 g arasında değişen 60 adet aşılanmış ve 20 adet aşılanmamış levrek balığı 0.5 ppm oranında 2-fenoksietanol içeren su içerisinde anesteziye tabi tutulmuştur.

3.1.2. Araştırmanın Yapıldığı Yer

Örnekleme için temin edilen aşılanmış balık örnekleri deniz kafeslerinden çıkartıldıktan sonra işletmeye ait deniz üstündeki sabit bir çalışma alanına getirilmiştir. Aşılanmış balıklardan kan ve serum örneklerinin toplanması yanı sıra bakteriyolojik ekimlerle ilgili çalışmalara burada devam edilmiştir.

Saha örnekleme çalışmalarında temin edilen serum örnekleri diğer incelemeler için İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Bölümü Balık Hastalıkları-Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilmiştir. Lam aglütinasyon, Micro-well aglütinasyon ve ELISA çalışmaları bu laboratuvarda gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Balıklardan Kan ve Serum Örneklerinin Elde Edilmesi

Anestezi işlemi yapılan balıklardan steril bir şekilde kan örnekleri alınmıştır. Bu amaçla balığın kaudal venasının bulunduğu kuyruk sapı bölgesi dezenfekte edilmiş ve daha sonra steril bir enjektör yardımı ile buraya girilerek kan örnekleri elde edilmiştir (Ellis, 1988; Timur ve Timur, 2003). Şekil. 2'de görüldüğü gibi alınan bu kan örnekleri ticari olarak satılan ve kanın serum kısmının ayrışması için kullanılan tüplere konulmuştur. Örnekler bir saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra soğuk zincirde (+4°C) muhafaza edilerek İ. Ü. Su Bilimleri Fakültesi Balık

Hastalıkları-Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na getirilmiştir. Sonraki aşamada ise bu kan örnekleri soğutmalı santrifüjde +4°C' de 2500 rpm'de 15 dak.'lık süreyle santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı serum kısmı Pasteur pipeti yardımıyla dikkatli bir şekilde steril eppendorflara eşit hacimde bölünmüştür. Elde edilen örneklerin yakın zamanda araştırmada kullanılacak olan miktarı derin dondurucuda (-20 °C'de) muhafaza edilirken, daha ileriki çalışmalarda kullanacak olduğumuz serum örnekleri ise TÜBİTAK tarafından desteklenen bir önceki projemizden temin edilen Labconco marka liyofilizatör ile liyofilize hale getirildikten sonra saklanmıştır.



Şekil 3.1: Çiftlik ortamında balıklardan kan alma işlemi.

3.1.4. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri, Kimyasallar, Antiserum ve Konjugatlar

Çalışmada referans bakteri olarak kullanılan *V. anguillarum* serotip O1 ve *P. piscicida* suşlarının bakteriyolojik özelliklerinin konfirmasyonu için yapılan testlerde Tryptic Soy Agar (Merck, 1.05458), TrypticSoy Broth (Merck, 1.05459), TCBS agar besiyeri (Merck, 1.10263), Nutrient Broth (Merck 105443), Oksidasyon/Fermentasyon Hugh Leifson bazal besi yeri (Merck 110280), Agar Agar (Merck 101613), Methyl Red/Voges Proskauer (HiMedia, M070), Nitrat Broth (Merck 110204), Üre Agar bazal besiyeri (Merck, 1.08492), Üre (Merck 108486), Simon's Sitrat Agar (Merck 102501), Eskulin Agar (HiMedia, M493), L-arjinin-monohidroklorit (Merck 1015440), Jelatin (Merck 104078), Nişasta (Merck, 1.01253), D-mannitol (Merck 5980), laktoz monohidrat (Merck, 1.07657), D-fruktoz (Merck, 1.05323), D-xylose (Merck, 816 M195789), L-ornithine monohydrochoride (Merck, 1.06906), D+ galactose

(Merck, 1.04058), myo-inositol (Merck, 1.04728), L+ arabinose (Merck, 1.01492), L-lysine monohydrochloride (Merck, 1.05700), D+glukose anhydrous (Merck, 1.08337) mannoz (Merck, 105984), d-galaktoz (Merck, 104061), d-sorbitol (Doğa ilaç), trehaloz (Merck, 108216), sukroz (Merck, 107687) ve maltoz (Merck, 1.05910) kullanılmıştır.

Bu çalışmada gerçekleştirilen serolojik tekniklerde kullanılmak üzere yurt dışındaki Aquatic Diagnostics firmasından monoklonal tavşan antiserumları Anti-European sea bass (*D. labrax*) IgM monoklonal antikoru (Mab)-F01 ve *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* antikoru (Mab)-P02 satın alınmıştır. Ayrıca ELISA’da konjugat olarak da Sigma firmasının üretmiş olduğu anti-mouse IgG peroksidaz konjugatı-HRPO (Horseradish Peroxidase– A9044) yurtiçindeki aracı bir firma vasıtası ile temin edilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Bakteriyolojik Çalışmalar

Bu çalışmada referans bakteri olarak İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü’nden temin edilen bir adet referans *P. piscicida* suşu yanı sıra aynı araştırmacının yurdumuzdaki hasta levrek balıklarından izole etmiş olduğu *V. anguillarum* serotip O1 izolatu kullanıldığı için yurtdışından ayrıca bakteri teminine gidilmemiştir.

Öncelikle temin edilen bu iki adet bakterinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri Fakültemizdeki Balık Hastalıkları-Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda yürütülen çalışmalarla teyit edilmeye çalışılmıştır. Bu bakterilerin Gram, hareket, sitokrom oksidaz, katalaz, OF (Oksidasyon Fermantasyon), TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar), MR/VP, indol, nitrat, arjinin, lizin, ornitrin ve şeker testleri gibi bakteriyolojik identifikasyona yönelik testler yapılmıştır.

Örnekleme süreince her örneklemede 2’şer adet balık örneği seçilerek 2-fenoksietanol ile bayıltıldıktan sonra aseptik koşullar altında insizyon ile vücut boşluğu açılmış ve karaciğer, böbrek ve dalak gibi iç organlardan Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine ekimler yapılmıştır (Şekil. 3.2). Bu petriler 22 °C’de 3-4 gün süreyle inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2: Çiftlik ortamında balıklardan bakteriyolojik ekimlerin yapımı.

3.2.2. Serolojik İnceleme

Bu çalışmada balıklar için patojen olan mikroorganizmalardan *V. anguillarum* serotip O1 ve *P. piscicida*'ya karşı aşılanmış balık serumunda gelişen antikorların varlığını ve seviyesini tespit etmek için serolojik yöntemlerden olan lam aglütinasyon, micro-well aglütinasyon ve ELISA'yı kullanılmıştır. Bu yöntemlerde kullanılmak üzere iki patojen bakteriye özgü levrek immunoglobulinine karşı geliştirilen ve (Mab)-F01 ve (Mab)-P02 antikorları kullanılmıştır. Araştırmada aşılanmış ve aşılanmamış 10-100 g ağırlığındaki levrek balıklarının serum örneklerinde gelişen antikor seviyelerinin tespitinde lam ve micro-well aglütinasyon yöntemleri tercih edilmiştir.

3.2.2.1. Lam Aglütinasyon Testi

Aglütinasyon testi için yerli suş ve referans bakterilerimizden tüm bakteri antijenleri ve 'O' antijen örnekleri hazırlanmış ve lam aglütinasyon testinde kullanılmıştır. Test antijenleri ve balıklardan elde edilen serum örnekleri eşit hacimlerde temiz bir lam üzerine damlatılmış ve oluşan çökeltme reaksiyon sonuçları 2-3 dakika içerisinde değerlendirilmiştir (Toranzo ve diğ.,1987; Kubilay, 1997). Negatif serum örneği olarak aşılanmamış balıklardan elde edilen serum örnekleri kullanılmıştır.

3.2.2.2. *Micro-well Aglütinasyon Testi*

Micro-well aglütinasyon tekniğinde öncelikle yuvarlak tabanlı, 96 çukurlu mikropalak önceden hazırlanmış olduğumuz ve aşının içeriğinde bulunan bakteriler olan iki farklı ‘O’ antijeni (*V. anguillarum*, *P. piscicida*) ile kaplanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa aşılanmış ve aşılanmamış balıklardan elde edilen ve farklı dilüsyonları hazırlanan serum örneklerinden 100 µl’lik hacimde ilave edilmiştir.

Aşılanmamış ve farklı dönemlerde aşılanmış balıklardan farklı örneklemelerde alınan kanlardaki serumlar incelenmeye başlanmıştır. İki farklı bakteri için hazırlanan plakların her ikisinin de ilk sütununa farklı dönemde alınmış aşılanmış ve aşılanmamış balıkların kanlarından elde edilen serumlar 1/10’luk dilüsyonlar şeklinde ilave edilmiştir. Plakların ilk sütunu hariç diğer bütün çukurlarına 25 µl fizyolojik su konulmuştur. Sonrasında serumlar 1. sütundan itibaren 25 µl’si alınarak 2. sütuna eklenmiş ve karıştırılmış ve sonuçta 2. sütunda 1/20 dilüsyon elde edilmiştir. Bu işleme bütün çukurlar için devam edilerek çift katlı dilüsyonlar yapılmıştır. Daha sonra ise her çukura hazırlanmış olan antijen 25 µl olarak ilave edilmiştir. Plaklar iki saat +37 °C’de bekletildikten sonra +4 °C’de tüm gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda çukurların tabanında bulanık kenarlı çökeltilerin gözlenmesi pozitif aglütinasyon reaksiyonunu gösterirken, keskin kenarlı çökeltilerin gözlenmesi ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Toranzo ve diğ., 1987; Roberson, 1993).

Plakların 1. sütununun A, B, C, D, E, F, G ve H kuyucuklarına sırasıyla; A: 2 haftalık aşılanmış balık serumu, B: 40 günlük aşılı balık serumu, C: 2 aylık aşılı balık serumu, D: 4 aylık aşılı balık serumu, E: 6 aylık aşılı balık serumu, F: 8 aylık aşılı balık serumu, G: 12 aylık aşılı balık serumu, H: aşılanmamış balık serumu konulmuş ve soldan sağa doğru bütün kuyucuklar için çift katlı serum dilüsyonları yapılmıştır.

3.2.2.3. *Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Bu proje kapsamında; aşılanmış ve aşılanmamış levrek balıklarında patojen bakterilere karşı gelişen antikor seviyesinin ölçülmesi için ticari firmadan temin edilen antikorlar doğrultusunda ELISA uygulanmıştır. Gerçekleştirilmiş olan ELISA’da farklı araştırmacıların kullanmış olduğu metodlar modifiye edilerek uygulanmıştır (Knappskog ve diğ., 1993; Bakopoulos ve diğ., 1997; Galeotti ve diğ., 2013).

ELISA'nın uygulanma aşamasında öncelikle yerli *V. anguillarum* izolatu ve referans *P. piscicida* suşundan sonike bakteri antijenleri hazırlanmıştır. Sıvı besiyerinde 18-24 saat süreyle üretilen her bir bakteri örneği santrifüjdeki yıkama işlemlerinin ardından Fakültemiz İç Sular Anabilim Dalı'na ait laboratuvarında bulunan Bandelin Marka sonikatör kullanılarak sonike edilmiştir.

Hazırlanan bu iki farklı antijenin gömüldüğü plakların her bir kuyucuğuna karbonat/bikarbonat tampon solüsyonu ile optik yoğunluk 610_{nm}' de 1 (10⁸ hücre/mililitre) olacak şekilde hazırlanan bu antijen örneklerinden 100'er µl hacimde eklenmiştir. Plaklar buzdolabında bir gece +4 °C'de bekletilerek antijenlerin kuyucuklara yapışması sağlanmıştır. Kuyucuklar %0.05 oranında Tween 20 içeren PBS ile üç kez yıkandıktan sonra 150'şer µl Bovine Serum Albumin (BSA) içeren bloklama solüsyonu ile kaplanmıştır. Bloklama işlemi uygulanan kuyucuklara aşılınmış ve aşılınmamış balıklardan elde edilen serum örneklerinden (negatif kontrol olarak) farklı dilüsyonlar (1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/1000) denenmiş ancak 1/20 oranında sulandırılan serum örneklerinin daha kuvvetli reaksiyon vermesi nedeni ile bu dilüsyon oranı tercih edilmiş ve her bir kuyucuğa serum örneklerinden 100'er µl ilave edilmiştir.

Yapılan yıkama işlemlerinin ardından kuyucuklara bakteriye özgü monoklonal anti- levrek antikoru (Mab) üretici firmanın talimatları doğrultusunda dilüe edildikten sonra 100'er µl oranında konulmuş ve plaklar 20 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Yıkama işlemlerinin ardından peroksidaz konjugatı-HRPO (Horseradish Peroxidase- Sigma A9044-2ML) ile işaretli anti-fare immunoglobulini kuyucuklara ilave edilerek 20 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Yıkama aşamasının ardından substrat olarak kuyucuklara %0.04 ml H₂O₂ ve %0,04 mg konjugata uygun o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD-Sigma P1526-25G) substratı ilave edilmiş, 2 M H₂SO₄ (50 µl) eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Sonuçlar Bio-tek Instruments marka spektrofotometre ile 540_{nm}'de okunarak gelişen antikor seviyeleri tespit edilmiştir.

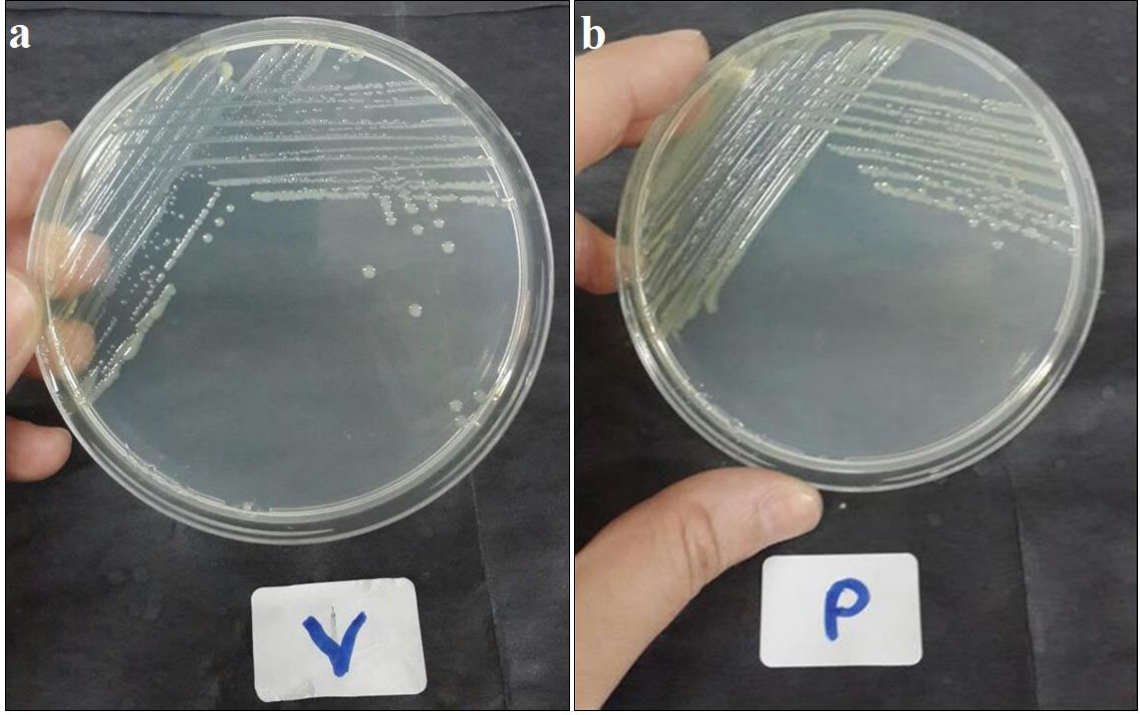
4. BULGULAR

4.1. BAKTERİYOLOJİK BULGULAR

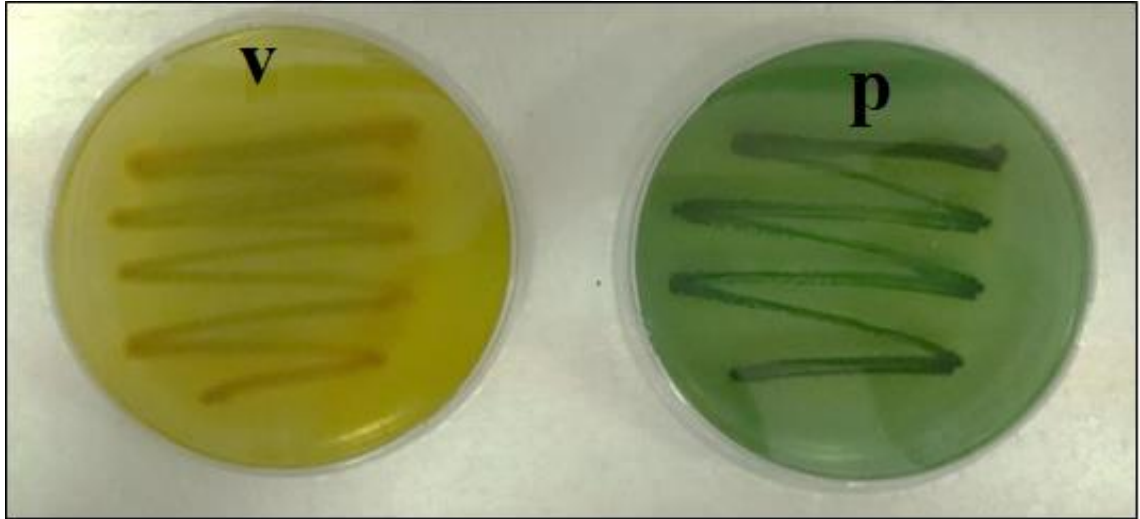
Bu çalışmada referans bakteri olarak kullanılan *V. anguillarum* serotip O1 ve *P. piscicida* suşlarının bakteriyolojik özelliklerinin konfirmasyonu için bir takım morfolojik ve biyokimyasal testler yapılmıştır.

TSA besiyerinde krem renkli koloniler (Şekil. 4.1a) oluşturan ancak TCBS besiyerinde sarı renkli koloniler oluşturan bakterilerin (Şekil. 4.2) genel olarak Gram-negatif (Şekil. 4.3), hareketli, sitokrom oksidaz, indol, VP, ONPG, sitrat testlerinin pozitif olması yanı sıra arjinin dehidrolaz testinin ve sukroz gibi bazı şekerleri kullanması ve diğer özellikleri nedeniyle bu bakteri *V. anguillarum* olarak tanımlanmıştır (Tablo. 4.1).

Bununla birlikte TSA besiyerinde beyazımsı krem renğinde koloniler oluşturan (Şekil. 4.1b), Gram-negatif (Şekil. 4.4), hareketsiz, MR testlerinde pozitif reaksiyon gösteren, indol, VP, ONPG, sitrat ve sukroz testlerinde negatif reaksiyon vermesi nedeniyle ve (Tablo. 4.1)'de belirtildiği gibi diğer biyokimyasal özellikleri nedeniyle incelenen bakteri de *P. piscicida* olarak tanımlanmıştır. İncelenen bu iki bakterinin özellikle metil red (Şekil. 4.5), indol (Şekil. 4.6), ONPG (Şekil. 4.7) ve sukroz testlerinde (Şekil. 4.8) farklı reaksiyonlar verdiği dikkati çekmiştir.



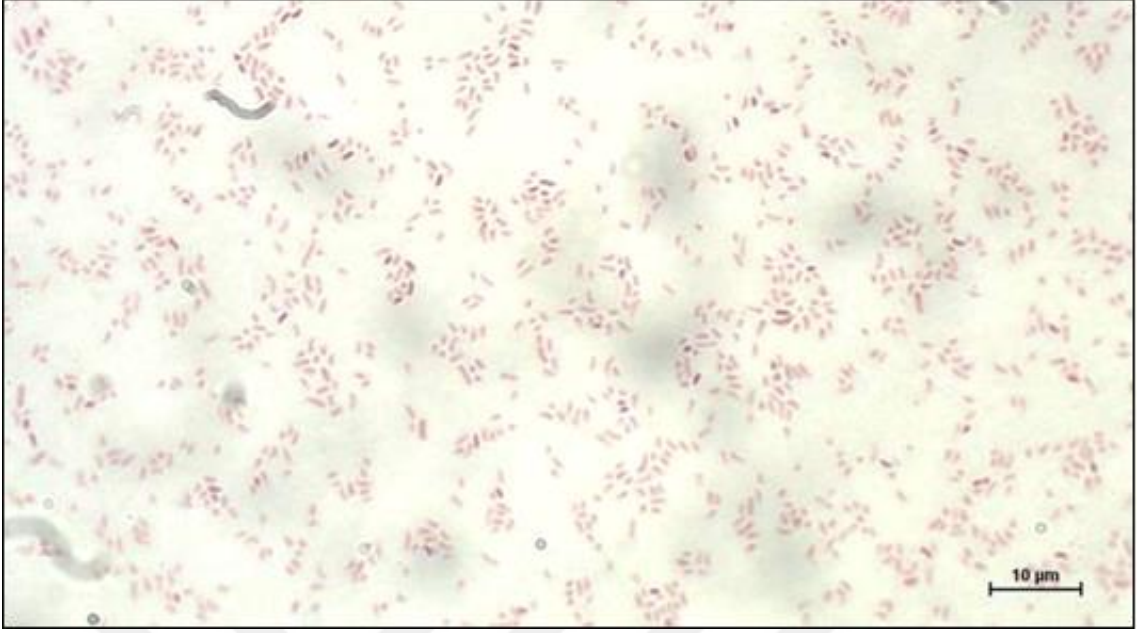
Şekil 4.1: (a) *V. anguillarum* (V) ve (b) *P. piscicida* (P) kolonilerinin petrideki (TSA) görünümü.



Şekil 4.2: *V. anguillarum* (V) ve *P. piscicida* (P) suşlarının TCBS besiyerindeki görünümü.

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan referans bakterilerin ayırt edici karakteristik özellikleri.

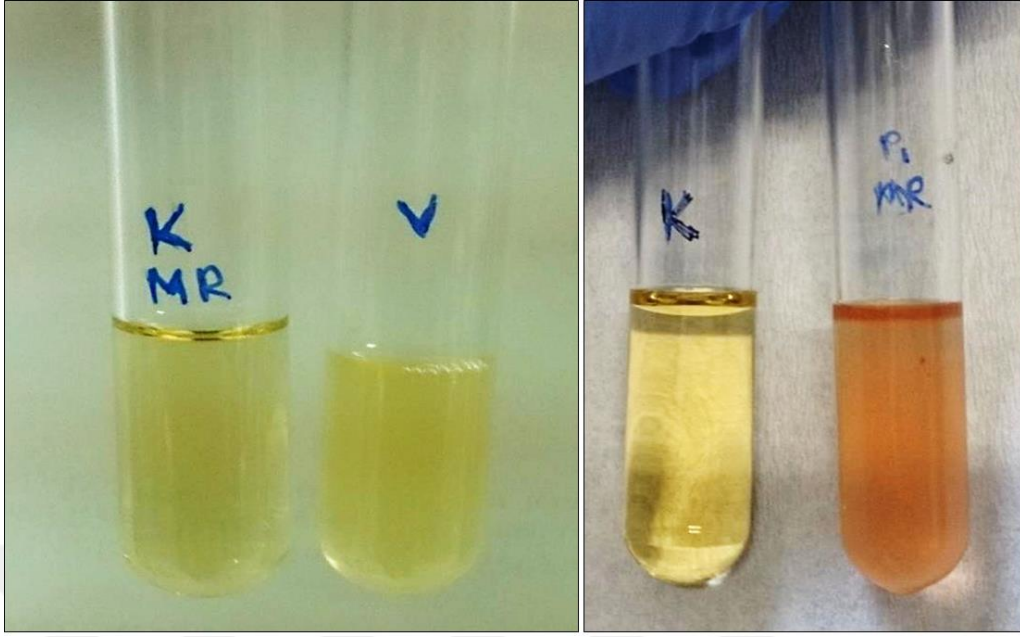
Özellikler	<i>Vibrio anguillarum</i> (yerli izolat)	<i>Pasteurella piscicida</i> (referans bakteri)
Gram boyama	-	-
Hareket	+	-
O/F	F	F
Oksidaz	+	+
Katalaz	+	+
VP	+	+
TCBS	+, S	-
İndol	+	-
ONPG	+	-
O/129'a hassasiyet	+	+
Metil Red	-	+
Nitrat	+	+
H ₂ S	-	-
Sitrat	+	-
Kazein	-	-
Hidroliz		
Arjinin	+	+
Ornitin	-	-
Lizin	-	-
Eskulin	+	+
Nişasta	+	-
Jelatin	+	-
Üre	-	-
Asit Oluşumu		
Arabinoz	+	-
Sukroz	+	-
Mannitol	+	+
Mannoz	+	+
Sorbitol	+	-
Glukoz	+	+
İnositol	-	-
Maltoz	+	-
Laktoz	-	-
Ksiloz	-	-
Trehaloz	-	+



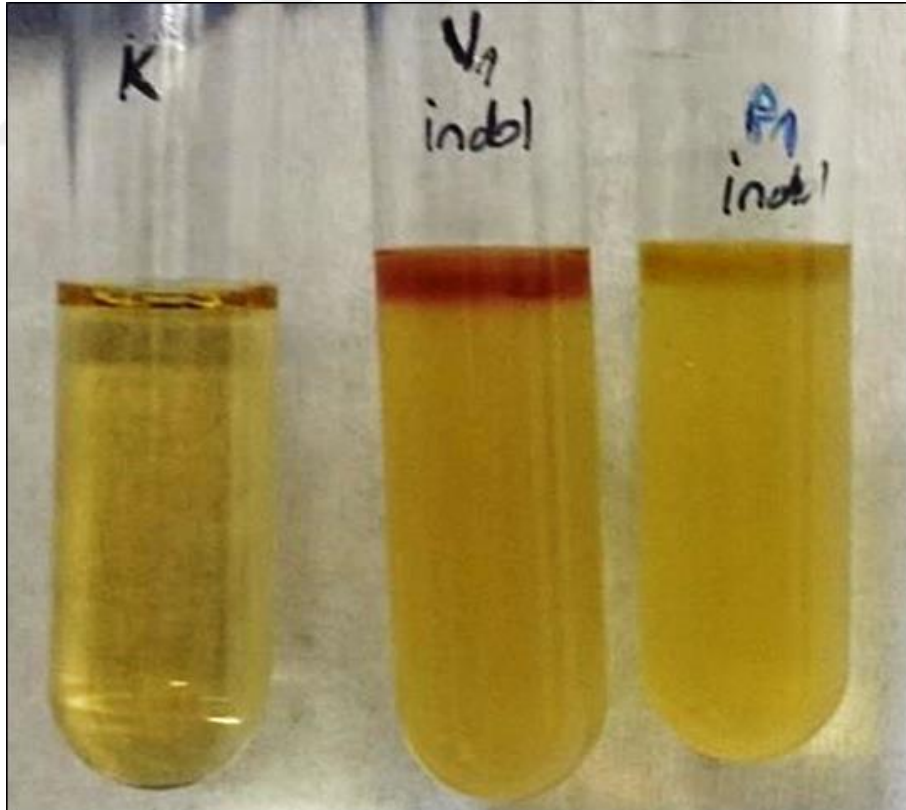
Şekil 4.3: Gram-negatif boyanma özelliği gösteren, virgöl şekilli *V. anguillarum*'a ait bakteri hücrelerinin görünümü (X1000).



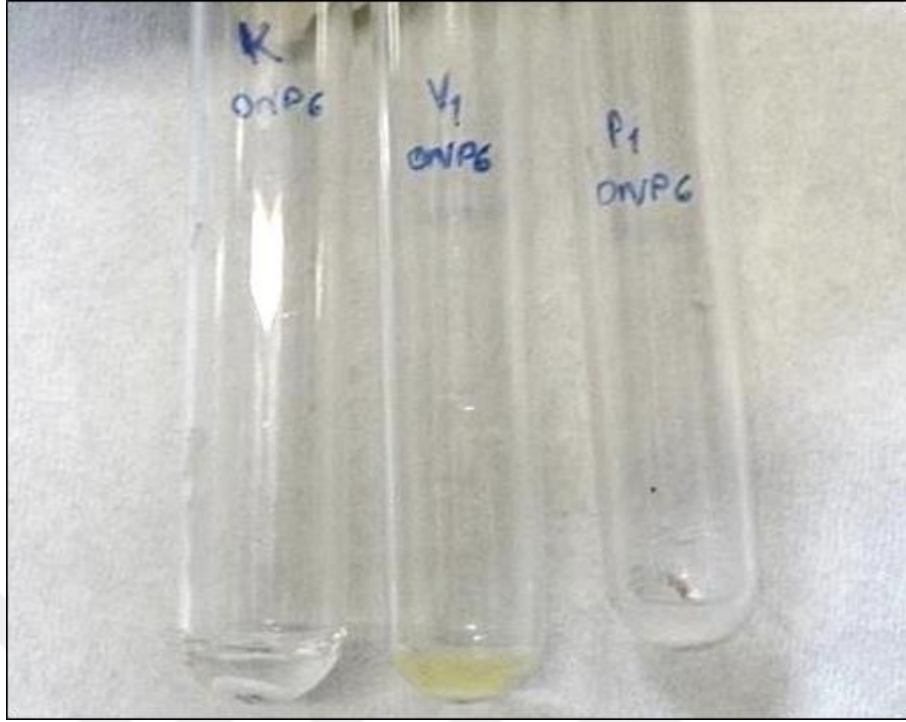
Şekil 4.4: Gram-negatif boyanma özelliği gösteren *P. piscicida*'ya ait bakteri hücrelerinin görünümü (X1000).



Şekil 4.5: Metil Red (MR) testinde K (kontrol), *V. anguillarum* (V) negatif (-) ve *P. piscicida* (P) pozitif (+) reaksiyon sonucu.



Şekil 4.6: İndol testinde K (kontrol), *V. anguillarum* (V) pozitif (+) ve *P. piscicida* (P) negatif (-) reaksiyon sonucu.



Şekil 4.7: ONPG testinde K (kontrol), *V. anguillarum* (V) pozitif (+) ve *P. piscicida* (P) negatif (-) reaksiyon sonucu.



Şekil 4.8: Sukroz testinde K(kontrol), *V. anguillarum* (V) pozitif (+) ve *P. piscicida* (P) negatif (-) reaksiyon sonucu.

Ayrıca incelediğimiz aşılanmış ve aşılanmamış balık örneklerinin iç organlarından yapılan bakteriyolojik ekimler sonucunda %1.5 NaCl içeren TSA ve TCBS besiyerlerinde *Vibrio sp.* ve *Pasteurella sp.* şüpheli herhangi bir bakteri kolonisinin üremediği gözlenmiştir. Ancak 5. örneklememizdeki aşılamanın üzerinden 15-20 gün geçen balıklarda yapılan otopsi sonucu internal anatomisinde iç organları kapsayan yağ dokusu üzerinde granülatöz lezyonlar dikkati çekmiştir (Şekil. 4.9). Diğer örneklemelerdeki incelenen balıklarda ise böyle bir durumla karşılaşmamıştır.



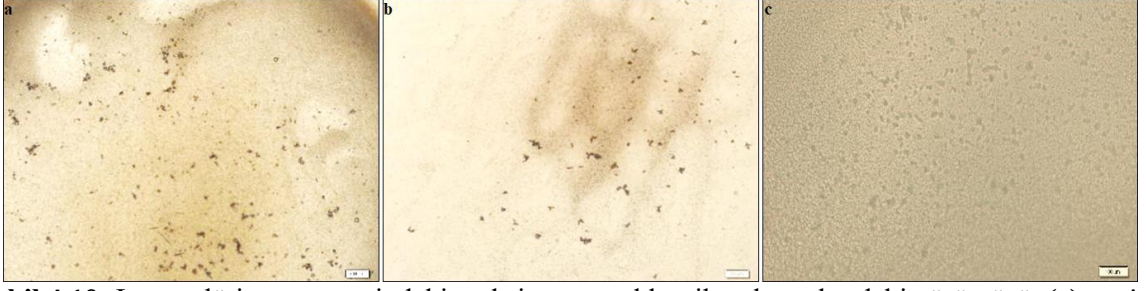
Şekil 4.9: Aşılanmış balıktaki granülatöz lezyonların görüntüsü.

4.2. SEROLOJİK BULGULAR

Bu çalışmada bivalent balık aşılı ile aşılanan ve aşılanmamış (kontrol olarak kullanılan balıklar) kültür levrek balıklarının serum örneklerindeki antikor seviyesinin belirlenmesinde lam ve micro-well aglütinasyon teknikleri yanı sıra ELISA gibi serolojik testler kullanılmıştır.

4.2.1. Lam Aglütinasyon Testi Bulguları

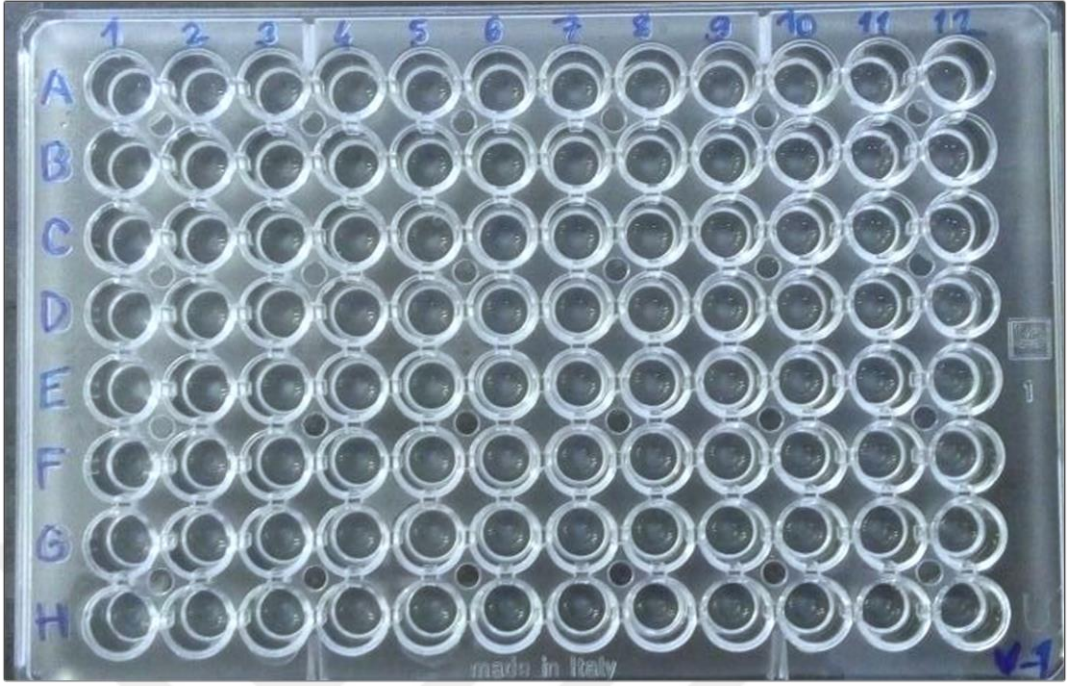
Çalışmada sonikasyon işlemine tabi tutularak hazırlanan antijen örnekleri yanı sıra 100 °C'de kaynatılarak hazırlanan 'O' antijeni olmak üzere iki tip antijen örneği kullanılmıştır. Lam aglütinasyon tekniğinde *V. anguillarum* antijeni ile reaksiyon olduğu gözlenirken (Şekil. 4.10a), *P. piscicida* antijeni ile oluşan reaksiyonun daha zayıf olduğu dikkati çekmiştir (Şekil. 4.10b). Aşılanmamış balık örneklerinden elde edilen serum örneklerinde ise ışıklı mikroskopta görüldüğü gibi beyaz çökelti oluşmaması nedeniyle negatif reaksiyon olarak kabul edilmiştir (Şekil. 4.10c).



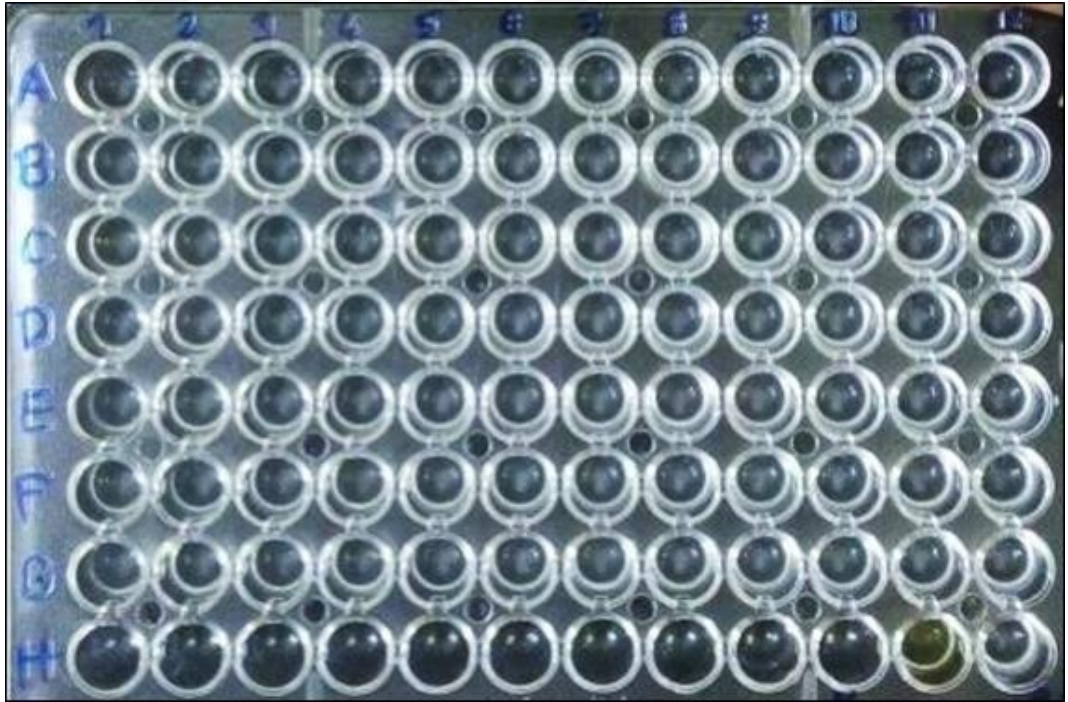
Şekil 4.10: Lam aglütinasyon testindeki reaksiyonun ışıklı mikroskop altındaki görüntüsü. (a) pozitif reaksiyon (*V. anguillarum*), (b) zayıf reaksiyon (*P. piscicida*), (c) negatif reaksiyon.

4.2.2. Micro-well Aglütinasyon Testi Bulguları

Test için iki farklı ‘O’ antijeni (*V. anguillarum* ve *P. piscicida*) ile kaplanan mikropalakların her bir kuyucuğuna örnekleme yapılan balıklardan farklı zamanlarda elde edilen ve 1/10’luk dilüsyonları hazırlanan serum örneklerinden 100’er µl’ lik hacimde ilave edilmiştir. Plak iki saat 37 °C’ de bekletildikten sonra +4 °C’ de tüm gece boyunca buzdolabında bekletilmiştir. Aşılanmamış ve farklı dönemlerde aşılanmış balıklardan alınan kan örneklerinden elde edilen serum örnekleri ile yapılan mikro-well aglütinasyon testi sonucuna göre antijen olarak aşının içeriğini oluşturan iki farklı referans bakterinin (V veya P) kullanıldığı plakların satırlarına ait kuyucukların tabanında Şekil. 4.11 ve Şekil 4.12’de görüldüğü gibi antijen-antikor birleşmesinden kaynaklanan bulanık kenarlı beyaz çökeltilerin gözlemlendiği (A-G satırları) dikkati çekmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan H satırındaki aşılanmamış balık örneklerine ait serumlarda ise herhangi çökelmenin oluşmadığı ve kontrol grubunun negatif sonuç verdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.11: *V. anguillarum* antijenine (V) ait micro-well plağının görüntüsü.



Şekil 4.12: *P. piscicida* antijenine (P) ait micro-well plağının görüntüsü.

Plaktaki örneklerin spektrofotometredeki ölçümleri sonucunda ise Tablo. 4.2’de görüldüğü gibi incelemiş olduğumuz bivalent aşının levrek balıklarında farklı dilüsyonlarda değişen antikor titreleri gösterdiği gözlenmiştir. *V. anguillarum* aşısının 40 günlük ve 4 aylık aşılınmış levrek balıklarında yüksek reaksiyon oluşturduğu gözlenirken, *P. piscicida* aşısının ise en yüksek değeri 40 günlük balıklarda gösterdiği dikkati çekmiştir.

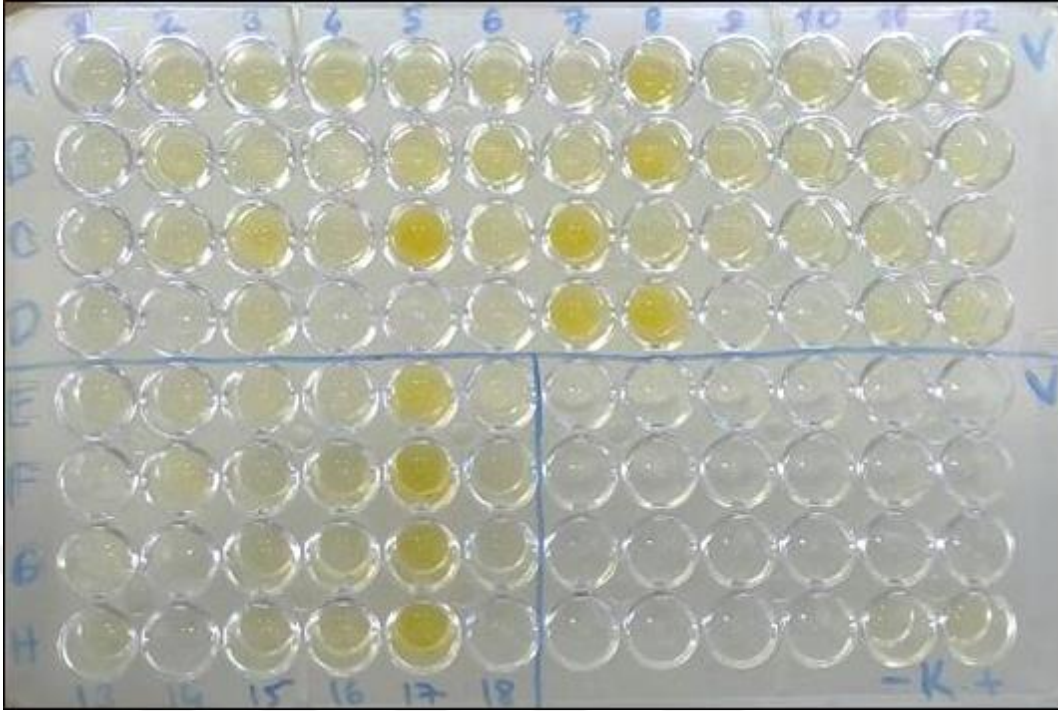
Tablo 4.2: *V. anguillarum* ve *P. piscicida*’ya karşı aşılınmış balıkların micro-well testindeki antikor titreleri.

Zaman	Serum dilüsyonları		Antikor titreleri	
	<i>V. anguillarum</i>	<i>P. piscicida</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>P. piscicida</i>
2 haftalık	1:10	1:320	0,75	0,30
40 günlük	1:10	1:160	1	0,57
2 aylık	1:10240	1:10240	0,83	0,40
4 aylık	1:10240	1:10240	0,92	0,33
6 aylık	1:10	1:2560	0,72	0,30
8 aylık	1:80	1:640	0,62	0,34
12 aylık	1:160	1:320	0,65	0,25
Aşılınmamış balık	1:2560	1:10240	0,2	0,1

4.2.3. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Bulguları

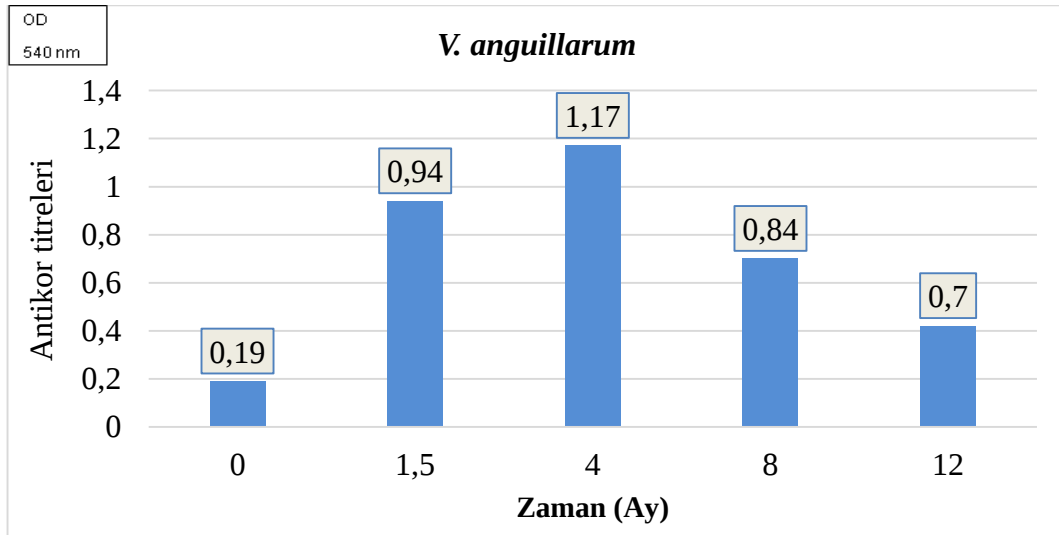
Yapılan çalışmada aşılınmamış ve farklı dönemlerde aşılınmış balıklardan elde edilen serum örneklerindeki antikor seviyelerinin tespit edilmesi ve karşılaştırılması için yürütülen ELISA’da aşının içeriğinde bulunan iki farklı patojen için *V. anguillarum* ve *P. piscicida*’nın antijen olarak kullanıldığı farklı iki plak ile ELISA uygulanmıştır.

Şekil. 4.13’de görüldüğü gibi *V. anguillarum* antijeniyle kaplı plağın 1. sütunda bulunan A, B, C ve D satırlarında ilk örneklemede aşılınmamış balıklardan elde edilen serum örnekleri ilave edildiği için antijen- antikor reaksiyonunun çok zayıf olduğu tespit edilmiştir. En kuvvetli reaksiyon ise 5. sütunda bulunan 40 günlük aşı balıklardan ve 7.-8. sütunlarda bulunan farklı dönemlerde örnek alınmış 4 aylık aşılınmış balıklardan elde edilen serum örneklerinde gözlemlenmiştir. 12 aylık aşılınmış balıklarda ise bir grubun (yukarıdan aşağıya doğru 17. sütundaki 4 farklı balık serumu) yüksek reaksiyon verdiği bununla birlikte aynı dönemdeki farklı balıklara ait serum örneklerinin (yukarıdan aşağıya doğru 18. sütundaki 3 farklı balık serumu) daha düşük reaksiyon verdiği dikkati çekmiştir. Diğer sütunlardaki serum örneklerinde oluşan antijen-antikor reaksiyonun düşük reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir.



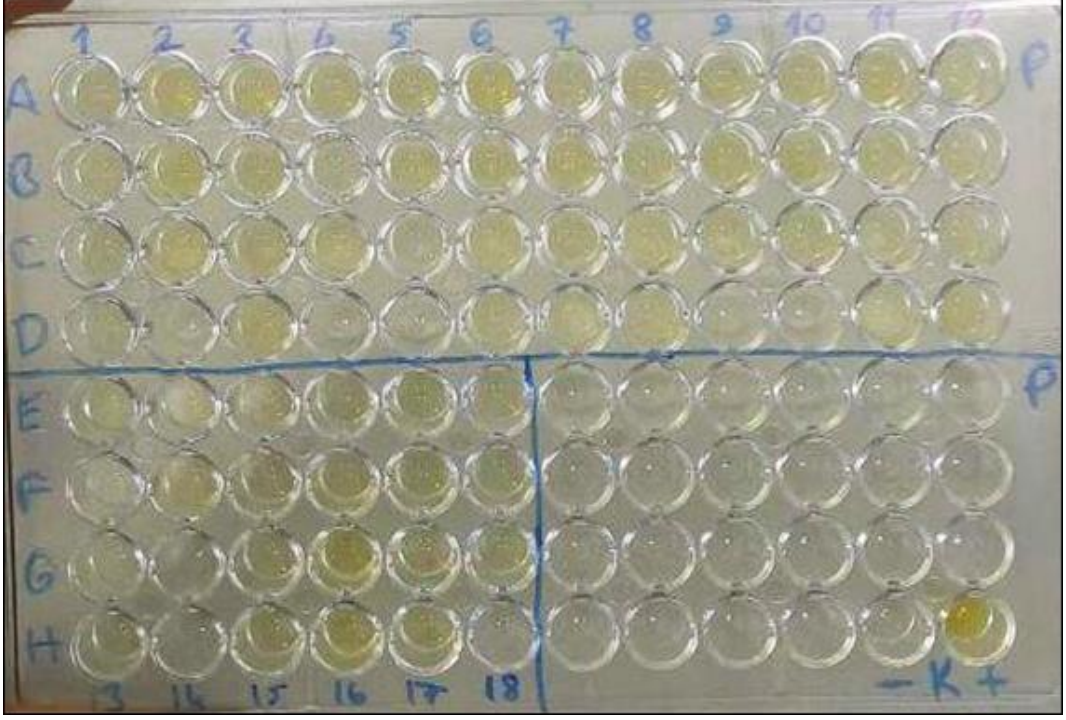
Şekil 4.13: *V. anguillarum* antijeniyle kaplı ELISA plağının görünümü.

Bu ELISA plağındaki kuyucukların spektrofotometrede 540_{nm}'de ölçümü sonucunda aşılanmamış balıklardaki antikor seviyesi 0,19, 40 günlük aşılı balıklarda 0,94 ve 4 aylık aşılı balıklarda ise en yüksek seviye olan 1,17 olarak ölçülmüştür. Daha sonraki aylarda bu değerde düşme olduğu dikkati çekmiştir (Şekil. 4.14).

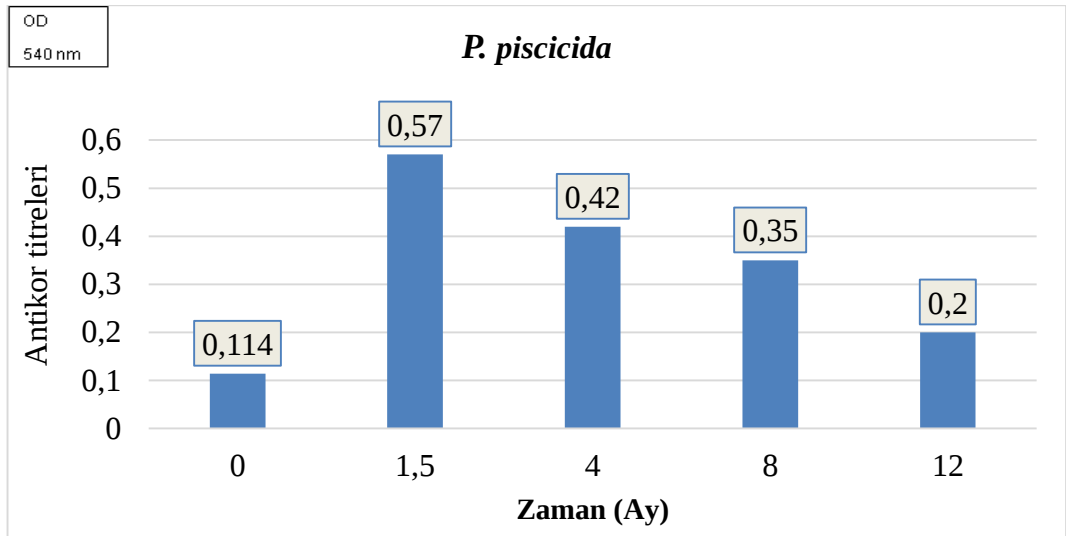


Şekil 4.14: Aşılanmamış ve aşılanmış balıklarda *V. anguillarum*'a karşı serumda oluşan antikor titrelerinin aylara göre dağılımı.

P. piscicida antijeniyle gerçekleştirilen ELISA’da ise daha zayıf reaksiyonlar gözlenmiştir (Şekil. 4.15). Açık sarı renk gösteren ve zayıf reaksiyon olarak tanımladığımız 40 günlük aşılanmış balıklara ait serum örneklerinin (5. ve 6. sütundaki 4’er örnek) yaklaşık 0,57 ölçülürken daha sonraki dönemlerde bu değerin yavaş yavaş düştüğü dikkati çekmiştir (Şekil. 4.16).



Şekil 4.15: *P. piscicida* antijeniyle kaplı ELISA plağının görünümü.



Şekil 4.16: Aşılanmamış ve aşılanmış balıklarda *P. piscicida*’a karşı serumda oluşan antikor titrelerinin aylara göre dağılımı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Vibriosis ve pasteurellosis yurdumuzdaki kültür levrek balıklarında ekonomik kayıplara neden olan önemli bakteriyel hastalıklardandır (Çağırğan, 1993; Candan ve diğ., 1996; Timur ve diğ., 1999; Korun ve Timur, 2005; Demircan ve Candan, 2006). Bu hastalıklara neden olan patojenlerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması nedeni ile (Midtlyng, 1997; Le Breton 1999; Elkamel, 2002) üreticiler hastalıkların kontrolü için bilim insanlarının geliştirdiği ve ticari firmalardan tarafından üretilen aşılari kullanmaktadırlar (Ellis, 1988; Magarinos ve diğ., 1999; Andreoni ve Magnani, 2014; Colquhaun ve Lillehaug, 2014). Bu çalışmada yurdumuzdaki yetiştiriciliği yapılan kültür levrek balıklarında enjeksiyon yöntemi ile uygulanan ve *V. anguillarum* serotip O1 ve *P. piscicida* etkenlerine karşı geliştirilmiş ticari karma aşının 1 yıllık sürede bu balıklar üzerindeki koruyucu etkisi farklı serolojik yöntemler kullanılarak tespit edilmiştir.

Kültür balıklarında banyo, enjeksiyon ve oral yolla olmak üzere farklı aşılama yöntemleri kullanılmaktadır (Ellis, 1988; Joosten, 1997; Andreoni ve diğ., 2013; Bakopoulos ve diğ., 2015). Bilim insanları immersiyon yöntemiyle yavru balıklar için kullanılan aşılarda daha çok tek bir patojeni tercih ederken, enjeksiyon yöntemi ile aşılanan daha büyük balıklarda ise monovalent veya bivalent aşılari tercih etmektedirler (Galeotti ve diğ., 2013; Gudding ve Goodrich, 2014). Yurdumuzda kültürü yapılan tatlı su ve deniz balıklarında immersiyon ve enjeksiyon yöntemlerinin kullanıldığı vibriosis, lactococcosis, yersiniosis ve pasteurellosis hastalıklarına karşı tekli veya karma aşılari yaygın olarak kullanılmaktadır (Özkesici ve diğ., 2016; Demirdelen ve diğ., 2018). Bu çalışmada incelenen balıkların büyük balıklar (10-100 g) olması nedeni ile *V. anguillarum* serotip O1 ve *P. piscicida* etkenlerine karşı geliştirilmiş ticari aşının uygulanmasında enjeksiyon yöntemi tercih edilmiştir (Ellis, 1988; Bakopoulos ve diğ., 2003; Andreoni ve diğ., 2013).

Doğadaki ve kültür balıklarının çoğunda hastalığa ve ölümlere neden olan vibriosisin en önemli etkeni *V. anguillarum* adlı bakteridir (Buller, 2004; Timur ve Timur, 2003; Noga, 2010; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2016). İlk aşılama çalışmaları daha çok bu bakteri üzerinde yoğunlaşırken, 1990'lı yıllarda üretime geçen ilk lisanslı ticari balık aşısı ünvanını da almıştır (Ellis, 1999; Sommerset, 2005; Gudding ve Van Muiswinkel, 2013; Colquhaun ve Lillehaug, 2014). Vibriosise karşı geliştirilen ve farklı balık türlerinde (morina, sazan, salmonid ve yılan

balığı gibi) kullanılan aşılar önceleri tek bir patojene (*V. anguillarum*) karşı geliştirilmiş monovalent aşılar iken daha sonraki yıllarda ise farklı *Vibrio* türleri yanı sıra *P. piscicida*'yı da kapsayan bivalent aşı çalışmaları kültür balıklarına yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Hoel ve diğ., 1997; Gravningen ve diğ., 1998; Morinigo ve diğ., 2002; Esteve-Gassent ve diğ., 2004; Angelidis ve diğ., 2006; Arijo ve diğ., 2006; Bastardo ve diğ., 2012; Galeotti ve diğ., 2013; Mosca ve diğ., 2014; Spinos ve diğ., 2017; Marana ve diğ., 2019). Bu çalışma kapsamında incelenen levrek balıklarında ticari bir firmanın ürettiği olduğu yağ adjuvanlı karma aşı uygulanmıştır. Yurdumuzda balık aşıları ile ilgili çalışan araştırmacıların çalışmaları gözden geçirildiğinde bu kişilerin farklı balık türleri üzerinde kendilerinin *V. anguillarum*'a karşı ürettiği oldukları aşılar yanı sıra ticari balık aşılarını immersiye ve enjeksiyon yöntemiyle kullanmışlardır (Çamlıbel, 2002; Çağırğan, 2004; Ekici ve Diler 2010; Altınok ve diğ., 2013; Altınok ve diğ., 2014).

Pasteurellosis'in etkeni olan *P. piscicida* daha çok sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*) (Afonso ve diğ., 2005; Gravningen ve diğ., 2008), levrek (Gravningen ve diğ., 1998; Dos Santos, 2000; Andreoni ve diğ., 2013; Bakopoulos ve diğ., 2003; Bakopoulos ve diğ., 2015) ve çipura (Magarinos ve diğ., 1994; Dos Santos, 2001; Bakopoulos ve diğ., 2015) balıklarında hastalığa neden olduğu için hastalığın kontrolü ile ilgili yapılan aşı çalışmaları daha çok bu balıklar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Hastalığın kontrolünde farklı araştırmacılar monovalent aşıları tercih ederken (Magarinos ve diğ., 1994; Dos Santos, 2000; 2001; Bakopoulos ve diğ., 2003; Andreoni ve diğ., 2013) bazı araştırmacılar da bizim çalışmamızda olduğu gibi bivalent aşıları kullanmışlardır (Gravningen ve diğ., 1998; Afonso ve diğ., 2005; Bakopoulos ve diğ., 2015). Yeni teknolojilerle birlikte bu hastalıkla mücadelede spesifik olarak geliştirilen recombinant genomik aşılar önem kazanmakta ve denenen çalışmalarla başarılı sonuçlar elde edildiği rapor edilmektedir (Andreoni ve diğ., 2013; Galeotti ve diğ., 2013).

Yurdumuzda ise Yazıcı ve Candan (2006) karada bulunan bir levrek işletmesinde kurdukları deneysel düzenek ile balıklarda kendilerinin oluşturmuş oldukları monovalent özellikteki pasteurellosis aşısının etkisini farklı aşılama yöntemlerini kullanarak (banyo, enjeksiyon ve oral) karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Bununla birlikte bu tez çalışması kapsamında incelenen kültür levrek balıklarının pasteurellosise karşı aşılmasında balık yetiştiricilerinin daha çok ticari aşıları tercih ettiği bildirilmektedir (Yalınkılınç ve diğ., 2016; Demirdelen ve diğ., 2018).

Son yıllardaki levrek balıklarına uygulanan aşı çalışmalarına bakıldığında araştırmacıların *V. anguillarum* ve *P. piscicida* patojenlerine karşı daha çok hazırlamış oldukları deney düzeneklerinde ticari veya kendi üretmiş oldukları tekli veya karma aşılarda koruyucu etkisini deneysel çalışmalarla incelediği görülmüşken (Mosca ve diğ., 2014; Spinos ve diğ., 2017), yürütmüş olduğumuz bu tez çalışmasında olduğu gibi kafes ortamında yetiştiriciliği yapılan bu balıklara uygulanan ticari karma aşılarda etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça azdır (Özkesici ve diğ., 2016).

Farklı araştırmacıların *P. piscicida* ve *V. anguillarum*'a karşı geliştirdikleri aşılarda ile ilgili yaptıkları çalışmaları incelendiğinde aşılarda balıklardaki antikor seviyelerinin tespitinde mikro-well (Magarinos ve diğ., 1994; Estevez ve diğ., 1994; Angelidis ve diğ., 2006, Gravningen ve diğ., 2008) ve ELISA gibi serolojik teknikleri kullandıkları görülmektedir. (Bastardo ve diğ., 2012; Joosten ve diğ., 1995,1997; Vervaeke ve diğ.,2004; Gudmundsdottir ve diğ., 2009; Ho ve diğ., 2010; Andreoni ve diğ., 2013; Galeotti ve diğ., 2013; Bakopoulos ve diğ., 2015; Marana ve diğ., 2019).

Lam aglütinasyon testi bakteriyel hastalıkların teşhisinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Toranzo ve diğ., 1987; Del Pozo, 2005). Ancak bu çalışmada kullandığımız ve oldukça düşük reaksiyon veren lam aglütinasyon testinin diğer araştırmacılar tarafından aşılama çalışmalarında kullanılmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte; *P. piscicida* patojenine karşı geliştirilen aşılarda etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda araştırmacılar micro-well aglütinasyon testini benzer şekilde kullanmış ve bizim çalışmamızda olduğu gibi bu aglütinasyon testinde kuvvetli pozitif reaksiyonun oluşmadığını rapor etmişlerdir (Magarinos ve diğ., 1994, Gravningen ve diğ., 2008). Bu durumun Santos ve diğ. (2001)'de belirtmiş olduğu gibi *P. piscicida* aşısının çipura balıklarında dalak ve ön böbrek yanısıra daha çok solungaçlarda antikor seviyesini arttırdığını belirtmesi ve buna bağlı olarak antikor üreten bu organlardaki etkenlere karşı incelemiş olduğumuz aşılarda levrek balıklarında da yetersiz antikor üretiminden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

ELISA tekniği balık hastalıklarının teşhisinde, aşı geliştirilmesi ve serotiplendirme çalışmalarında kullanılan en yaygın serolojik tekniktir (Del Pozo, 2005; Austin ve Austin, 2016). Romestand ve diğ. (1993) levrek balıklarında vibriosisin hızlı teşhisinde bu tekniği kullanırken, Gudmundsdottir ve diğ. (2009) morina balıklarında *V. anguillarum* aşısına karşı gelişen antikor seviyesini bu tekniği kullanarak 0,5-1,5 arasında ölçerken, Galeotti ve diğ.

(2013) ise aşılanmış levrek balıklarındaki serumdaki antikor seviyesini maksimum 1 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmadaki aşılı levrek balıklarındaki maksimum antikor seviyesi 1.17 ölçülmüş ve bu değerin yukarıda belirtilen araştırmacılar ile benzerlik gösterdiği sonucuna varılmıştır (Gudmundsdottir ve diğ., 2009; Galeotti ve diğ., 2013). Yurdumuzdaki çalışmalara bakıldığında bu teknik Akaylı (2001) tarafından kültür çipura balıklarındaki vibriosisin teşhisinde kullanılırken, bu çalışma ile ilk kez tekniğin vibriosis veya pasteurellosis aşılarının etkinliğinin tespitinde kullanılmıştır.

P. piscicida aşıları ile ilgili olarak ELISA' yı Bakopoulos ve diğ., (2015) levrek balığındaki kendi ürettikleri veya ticari monovalent/bivalent özellik gösteren aşılarla kullanmış ve antikor seviyesini 0.8–1 aralığında ölçmüştür. Ho ve diğ. (2010) kobi (*Rachycentron canadum* L.) balıklarında 0,9, Andreoni ve diğ. (2013) levrek balıklarında etkene karşı geliştirdikleri recombinant aşı çalışmalarında aşının etkisini belirlemek amacı ile bu tekniği kullanmış ve 1,4 gibi daha yüksek antikor seviyesi elde etmişlerdir. Bu çalışmadaki ELISA sonuçlarına bakıldığında *P. piscicida* aşısına karşı aşılanmış levrek balıklarındaki antikor seviyesi en yüksek 0.57 olarak ölçülmüş ve bu değerin monovalent aşı kullanan diğer araştırmacılar farklı olduğu sonucuna varılmıştır (Ho ve diğ., 2010; Andreoni ve diğ., 2013; Bakopoulos ve diğ., 2015). Bununla birlikte bu patojen ve *V. anguillarum*'u içeren karma aşılarda levrek balıklarındaki etkisini inceleyen çalışmalarda benzer şekilde antikor seviyesi 0,3-0,5 olarak ölçülmüştür (Mosca ve diğ., 2014, Spinos ve diğ., 2017).

Balık aşılarının başarılı olup olmadığının belirlenmesinde aşının koruyucu etki süresinin tespit edilmesi oldukça önemlidir (Ellis, 1988; Bakopoulos ve diğ., 2003; Gravningen ve diğ., 2008; Gudding ve Goodrich, 2014). *V. anguillarum* ile ilgili yürütülen monovalent aşı çalışmalarına bakıldığında oral aşılarda çipura ve sazan balıklarında 57–69 gün (Joosten ve diğ., 1995), kalkan balıklarında uygulanan immersiyon ve intraperitoneal aşılarda 30 gün (Estevez ve diğ., 1994) ve levrek balıklarında uygulanan immersiyon aşılarının ise 120 günlük koruma sağladığı belirtilirken (Angelidis ve diğ., 2006) yurdumuzdaki araştırmacılar Çağırhan (2004) ise bu etkene karşı üretmiş olduğu aşının levrek balıklarında 240 gün süreyle koruma sağladığını rapor etmiştir. Spinos ve diğ., 2017'de yaptıkları çalışma ile *V. anguillarum* içeren yağ ve su bazlı iki farklı ticari aşının levrek balıklarındaki antikor seviyesinin 30. günde en yüksek seviyeye ulaştırdığını, 50-60. günden itibaren ise biraz daha düşüşe geçerek sabitlendiği ve yağ bazlı aşının 12 ay süreyle daha yüksek koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Balık sağlığı

üzerine çalışan bilim insanları *V. anguillarum* aşısının 4-6 aylık sürede maksimum koruma sağladığını (Joosten ve diğ., 1995; Gravningen ve diğ., 1998; Angelidis ve diğ., 2006) ve aşılardan 8. ayda sonra da antikor seviyesi bir miktar azalarak da olsa vibriosise karşı korumanın benzer şekilde halen devam ettiği bildirmişlerdir (Gravningen ve diğ., 1998; Çağırğan, 2004). Yürütmüş olduğumuz bu çalışmada ise diğer araştırmacılar farklı olarak yağ bazlı aşının maksimum antikor seviyesinin 2-4. ayda gözlemlendiği dikkati çekerken (Estevez ve diğ., 1994; Çağırğan, 2004; Angelidis ve diğ., 2006) bununla birlikte benzer şekilde *V. anguillarum* aşısının kültür levrek balıklarımızda 12 aylık sürede koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir.

P. piscicida ile ilgili yapılan monovalent aşı çalışmaları incelendiğinde araştırmacılar; sarıkuyruklarda intraperitoneal olarak uygulanan aşının 41 hafta (Gravningen ve diğ., 2008) ve levrek balıklarında ise aynı yöntemle aşılamanın 12 hafta süreyle etkili olduğunu belirtmişlerdir (Bakopoulos ve diğ., 2003). Bununla birlikte Spinos ve diğ. (2017) bu patojeni içeren karma aşılarla ilgili yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak su ve yağ bazlı karma aşıların oluşturduğu antikor seviyesinin daha yüksek olduğunu ve koruyucu etkisinin 12 aylık sürede devam ettiğini rapor etmişlerdir. *V. anguillarum* ve *P. piscicida*'yı içeren karma aşılarla ilgili yapılan çalışmalarda ise levrek balıklarında immersiyon ve enjeksiyon yöntemi ile uygulanan aşının 26 hafta (Gravningen ve diğ., 1998), dil balığında immersiyonla aşılamanın 4-6 ay (Arijo ve diğ., 2005) ve levrek balıklarında intraperitoneal yöntemle aşılamanın ise 30-60 gün süreyle maksimum koruma sağladığını belirtmişlerdir (Afonso ve diğ., 2005). İncelemiş olduğumuz aşının *P. piscicida*'ya karşı ise diğer araştırmacıların belirtmiş olduğu gibi (Gravningen ve diğ., 1998; Gravningen ve diğ., 2008; Afonso ve diğ., 2005) yaklaşık 45-60 günlük balıklarda yüksek koruma sağladığı gözlenirken, koruyuculuğun ilerleyen zamanlarda düşük antikor seviyesine bağlı olarak azaldığı ve 8. aydan sonra koruyucu etkisinin minimuma indiği sonucuna varılmıştır.

Farklı araştırmacılar; balık aşılarının uygulandığı kültür balıklarında adjuvan içeren aşıların yan etki olarak aşılanmış balığın iç organlarında yabancı granüloma benzeri yapıların oluşmasına neden olduğu bildirmektedir (Midtlyng 1997; Poppe ve Breck, 1997; Afonso ve diğ., 2005; Bakopoulos ve diğ., 2015). Bu araştırmacıların verilerine benzer şekilde incelemiş olduğumuz levrek balıklarıyla örnekleme çalışmalarından birinde aşılardan 15-20 gün sonra iç organları

kapsayan yağ dokusunda granüloamatöz lezyonlar gözlenirken, diğer örnekleme çalışmalarında ise buna benzer herhangi bir bulguya rastlanılmamıştır.

Sonuç olarak; 2015-2016 yıllarını kapsayan dönemde yurdumuzdaki kültür levrek balıklarında kullanılan ve *V. anguillarum* serotip O1 ve *P. piscicida* bakterilerini içeren karma aşının koruyucu etkisi yürütülen bu tez çalışması ile ortaya konulmaya çalışılmıştır. Antikor seviyesinin tespitinde kullanılan ve önemli serolojik tekniklerden olan ELISA'nın bu karma aşının etkinliğinin ve koruyuculuğunun tespitinde aglütinasyon testlerine (lam, micro-well) göre daha hassas olduğu gözlenmiştir. Bu projede elde edilen veriler doğrultusunda, ülkemizdeki kültür levrek balıklarında kullanılan ticari karma aşının vibriosise karşı koruyucu etkisinin pasteurelosise göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak aşılınmış balıklarda pasteurellosise karşı koruyuculuğun daha az etkili olduğu görülmüş olsa da yapılan bakteriyolojik ekimler sonucunda aşılınmış balıklarda bir yıllık sürede hastalık etkenine rastlanılmamıştır. Ege Bölgesi'nde bulunan ve levrek balığı yetiştiriciliği yapan özel bir firmanın talebi doğrultusunda gerçekleştirilen bu projeden elde edilen veriler doğrultusunda bu firmanın pasteurellosis gibi bakteriyel hastalıkların mevcut aşılarla başarılı şekilde kontrolünü yapabilmesi için yeni bir aşılama takvimi ve stratejisi belirlemesi gerektiğini öngörmekteyiz. Bununla birlikte; yavru levrek balıklarının öncelikle bir veya iki kez immersiyonla *P. piscicida* ile aşılması ve daha büyük bireylere ise bu aşının enjeksiyon yöntemiyle uygulanmasına bağlı olarak pasteurellosise karşı koruyucu etkisinin daha uzun süreyle devam edeceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Actis, L.A., Tolmasky, M.E., Crosa, J.H., 1999, *Vibriosis*, fish diseases and disorders, Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections, In: Woo, P.T.K., Bruno, W. (eds.), Chapter 15, CAB International Publication, UK, 570-606.
- Adams, A., Aoki, T., Berthe, F.J., Grisez, L., Karunasagar, I., 2008, Recent technological advancements on aquatic animal health and their contributions toward reducing disease risks, *Diseases in Asian Aquaculture*, 6, 71-88.
- Afonso, A., Gomes S., Silva, J. Da., Marques, F., Henrique, M., 2005, Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis, *Fish and Shellfish Immunology*, 19, 1-16.
- Akan, M., Yıldız, H., Özgür, M., Atay, D., 1996, A case of vibriosis caused by *vibrio anguillarum* in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Journal of Health Sciences of Yüzüncü Yıl University*, 2 (1-2), 40-43.
- Akaylı, T., 2001, *Kültür çipura balıklarında (Sparus aurata, L 1758) vibriosis'in ELISA ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Alpbaz, A., 2005, *Su ürünleri yetiştiriciliği* (1. Baskı), İzmir: Alp yayınları, ISBN: 975- 97056-1-3.
- Altınok, İ., Çapkın, E., Boran, H., Terzi, E., 2013, Vaccination of rainbow trout with the aroA and aroC mutant *Listonella anguillarum*, *The 5th Congress of European Microbiologists*, Leipzig, Almanya, 10-12.
- Altınok, İ., 2014, AroA ve aroC mutant *Yersinia ruckeri* ve *Vibrio anguillarum*' un canlı aşısı olarak kullanılması, TÜBİTAK Projesi 1001.
- Anderson, D.P., 1974, *Fish immunology*, T.F.H. Publications Inc. Ltd., ISBN: 0-87666-036-7.
- Anderson, D.P., 1990, *Fluorescent antibody test*, Fish immunology technical communications-1 (FITC), In: Stolen, J.S, Fletcher, T.C., Anderson, D.P, Roberson, B.S., Van Muiswinkel, W.B. (eds.), SOS Publication, USA, ISBN: 0962550507.
- Andreoni, F., Boiani, R., Serafini, G., Amagliani, G., Dominici, S., Riccioni, G., Zacccone, R., Mancuso, M., Scapigliati, G., Magnani, M., 2013, Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate, *Vaccine*, 31(5), 820-6.
- Andreoni F. ve Magnani M., 2014, Photobacteriosis: Prevention and diagnosis, *Journal of Immunology Research*, Volume 2014, 7.
- Angelidis, P., 2006, Immersion booster vaccination effect on sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Juveniles, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90 (1-2), 46-9.
- Angelidis, P., Karagiannis, D., Crump, E.M., 2006, Efficacy of a *Listonella anguillarum* (syn. *Vibrio anguillarum*) vaccine for juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Diseases of Aquatic Organisms*, 71,19-24.

- Arijo, S., Rico, R., Chabrillon, M., Diaz-Rosales, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Magarinos, B., Toranzo, A.E., Morinigo, M.A., 2005, Effectiveness of a divalent vaccine for Sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Journal of Fish Diseases*, 28, 33–38.
- Athanassopoulou, F., Sabatakou, O., Groman, D., Prapas, T., 1999, First incidence of Rickettsia-like infections in cultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in Greece, *European Association of Fish Pathologist 9th International Conference ‘Disease of Fish and Shell Fish’ Abstract Book*, Rhodes, Greece, 72.
- Austin, B., Austin, D. A., 2016, *Bacterial fish pathogens disease of farmed and wild fish*, 6th Edition. London: Springer.
- Avsever, M.L., Onuk, E.E., Türk, N., Tunalıgil, S., Eskiizmirli, S., İnçoğlu, Ş., Yabanlı, M., 2012, Ege Bölgesi’nde kültüre edilen levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipuralardaki (*Sparus aurata*) pasteurellozis vakaları ve bu vakalardan izole edilen diğer bakteriler, *Borvova Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 34 (48), 9-16.
- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H., 1995, Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy, *Journal of Fish Diseases*, 18, 1-7.
- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H., 1997, Production and characterization of monoclonal antibodies against *Pasteurella piscicida*, the causative agent of fish pasteurellosis, *Journal of Fish Diseases*, 20, 307-315.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galeotti, M., Adams, A., Dimitradis, G. J., 2003, Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* using novel vaccine mixtures, *Journal of Fish Diseases*, 26, 77-90.
- Bakopoulos, V., Nikolaou, I., Kalovyra, N., Amirali, E., Kokkoris, G., Spinos, E., 2015, Prevention of fish photobacteriosis. Comparison of the efficacy of intraperitoneally administered commercial and experimental vaccines, *Mediterranean Marine Science*, 16-2.
- Bakopoulos, V., Kosma, I., Laspa, E., 2017, Quantitative and qualitative analysis of sea bream, *Sparus aurata* (L.), humoral immune response, vaccinated with commercial and experimental vaccines against vibriosis and photobacteriosis, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1-11.
- Barnabe, G., 1990, Rearing bass and gilthead bream, *Aquaculture*, 2 (4), 647-686.
- Bastardo, A., Ravelo, C., Castro, N., Calheiros, J., Romalde, J.L., 2012, Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Fish and Shellfish Immunology*, 32, 756-761.
- Benegal, T.B., 1972, *The Observer’s book of sea fishes*, Frederick Warne and Co. LTD., Newyork, London, ISBN: 072321509.
- Bergman, A.M., 1909, Die rote Beulenkrankheit des Aals, *Bericht aus der Königlichen Bayerischen Versuchsstation*, 2, 10–54.
- Breuil, G., Haffner, P., 1989, A field report on *Vibrio* Disease of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in the south of France, *Advances in Tropical Aquaculture*, 9, 161-169.

- Bruno, D.W., Alderman, D.J., Schlotfeldt, H.J., 1997, *What should i do? A practical guide for the marine fish farmer*, ISBN: 0-9526242-2-2.
- Brunette, W.N., 1981, Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody radioiodinated protein, *Analytical Biochemistry*, 112, 195-203.
- Buller, N. B., 2004, *Bacteria from fish and other aquatic animals a practical identification manual* (1. Baskı). CABI, London.
- Candan, A., 1993, *Vibrio anguillarum* infection in *Sparus aurata* L. 1758, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 23, 25-27.
- Candan, A., Küçüker-Ang, M., Karataş, S., 1996, Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16(5), 195-196.
- Candan, A., Karataş, S., 2010, *Balık sağlığı*, İstanbul: Kalmak Ofset.
- Canestrini, G., 1893, La malatti dominate delle anguille, *Atti Institute Veneto Service*, 7, 809–814.
- Chart, H., Shaw, D.H., Ishiguro, E.E., Trust, T.J., 1984, Structural and immunochemical homogeneity of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide, *Journal of Bacteriology*, 158 (1), 16-22.
- Christofilogiannis, P., 1993, *The Veterinary approach to sea-bass and seabream, Aquaculture for Veterinarians: Fish husbandry and medicine (First Edition)*, England: Pergamon Press Ltd.
- Cipriano, R.C., Pyle, J.B., Starliper, C.E., Pyle, S.W., 1985, Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by the dot blot assay, *Journal of Wildlife Diseases*, 21(3), 211- 218.
- Colquhoun, D.J., Lillehaug, A., 2014, *Vaccination against vibriosis*, Fish vaccination, In: Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, O. (eds.), Chapter 15, Wiley & Sons, New York, 172-184.
- Collado, R., Fouz, B., Sanjuán, E., Amaro, C., 2000, Effectiveness of different vaccine formulations against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* Serovar E (biotype 2) in European Eels (*Anguilla anguilla*), *Diseases of Aquatic Organisms*, 43, 91–101
- Colorni, A., Ankaoua, M., Diamant, A., Knibb, W., 1993, Detection of Mycobacteriosis in fish using the Polymerase Chain Reaction Technique, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 13, 195-198.
- Colorni, A., Ucko, M., Knibb, W., 1996, *Epizootiology of Mycobacterium spp. in seabass, seabream and other commercial fish*, In: seabass and seabream culture: Problems and prospects, *European Aquaculture Society Specific Publications*, Verona, Italy, 259-261.
- Colorni, A., Diamant, A., Kvitt, H., Zlotkin, A., 2002, *Streptococcus iniae* infections in red sea cage-cultured and wild fishes, *Diseases of aquatic Organisms*, 49 (3), 165-170.
- Comps, M., Raymond, J.C., Plassiart, G.N., 1996, *Rickettsia*-like organism infecting juvenile seabass *Dicentrarchus labrax*, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16 (1), 30-33.
- Çağırğan, H., 1993, The first isolation of *Pasteurella piscicida* from cultured seabream (*Sparus aurata*) in Turkey, *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 3 (2), 82-83.

- Çağırğan, H., Yürekli Türk, O., 1996, Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma, *Bornova Veterinerlik Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi*, 21, 113-122.
- Çağırğan, H., 2004, Levrek yavrularında (*Dicentrarchus labrax* L.) vibriosise karşı aşı geliştirilmesi, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21 (3-4), 271-274.
- Çamlıbel, U.R., 2002, *Levrek balıklarında (Dicentrarchus labrax L.) Vibrio anguillarum bakterinine karşı oluşan antikor reaksiyonunun aglütinasyon testleri ile ortaya çıkarılması üzerinde bir çalışma*, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çanak, Ö. ve Timur, G., 2017, Staphylococcal infections of marine fishes cultured in Turkey, *Aquaculture Europe 2017*, 17-20 Ekim 2017 Dubrovnik, Hırvatistan, 175-176.
- Çelikkale, M.S., Düzgüneş, E., Okumuş, D., 1999, *Türkiye su ürünleri sektörü potansiyeli, mevcut durumu, sorunları ve çözüm önerileri*, İstanbul Ticaret Odası, Yayın no: 1999-2.
- Dalmo, R.A., Ingebrigsten & Bøgvold, K., 1997, Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES), *Journal of Fish Diseases*, 20, 241-273.
- Çolak, H.S., 1991, *Deniz levreklerinde (Dicentrarchus labrax L.) deneysel olarak oluşturulan pasteurellosis hastalığının patogenezi ve kemoterapatlere olan duyarlılığı*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.
- Daly, J.G., 1999, Other bacterial pathogens, *Fish diseases and disorders*, Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections, CAB International Publication, UK, 577-584.
- Del Pozo, J., 2005, *Studies on monoclonal antibodies characterization and immunohistochemical detection of Lactococcus garvieae*, Institute of Aquaculture University of Stirling, Aquaculture e-Theses.
- Demircan, M.D., 2004, *Deniz balıklarında vibriozise neden olan Vibrio anguillarum'un PCR yöntemi ile tanısı*, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Demircan, D., Candan, A., 2006, Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* Gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30(3), 305-310.
- Demirdelen, D., Cengizler, İ., Aldık, R., 2018, Ege Bölgesi'nde yer alan deniz balıkları yetiştiriciliği sektöründe aşı kullanımı ve etkinliği, *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 4(2): 124-132.
- Dos Santos, N.M.S., 2000, *Development of immunity in sea bass: A study towards vaccination against pseudotuberculosis*, Cell Biology and Immunology. PhD thesis.
- Dos Santos, N.M.S., Taverne-Thiele, J. J., Barnes, A.C., Van Muiswinkel, W.B., Ellis, A.E., Rombout, J.H.W.M., 2001, The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in a *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* bacterin: an ontogenetic study, *Fish and Shellfish Immunology*, 11, 65-74.
- Dooley, J.S.G., Lallier, R., Trust, T.J., 1986, Surface antigens of virulent strains of *Aeromonas hydrophila*, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 12(1-4), 339-344.

- Duff, D.C.B., 1942, The oral Immunization of trout against *Bacterium salmonicida*, *The Journal of Immunology*, 44, 87-94.
- Ekici, S., Diler, Ö., 2010, Gökkuşluğu alabalığında *Vibrio anguillarum*'a karşı farklı aşılama yöntemlerinin yaşama oranı üzerine etkisi, *Akuakültürde Su Kalitesi ve Balık Sağlığı Çalıştayı*. Eğirdir- Isparta.
- Elkamel, A.A., 2002, Pathogenic mechanisms of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in hybrid striped bass, B.V. Sc., Assiut University, May 2002.
- Ellis, A.E., 1988, *Fish vaccination: General principles of fish vaccination*, Academic Press, London ISBN-10: 0122374851.
- Ellis, A.E., 1999, Immunity to bacteria in fish, *Fish and 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.
- Espelid, S., Rodseth, O.M., Jorgensen, T. O., 1991, Vaccination experiments and studies of the humoral immune responses in cod, *Gadus morhua* L., to four strains of monoclonal-defined *Vibrio anguillarum*, *Journal of Fish Diseases*, 14,185-197.
- Esteve-Gassent, M.D., Fouz, B., Amaro, C., 2004, Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes, *Fish and Shellfish Immunology*, 16, 93-105.
- Estevez, J., Leiro, J., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Uberia, F.M., 1994, Role of serum antibodies in protection of vaccinated turbot (*Scophthalmus maximus*) against vibriosis, *Aquaculture*, 123(3-4), 197-204.
- Evelyn, T.P.T., 1997, A historical review of fish vaccinology, *Developments in Biological standardization*, 90, 3-12.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), *Species Fact Sheets*, http://www.fao.org/fi/common/format/popUpImage.jsp?xp_imageid=720065&xp_showpos=1, [Ziyaret Tarihi: 08.05.2019].
- Froese, R., Pauly, D., 2019, *FishBase, Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)*, Accessed through: *World register of marine species*, <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=126975>, [Ziyaret Tarihi: 08.06.2019].
- Fukuda, Y., Kusuda, R., 1981, Acquired antibody against pseudotuberculosis in yellowtail, *Fish Pathology*, 15, 263-269.
- Fukuda, Y., Kusuda, R., 1985, Vaccination of yellowtail against pseudotuberculosis, *Fish Pathology*, 20, 421–425.
- Galeotti, M., Romano, N., Volpatti, D., Bulfon, C., Brunetti, A., Tiscar, P.G., Mosca, F., Bertoni, F., Marchetti, M.G., Abelli, L., 2013, Innovative vaccination protocol against vibriosis in *Dicentrarchus labrax* (L.) juveniles: Improvement of immune parameters and protection to challenge, *Vaccine*, 31, 1223-1230.

- Göken, S. Z., 2016, *Kültür levreklerinde (Dicentrarchus labrax L.) deneysel olarak oluşturulan lactococcosisin bazı teşhis metotları ile tespiti*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gravningen, K., Thorarinsson, R., Johansen, L. H., Nissen, B., Rikardsen, K. S., Greger, E., Vigneulle, M., 1998, Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis, *Journal of Applied Ichthyology*, 14, 159-162.
- Gravningen, K., Sakai, M., Mishiba, T., Fujimoto, T., 2008, The efficacy and safety of an oil-based vaccine against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): A field study, *Fish and Shellfish Immunology*, 24, 523-529.
- Gudding, R., Van Muiswinkel, W.B., 2013, A history of fish vaccination science-based disease prevention in aquaculture, *Fish and Shellfish Immunology*, 35, 1683-1688.
- Gudding, R., Goodrich, T., 2014, *Fish vaccination*, Wiley & Sons, New Jersey, ISBN:9780470674550.
- Gudmundsdottir, S., Magnadottir, B., Björnsdottir, B., Arnadottir, H., Gudmundsdottir, B.K., 2009, Specific and natural antibody response of cod juveniles vaccinated against *Vibrio anguillarum*, *Fish and Shellfish Immunology*, 26, 619–624.
- Hassanin, M.E, El-Bouhy, M., Soad, A.M., Fadel, A.H., 2014, Vaccination of *Dicentrarchus labrax* (European Sea bass) against vibriosis, *Zagazid Veterinary Journal*, 42, 152-158.
- Harrell, L.W., Etlinger, H.M., Hodgins, H.O., 1975, Humoral factors important in the resistance of salmonid fish to bacterial diseases, I. Serum antibody protection of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis, *Aquaculture*, 6, 211-220.
- Ho, L., Lin, J.H., Liu, H., Chen, H., Chen, T., Yang, H., 2011, Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 412-419.
- Hoel, K., Saloni, K., Lillehaug, A., 1997, *Vibrio* antigens of polyvalent vaccines enhance the humoral immune response to *Aeromonas salmonicida* antigens in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Fish and Shellfish Immunology*, 7, 71–80.
- Hoşsucu, A.G., Özden, O., Korkut, A.Y., Çörüş, İ., 1990, Levrek (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) yetiştiriciliği, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, No: 25.
- Inglis, V., Roberts, R.J., Bromage, N.R., 1993, *Bacterial diseases of fish*, New York: Halsted Press.
- Iwama, G., Nakanishi, T., 1996, *The fish immun system: Organism, pathogen and environment*, Academic Press, ABD, ISBN: 0123504392.
- Jhansen, W.A., Surgella, M.J., 1968, Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for White Perch (*Roccus americanus*), *Journal of Bacteriology*, 96 (5), 1606-1610.
- Johnson, K.A., Flynn, J.K., Amend, D.F., 1982, Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins, *Journal of Fish Diseases*, 5, 207-213.
- Joosten, P.H.M., Trigueros, M.A., Sorgeloos, P., Rombout, J.H.W.M., 1995, Oral vaccination of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) with bioencapsulated *Vibrio anguillarum* bacterin, *Fish and Shellfish Immunology*, 5, 289-299.

- Joosten, P.H.M., Tiemersma, E., Threels, A., Caumartin-Dhieux, C., Rombout, J.H.W.M., 1997, Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles, *Fish and Shellfish Immunology*, 7, 471-485.
- Karataş, S., Candan, A., Demircan, D., 2005, Atypical *Aeromonas* infection in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Black Sea, *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57 (4), 255-263.
- Kawakami, H., Sakai, M., 1996, Comparison of succetibility of seven fishes to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 19 (4), 153-155.
- Kawakami I.H., Shinohara, N., Sakai, M., 1998, The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, m-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail, *Fish Pathology*, 33 (4), 287- 292.
- Kent, M.L., Poppe, T.T., 2002, *Infectious diseases of coldwater fish in marine and brackish water*. Diseases and disorders of finfish in cage culture, In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W., Lim, L.H.S. (eds.), Chapter 3, CAB International, UK, ISBN: 0851994431, 61.
- Kissil, G.W., Tandler, A., Colorni, A., Elizur, A., 2000, *Sea bass culture*, Encyclopedia of Aquaculture, In: Stickney, R.R. (ed.), Wiley & Sons, USA.
- Klein, B.U., Siesenop, U., Böhm, K.H., 1996, Investigations on transferable antibiotic resistance through R – plasmids between obligate and facultative fish pathogenic bacteria, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16 (4), 138-141.
- Knappskog, D.H., Rodseth, O.M., Slinde, E., Endresen, C., 1993, Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from vibriosis, *Journal of Fish Diseases*, 16, 327-338.
- Korun, J., 2004, *Kültür Levrek Balıklarında (Dicentrarchus labrax) Vibriosis ve Pasteurellosis' in bazı diagnostik kitler ve laboratuvar yöntemleri ile teşhisi üzerinde bir çalışma*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi.
- Korun, J., Olgaç, V., Akgün-Dar, K., Colorni, A., Diamant, A., 2005, Mycobacteriosis in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L., cultured in Turkey, *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57 (4), 215-222.
- Korun, J., Timur, G., 2005, The first pasteurellosis case in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at low marine water temperatures in Turkey, *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57, 197-206.
- Korun, J., 2006, Kültürü yapılan çipuralarda (*Sparus aurata* L.) görülen *Listonella anguillarum* enfeksiyonu üzerine bir çalışma, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23 (1/2): 259-263
- Korun, J., Timur, G., 2008, Marine vibriosis associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Journal of Fisheries Sciences*, 2(1), 66-76.
- Korun, J., Akgün-Dar, K., Yazıcı, M., 2009, Isolation of *Shewanella putrefaciens* from cultured European sea bass, (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Revue de Medecine Veterinaire*, 160(11), 532-536.

- Kubilay, A., 1997, *Gökkuşığı alabalıklarında (Onchorynchus mykiss) patojen bakteri Yersinia ruckeri' ye karşı antikor üretimi ve tespiti üzerinde bir araştırma*, Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kubilay, A., Timur, G., 2001, *Yersinia ruckeri* bakterisi ile immünize edilen gökkuşığı alabalıklarında (*Onchorynchus mykiss*) antikor üretiminin IFAT ve ELISA teknikleri ile saptanması, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 25 (4), 437-445.
- Kubilay, A., Uluköy, G., 2004, First isolation of *Staphylococcus epidermidis* from cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24 (3), 137-143.
- LaFrentz BR, LaPatra SE, Jones GR, Cain KD., 2003, Passive immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial coldwater disease and rainbow trout fry syndrome, *Journal of Fish Diseases*, 26, 377-384.
- Larsen, J.L., 1988, A succesfull vaccination trial with a trivalent vaccine, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists Journal*, 8(4), 82-84.
- Larsen, J.L., Pedersen, K., Dalsgaard, I., 1994, *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish, *Journal of Fish Diseases*, 17, 259-267.
- Le Breton, A.D., 1999, Mediterranean finfish pathologies: Present status and new developments in prophylactic methods, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 19 (6), 250-253.
- Leong, J.C., Anderson, E., Bootland, L.M., Chiou, P.W., Johnson, M., Kim, C., Mourich, D., Trobridge, G., 1997, Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies, *Developments in biological standardization*, 90, 267-277.
- Lillehaug, A., 1990, A field Trial of Vaccination against cold-water vibriosis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture*, 87 (1), 1-12.
- Magnadottir, B., 2010, Immunological control of fish disease, *Marine Biotechnology*, 12 (4), 361-379.
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Santos, Y., Casal, J.F., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1994, Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*, *Aquaculture*, 120, 201-208.
- Magarinos, B., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 1996, Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*, *Annual Review of Fish Diseases*, 6, 41-64.
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Núñez, S., Toranzo, A.E., 1999, Protection of gilthead sea bream against pasteurellosis at the larval stages, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 19 (4), 159-161.
- Marquis, H., Lallier, R., 1989, Efficacy studies of passive immunization against *Aeromonas salmonicida* in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchell), *Journal of Fish Diseases*, 12, 233-240.
- Marana, M. H., Sepúlveda, D., Chen, D., Al-Jubury, A., Jaafar, R. M., Kania, P. W., Henriksen, N. H., Krossøy, B., Dalsgaard, I., Lorenzen, N., Buchmann, K., 2019, A pentavalent vaccine for rainbow trout in Danish aquaculture, *Fish and Shellfish Immunology*, 88, 344-351.

- McDowell, M.T., Colwell, R.R., 1985, Phylogeny of the Vibrionaceae and recommendation for two new genera *Listonella* and *Shewanella*, *Systematic Applied Microbiology*, 6, 171-182.
- Memiş, D., 2010, *Deniz balıkları yetiştiriciliği*, Filiz Kitabevi, İstanbul, ISBN: 978-975-368-328-9.
- Midtlyng, P.J., 1997, Novel vaccines and new vaccination strategies for fish, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 17 (6), 239-243.
- Mikkelsen, H., Lund, V., Martinsen, L.C., Gravningen, K., Schroder, M.B., 2007, Variability among *Vibrio anguillarum* O2 isolates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Characterization and vaccination studies, *Aquaculture*, 266, 16-25.
- Mikkelsen, H., Lund, V., Larsen R., Seppola, M., 2011, Vibriosis vaccines based on various Sero-subgroups of *Vibrio anguillarum* O2 induce specific protection in Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) juveniles, *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 330-339.
- Morinigo, M.A., Romalde, J.L., Chabrillion, M., Magarinos, B., Arijo, S., Balebona, M.C., Ellis, A.E., 2002, Effectiveness of a divalent vaccine for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(5), 298-303.
- Mosca, F., Ciulli, S., Volpatic, D., Romano, N., Volpe, E., Bulfon, C., Massimini, M., Caccia, E., Galeotti, M., Tiscar, P. G., 2014, Defensive response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against *Listonella anguillarum* or *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* experimental infection, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 162, 83-95.
- Myhr, E., Larsen, J.L., Lillehaug, A., Gudding, R., Heum, M., Hastein, T., 1991, Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway, *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (9), 2750-2757.
- Nelson, J.S., Rohovec, R.S., Fryer, J.L., 1985, Location of *Vibrio anguillarum* in Tissues of Infected Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Using the Fluorescent Antibody Technique, *Fish Pathology*, 20 (2-3), 229-235.
- Noga, E.J., 2010, *Fish disease: Diagnosis and treatment*, Second Edition. Wiley- Blackwell. USA.
- Norqvist, A., Hagstrom, A., Wolf-Watz, H., 1989, Protection of rainbow trout against Vibriosis and Furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (6), 1400-1405.
- Olesen, N.J., 1991, Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterin by ELISA, *Journal of Applied Ichthyology*, 7, 36-43.
- Özesen Çolak H.S., Timur G., 2007, Pathogenesis Of Photobacteriosis Experimentally Induced In Sea Bass, *J. Aquat. Biol. & Fish*, 11, 1115-1124.
- Özkesici, B., Korkut, A. Y., Kop, A., Babaoğlu, A. Ö., 2016, Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) balıklarında aşılamanın beslenme ve gelişim üzerine etkisi, *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33 (2): 157-162.
- Pedersen, K., Grisez, L., Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F., Larsen, J.L., 1999, Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven O-serogroups, *Current Microbiology*, 38 (3), 183-189.

- Plumb, J.A., Bowser, P.R., 1983, *Microbial fish disease laboratory manual*, Albana: Brown Printing Company,
- Post, G., 1987, *Text book of fish health*, T.F.H Publications, New Jersey, ISBN:0866224912.
- Poppe, T.T., Breck, O., 1997, Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine, *Diseases of Aquatic Organisms*, 29, 219-226.
- Roberts, R.J., 2012, *Fish pathology* 4th Edition, Scotland, Wiley-Blackwell.
- Roberson, B.S., 1993, *Bacterial agglutination*, Techniques in fish immunology, 2nd edition, In: Stolen, J.S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., van Muiswinkel, W. B. (eds.), SOS Publications, USA.
- Romalde, J.L., Magarinos, B., Lores, F., Osorio, C.R., Toranzo, A.E., 1999, Assessment of a magnetic bead-eia based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis, *Journal of Microbiological Methods*, 38, 147-154.
- Romalde, J.L., Toranzo, A.E., 1999, *Streptococcosis of marine fish*, In: Olivier, G. (Ed.), ICES Identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish, No. 56. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark, 1–8.
- Romalde, J.L., Toranzo, A.E., 2002, *Molecular approaches for the study a diagnosis of salmonid Streptococcosis*, Molecular diagnosis of salmonid diseases, In: Cunningham, C.O. (ed.), Academic Publications, Netherlands, 211-223.
- Romestand, B., Dragesco, A., Breuil, G., Coste, F., Bouix, G., 1993, An ELISA technique for rapid diagnosis of vibriosis in sea bass *Dicentrarchus labrax*, *Diseases of Aquatic Sciences*, 15, 137-143.
- Salati, F., Ono, K., Kusuda, R., 1989, Active and passive immunization of glass eel against *Edwardsiella tarda* infection, *IV. EAFP International Conference Diseases of Fish and Shellfish*, 24-28 September, Spain, 53.
- Santos, Y., Pazos, F., Nunez, S., Toranzo, A.E., 1997, Antigenic characterization of *Vibrio anguillarum*-related organisms isolated from turbot and cod, *Diseases of Aquatic Organisms*, 28, 45-50.
- Schill, W.B., Bullock, G.L., Anderson, D.P., 1989, *Serology for the microbiological examination of fish and shellfish*, Ellis Horwood Limited, Wisconsin.
- Schrøder, M.B., Mikkelsen, H., Bortal, S., Gravningen, K., Lund, V., 2006, Early vaccination and protection of atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles against classical vibriosis, *Aquaculture*, 254, 46–53.
- Sechi, L.A., Colorni, A., Dupre, I., Mollicotti, P., Fadda, G., Zanetti, S., 2002, Strain variation in Mediterranean and Red Sea *Mycobacterium marinum* Isolates, *Microbiologica*, 25, 351-356.
- Sheng, X., Chai, B., Wang, Z., Tang, X., Xing, J., Zhen, W., 2019, Polymeric immunoglobulin receptor and mucosal IgM responses elicited by immersion and injection vaccination with inactivated *Vibrio anguillarum* in flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Aquaculture*, 505, 1-11.
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., Boone, J.G., 1964, Pasteurella sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay Tidewater areas, *Journal of Bacteriology*, 88 (6), 1814-1815.

- Snieszko, S., Axelrod, H., 1971, *Diseases of Fish*, Book 2A: Bacterial diseases of fishes. New Jersey: T.F.H. Publications.
- Sommerset, I., Krossoy, B., Biering, E., Frost, P., 2005, Vaccines for fish in aquaculture, *Expert Review of Vaccines*, 4 (1), 89-101.
- Sorensen, U.B.S., Larsen, J.L., 1986, Serotyping of *Vibrio anguillarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (3), 593-597.
- Spinos, E., Kokkoris, G. D., Bakopoulos, V., 2017, Prevention of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines, *Aquaculture*, 471, 172-184.
- Şahrikoğlu, L., Candan, A., 2002, Levrek (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) balıklarında *Aeromonas hydrophila* infeksiyonu üzerinde bir araştırma, *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 14, 59-70.
- Thyssen, A., Ollevier, F., 2001, *In vitro* antimicrobial succetibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents, *Aquaculture*, 200, 259-269.
- Timur, G., Timur, M., Karataş, S., Akaylı, T., 1999, *Ichthyophonus hoferi* ile infekte olmuş kültür levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) görülen pasteurellosis hastalığı üzerinde bir çalışma, *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, Özel Sayı, 447-443.
- Timur, G., Timur, M., 2003, *Balık hastalıkları* (1. Baskı), İstanbul Üniversitesi Rektörlük Yayınları, İstanbul.
- Timur, G., Timur, M., Akaylı, T., Korun, J., 2007, Survey study of pathologies affecting farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) and marine cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, 13th international conference of the EAFP "Diseases of fish and shellfish", 17/22 September, Grado, Italy.
- Timur, G., Erkan, M., Yardımcı, R. E., Ercan, M. D., Çanak, Ö., Ürkü, Ç., 2013, Light and electron microscopic study of Rickettsia-like organisms causing systemic granulomas in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 65, 874-880.
- Toranzo, A.E., Baya, A., Roberson, B., Barja, J., Grimes, D., Hetrick, F., 1987, Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogen, *Aquaculture*, 61, 81-97.
- Toranzo, A.E., Barja, J.L., 1990, A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the Northwest of Spain, *Disease of Aquatic Organisms*, 9, 73-82.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magarinos, B., Barja, J.L., 1991, Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): First report in Spain, *Aquaculture*, 99 (1-2), 1-15.
- Toranzo, A.E., Magarinos, B., Romalde, J.L., 2005, A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems, *Aquaculture*, 246, 37-61.
- Tort, L., Balasch, J.C., Mackenzie, S., 2003, Fish immun system. A crossroads between innate and adaptive responses, *Immunologia*, 277-286.
- TÜİK, (Türkiye İstatistik Kurumu), 2019, *Su Ürünleri İstatistikleri*, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005, [Ziyaret Tarihi: 08.06.2019]

- Ürkü, Ç., 2017, *Türkiye’ de kültür deniz balıklarında Streptokok enfeksiyonlarının farklı diyagnostik tekniklerle tespiti*, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Van Muiswinkel, W.B., 1997, The piscine immune system: Innate and acquired immunity, *Fish vaccination training course*, 14 – 17 April, Netherland, 729 – 749
- Van Muiswinkel, W.B., 2008, A history of fish immunology and vaccination I. The early days, *Fish and Shellfish Immunology*, 25, 397-408.
- Velji, M.I., Albright, L.J., Evelyn, T.P.T., 1990, Protective immunity in juvenile coho salmon *Oncorhynchus kisutch* following immunization with *Vibrio ordalii* lipopolysaccharide or from exposure to live *V. ordalii* cells, *Diseases of Aquatic Organisms*, 9, 25-29.
- Vervarcke, S., Lescroart, O., Ollevier, F., Kinget, R., Michoel, A., 2004, Vaccination of African catfish with *Vibrio anguillarum* O2: I. ELISA development and response to IP and immersion Vaccination, *Journal of Applied Ichthyology*, 20, 128-133.
- Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M., 2001, Immun responses of teleost fishes, *Austrian Veterinary Journal*, 79 (8).
- Yalınkılınç, H. S., Cavit Kum, C., 2016, Use of vaccines in fish diseases, *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 2 (1): 38-46.
- Yardımcı, R. E., 2011, *Kültür levrek balıklarında (Dicentrarchus labrax L.) Tenacibaculum maritimum'un identifikasyonunda diyagnostik tekniklerinin karşılaştırılması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yazıcı, Metin., 2004, *Levrek balıklarında (Dicentrarchus labrax) pastörellozise karşı alternatif aşılama yöntemleri üzerine bir araştırma*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Yazıcı, M., Candan, A., 2006, Levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) pasteurellosise karşı alternatif aşılama yöntemleri üzerine bir araştırma, *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20, 1-16.
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Guitierrez-de, F.C., Cortes, A., 2006, Ontogeny of the immune system of fish, *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 126-136.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ece SÖNMEZ
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	08.01.1989
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0506 791 36 75
E-Posta Adresi	snmezece@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Su Ürünleri Fakültesi
Bölümü	Su Ürünleri Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	22.07.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Programı	Su Ürünleri Hastalıkları Programı

Makale ve Bildiriler	
Akaylı T., Ürkü Ç., Çanak Ö., Sönmez E., Erk M.H., 2016, <i>Micrococcus luteus</i> 'un Bazı Gram pozitif Balık Patojenlerine Karşı Etkisinin Araştırılması, <i>Kocatepe Veterinary Journal</i> , Makale.	
Akaylı T., Göken S.Z., Sönmez E., 2015, Levrek Balıklarında (<i>Dicentrarchus labrax</i>) Kış Döneminde Görülen Karma Enfeksiyonun Teşhisi, 18. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, İzmir, Poster.	
Akaylı T., Ürkü Ç., Sönmez E., 2014, Deneysel Olarak Enfekte Edilen Gökkuşluğu Alabalıklarında <i>Micrococcus luteus</i> ' un Patojenitesinin Tespiti, 5. Doğu Anadolu Bölgesi Su Ürünleri Sempozyumu, Elazığ, Poster.	