

Yersinia ruckeri* Bakterini ile İmmunize Edilen Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Antikor Üretiminin IFAT ve ELISA Teknikleri ile Saptanması

Ayşegül KUBİLAY

S. D. Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta - TÜRKİYE

Gülşen TİMUR

İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 30.07.1999

Özet: Bu çalışmada *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen gökkuşuğu alabalıklarında oluşan antikor seviyesinin indirekt floresans antikor tekniği (IFAT) ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) teknikleriyle tayinine çalışılmıştır.

Freund's incomplete adjuvant (FIA) veya phosphate buffered saline (PBS) ile hazırlanan *Yersinia ruckeri* bakterin inokulatlarının gökkuşuğu alabalıklarına intraperitoneal enjeksiyonu ile oluşan humoral immunité seviyesi 20 haftalık periyot süresince incelenmiştir. Deneme ve kontrol grupları için 20'şer adet balık kullanılmıştır. PBS içeren *Yersinia ruckeri* inokulatu ile immunize edilen gruba bağışıklığı kuvvetlendirici ikinci enjeksiyon uygulanmıştır. Denemeler 11-12°C su sıcaklığında yürütülmüştür. İmmunizasyonu takiben balıkların kanında 2-3 hafta sonra ELISA ile düşük antikor titresi, IFAT ile zayıf fakat belirgin floresans tespit edilmiştir. Humoral antikor üretimi 5-6 cı hafta sonunda artarak yüksek antikor titresine ulaşarak deneme periyodu olan 20 hafta boyunca bu seviyeyi korumuştur. *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların tümünde 35 gün sonra patojen bakteri enjeksiyonuna karşı tam bir koruma oluşmuştur.

Anahtar Sözcükler: Gökkuşuğu alabalığı, *Yersinia ruckeri*, ELISA, IFAT, immunizasyon, antikor.

Determination of Antibody Production by IFAT and ELISA in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Immunized by *Yersinia ruckeri* Bacterin

Abstract: In this study, the induced antibody level of rainbow trout immunized by *Yersinia ruckeri* bacterin was determined using two serological techniques, namely, indirect fluorescent antibody (IFAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The induced humoral antibody levels were studied after intraperitoneal injection of *Yersinia ruckeri* bacterin inoculates containing Freund's incomplete adjuvant or PBS in rainbow trout during the experimental period of 20 weeks. The control and experimental groups each contained 20 fish. The group which was immunized by the PBS containing bacterin inoculate received a booster injection. Experiments were carried out in 11-12°C water. Low antibodies titres were detected by ELISA and faint and but distinct fluorescence by IFAT 2-3 weeks after immunization in the experimental fish blood. Humoral antibody production increased and after 5-6 weeks it reached its peak and then persisted during the experimental period of 20 weeks. All fish were protected against experimental challenge 35 days after immunization with *Yersinia ruckeri* bacterin.

Key Words: Rainbow trout, *Yersinia ruckeri*, ELISA, IFAT, immunization, antibody.

Giriş

Akuakültür dünyanın birçok ülkesinde son 20 yıldan beri çok hızlı gelişen bir endüstri haline gelmiştir. Bir çok gelişmiş ülkede balıkların intensif olarak yüksek populasyon yoğunluğunda yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu

nedenle enfeksiyöz hastalıklar başarılı bir balık yetiştiriciliği için büyük bir tehlike oluşturur (1).

Ülkemizde son yıllarda gelişme gösteren kültür balıkçılığı umut verici bir düzeye ulaşmıştır. Kültür balıkçılığında hızlı gelişme beraberinde enfeksiyöz

*Doktora tezinin bir bölümünden özetlenmiştir.

hastalıkları ortaya çıkarmıştır. Uygun ve zamanında bir tedavi uygulanmadığı takdirde balık işletmelerinde büyük ekonomik kayıplarla karşı karşıya gelinebilir.

İngilizce adının (Enteric Red Mouth) baş harflerinden oluşan ERM veya yersiniosis olarak isimlendirilen enterik kızıl ağız hastalığı ilk defa 1950'li yıllarda ABD'deki gökkuşluğu alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde yüksek mortalite ile seyreden septisemik bir hastalık olarak rapor edilmiştir (2). ERM hastalığı ülkemizde ilk olarak 1991 yılında Denizli'deki bir işletmede gökkuşluğu alabalıklarında tespit edilmiştir (3). Daha sonra bu hastalık diğer alabalık işletmelerinde görülmüştür ve önemli bir sorun haline gelmiştir (4).

Ekonomik olarak ağır kayıplara neden olan balık hastalıklarının hızlı teşhisi ve zamanında tedavi büyük önem kazanmıştır. Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde bakteriyolojik yöntemler yanısıra histopatolojik yöntemler uygulanmaktadır (5). Bugün bu ana teknik yöntemlerin yanısıra gerek insan hekimliği ve gerekse veteriner hekimliğinde kullanılan ELISA ve IFAT balık hastalıklarının teşhisinde de uygulanmaktadır (5,6,7). Sıcak kanlı hayvanlarda uygulanan immunofluoresans, enzymlerle bağlanmış antijenli immünosorbent assay (ELISA) testleri balık hastalıklarına adapte edilerek bu hastalıkların çok kısa sürede teşhisine yardımcı olduğu gibi diğer mikrobiyolojik ve histopatolojik teşhis yöntemlerine de destek sağlamış olmaktadır (5,6, 7, 8).

Balık hastalıklarının teşhisinde serolojik teknikler ; hastalığın hızlı teşhisine ve hemen tedavisine başlanmasına olanak sağlaması, dolayısıyla çıkan hastalığın meydana getirdiği zararın azaltılması, maliyetin azaltılması ve saha çalışmalarında hızlı test uygulamasına imkan vermesi gibi nedenlerle kullanılmaktadır (7,8,9). 1960'lı yıllardan itibaren balık patojenlerinin teşhisinde, balık serumlarında spesifik patojenlere karşı oluşan antikorların tayininde, aşılarda geliştirilmesinde, bakteri suşları ve tipleri arasındaki ve viral patojenler arasındaki serolojik ilişkiyi ortaya çıkarmak için çeşitli serolojik yöntemler giderek daha çok kullanılmaktadır (9,10).

Fluoresans antikor testi, birçok bakteriyel, viral, parazitik hastalıkların teşhisinde ve aranmasında çok kullanılan bir yöntemdir. Fluoresans tekniği 1950'den beri bakteriyel balık patojenlerinin identifikasyonu için geliştirilmiştir (10).

ELISA, son yıllarda çok geniş kullanım alanı bulmuş çok hassas bir serolojik test yöntemidir. Bu test antijen ve

antikor konsantrasyonlarının tespitinde kullanılan immunopresipitasyon, aglutinasyon ve ışık veren metodlarla mukayese edildiğinde en hassas yöntem olup çok hızlı ve basit teknikleri içine aldığı gibi radioisotop gibi zararlı maddelerin kullanımını gerektirmediği için avantajlıdır (8,9,11,12,).

Bu çalışmada, *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen gökkuşluğu alabalıklarının serumlarında antikor oluşumunun ELISA ve IFAT teknikleri ile tespiti amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Balık Materyali

Araştırmada kullanılan gökkuşluğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) daha önce yersiniosis vakası görülmeyen Bağcı Su Ürünleri (Beyobası Köyü, Köyceğiz-MUĞLA) ve Pınargözü Alabalık İşletmesinden (Aksu-İSPARTA) temin edilmiştir. İmmünizasyon denemesi için 100-150 g ağırlığında 20 balık, immunize balıklara patojen uygulaması için ise 25 g lık 20 adet balık kullanılmıştır.

Uygulama Yeri ve Testlerin Yapıldığı Laboratuvarlar

Deneyisel çalışmalar S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Ünitesinde yürütülmüştür. *Y. ruckeri* izolatından bakterin hazırlanması Eğirdir Su Ürünleri mikrobiyoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Bakterilerin sonikasyon işlemi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilimdalı laboratuvarında yapılmıştır. Eriyik antijenlerin biüret metodu ile protein miktarının tayini S.D.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı laboratuvarında yapılmıştır. IFAT ile ilgili işlemler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilimdalı laboratuvarında, ELISA testi ile ilgili işlemler ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yürütülmüştür.

Uygulama Tankları ve Uygulamada Kullanılan Su

Deneyisel olarak immunize edilen balıklar 1m çapında ve 70 cm derinliğinde sirküler tank içinde tutulmuştur. Deneme tanklarında suyun sıcaklığı deneme süresince yaklaşık 11-12 °C, oksijen miktarı 6-7 ppm arasında değişmiştir. Tanklardaki suyun oksijeni devamlı olarak kompresör ile takviye edilmiştir. Deneme balıklarını adaptasyon ve deneme süresince ticari alabalık pelet yemi ile beslenmiştir.

Denemede Kullanılan *Yersinia ruckeri* suşu

Deneme balıklarının immunizasyonunda Prof. Dr. Gülşen TİMUR'un 1991 yılında Denizli Yavuzlar Alabalık İşletmesindeki gökkuşağı alabalıklarından Eğirdir Su Ürünleri Yüksekokulu Balık Hastalıkları Laboratuvarında izole ettiği R0018 protokol numaralı *Yersinia ruckeri* suşu kullanılmıştır (3).

Bakterin Hazırlanması

Bakterin, Ellis(1988)' in bildirdiği yöntemle göre % 0,3 lük formaldehit ile inaktive edilerek hazırlanmıştır. *Y. ruckeri* bakterin inokulatının yoğunluğu spektrofotometre (Shimadzu Spectrophotometer) ile 600nm de 1'e ayarlanmıştır (13). İnaktif bakteriler Thoma lamı ile sayıldığında yaklaşık 10^9 bakteri/ml olarak hesaplanmıştır (14). Elde edilen bakterin inokulumu PBS (phosphate buffered saline) ve Freund's incomplete adjuvantla ayrı ayrı yarıyarıya karıştırılarak iki ayrı bakterin inokulatu elde edilmiştir (15).

İmmunizasyon Uygulamaları

100 - 150 g ağırlığındaki 20 adet gökkuşağı alabalığından oluşan iki deneme grubu balığa 60 mg/l lik MS 222 (Tricaine methane sulfonate, Finquel; ARGENT) ile bayıldıktan sonra bakterin inokulatları 0,2 ml intraperitoneal olarak pelvik yüzgeçlerin anterioründen iki yüzgecin ortasından verilmiştir (16). PBS'li bakterin inokulatu ile immunize edilen balıklara 2. kuvvetlendirici enjeksiyon 25 gün sonra yapılmıştır. 100–150 g ağırlığındaki balık 20 adet balık MS 222 ile bayıldıktan sonra 0,1ml PBS ile i.p. enjeksiyon yapılarak kontrol grubu oluşturulmuştur. Deneme süresince (20 hafta) her üç deneme grubundaki balıktan her hafta rasgele bir balık alınarak kanları alınmış ve serumları elde edilmiştir.

Pozitif Kontrol Serumun Hazırlanması

Testlerde pozitif kontrol serumu olarak kullanılmak amacıyla 9 adet 400 g'lık gökkuşağı alabalığına 0,3 cc iki hafta ara ile iki kez i.p. yolla bakterin enjekte edilmiş ve son enjeksiyondan 4 hafta sonra tüm balıklardan kan alınarak ve serum elde edilmiştir (17).

İmmun Balıklara Patojen Bakteri Uygulanması

PBS'li ve FIA'lı bakterin ile immunize edilen deneme balıklarında yeterli immunitenin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla bakterin enjeksiyonundan 3 hafta sonra patojen bakteri verilerek balıklara epruvasyon uygulanmış ve hayatta kalma yüzdesi ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla PBS'li ve FIA'lı bakterin ve sadece

PBS enjekte edilen 20'şer adet balıktan oluşan üç deneme grubu balığa 0,1ml 1×10^8 bakteri / ml canlı patojen i.p. olarak verilmiştir (14,18). Bu uygulamadan sonra üç hafta süre ile balıklar izlenmiş ve ölen balıklar kaydedilmiştir. İmmunizasyonun oluşturduğu koruma balıkların hayatta kalma yüzdesine (RPS = relative percent survival) göre değerlendirilmiştir (1).

İndirekt Floresans Antikor Tekniği İçin Antijen Hazırlama

IFAT için antijen Anderson (1993)'un bildirdiği yöntemle göre hazırlanmıştır. Yoğunluğu yaklaşık 9×10^{10} /ml olan test antijeni elmas uçlu kalemle lam üzerine çizilen yuvarlak halkalara damlatılarak havada kurutulduktan sonra asetonda 10 dk süreyle tespit edildiği gibi 60 °C ye ayarlı etüvde 5 dk tutulmak sureti ile de tespit edilmiştir (19).

İndirekt floresans antikor tekniğinin uygulanması

IFAT Anderson (1993)' un bildirdiği metoda göre yapılmıştır. Testin Uygulanması:

1. Antijen kaplı lamaların ilk antijen halkalarına pozitif ve negatif kontrol serumları ve diğer antijen halkalarına ise test serumları dilüe edilmeden 20µl olarak damlatılmıştır. Lamalar 24 °C de nemli ortamda 30 dk bekletilmiş, iki kez PBS ile yıkanıp kurutulmuştur.

2. Salmon antikoruna karşı oluşturulmuş polyclonal tavşan anti serumundan (S-2006, Soren Schierbeck Co APS-Danmark) 1/10 dilüsyonunda her halkaya 20µl konulmuştur. Lamalar 24 °C de nemli ortamda 30 dk bekletilmiş, PBS ile iki kez yıkanarak kurutulmuştur.

3. Lamalar üzerine %0,1 lik Evans blue içeren 1/80 dilüsyonundaki FITC ile işaretli keçi anti tavşan immunoglobulini (SIGMA) her halkaya 20 µl damlatılmıştır. Lamalar 24 °C de nemli ortamda bekletilerek PBS ile 3 kez yıkanarak kurutulmuştur.

4. Kaplama solüsyonu olarak kullanılan FITC mounting medium (pH:7,5 Marox carlsbad, CA) kurutulan preparatlara damlatılarak lamelle kapatılmış ve hemen floresans mikroskobu ile incelenmeye alınarak değerlendirilmeye geçilmiştir (19).

Sonuçların değerlendirilmesi

Preparatlarda floresans yada elma yeşili renginin görülme yoğunluğuna göre yapılmıştır. Parlak sarı-yeşil floresans pozitif, soluk sarı-yeşil floresans görülmemesi negatif olarak değerlendirilmiştir (19).

ELISA tekniği için antijen hazırlama

Schill ve arkadaşlarının (1989) bildirdiği eriyik protein hazırlama metodundan faydalanılmıştır.

1. *Y. ruckeri* suşu nutrient brotha ekilerek 21°C 24 saat süre ile inkübe edilmiştir.

2. Bakteri 5000 devirde 10 dk santrifüj edilerek PBS ile 2 kere yıkanmıştır.

3. Bakteri -20°C'de derin dondurucuda dondurulmuş ve sonic 300 dismembranatör (Fisheries scientific) ile 5 dk sonike edilmiştir.

4. Süspansiyon 10.000 devirde 30 dk santrifüj edilerek süpernatant dikkatlice alınmıştır.

5. Bu antijen kullanılmadan önce protein miktarı biüret yöntemi ile 1570 µg/ml olarak tespit edilmiştir. (Stanbio Primer plus marka fotometre cihazında değerler okunmuş ve Biocon firmasının test reaktifi kullanılmıştır)

ELISA için antijen kaplı plakların hazırlanması

Eriyik antijenin 5 mg/ml konsantrasyonu U tabanlı plakların (Sigma M0156) her çukuruna 100 ml konulmuştur. Antijenle kaplanan plaklar bir gece +4 °C de bekletildikten sonra silkelenmiş ve kullanılıncaya kadar +4 °C 'de saklanmıştır (15).

ELISA yönteminin uygulanması

Bu testte Voller (1979) 'in bildirdiği metottan yararlanılmıştır. Testin uygulaması:

1. Antijen kaplı plakların her çukuruna 150 µl saline aside (%), tween 20'yi içeren çalışma solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında bloklama işlemi yapılmıştır.

2. Bloklama işlemi sonrasında test serumları iki katlı sulandırılarak 1/10'dan başlayarak 1/1280 dilüsyonları yapılarak plaklara ilave edilmiştir. Plaklar oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra plaklar silkelenerek içerikleri dökülmüş ve her çukur 150 µl çalışma solüsyonu ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır.

3. Salmon immunoglobulinine karşı oluşturulmuş poliklonal tavşan antiserumu 1/400 oranında sulandırılarak her çukura 100 µl konulmuştur. Plaklar 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra silkelenerek boşaltılmış ve 2 kez çalışma solüsyonu ile 2 kez PBS ile 5'er dakika yıkanmıştır.

4. Peroksidaz işaretli anti tavşan IgG (SİGMA) 1/1000 oranında dilüe edilerek her çukura 100 µl konulmuştur. Plaklar 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiş, silkelenerek

boşaltılmış ve 2 kez çalışma solüsyonu ile 2 kez PBS ile 5'er dakika yıkanmıştır.

5. Plaklar üzerine enzim substratı (2,2'-Azino-bis diamonium:ABTS ve H₂O₂) bütün çukurlara 100 µl konulup oda sıcaklığında 30 ile 60 dakika arasında tutularak test durdurulmadan 405 nm'de ELISA okuyucusunda okunmuştur.

Sonuçların Okunması ve Değerlendirilmesi

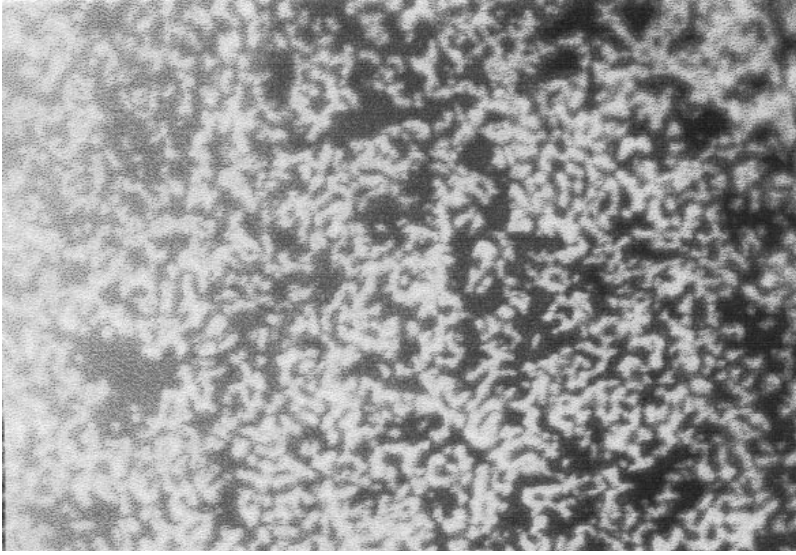
ELISA sonuçları spektrofotometrede (Titertek Multiscan Plus MKII) değerlendirilmiştir. Sonuçlar absorbans değeri olarak alınmış ve dilüsyonlardaki pozitiflik eşik değerleri (cutt off değeri) plaklarda aynı test içinde bulunan 8 negatif serumun absorbans değerinin aritmetik ortalamasının +3 standart sapma (n+3 SD) değeri olarak alınmış, bu değerlerin üstündeki dilüsyonlar pozitif olarak kabul edilmiştir. Pozitifliğin şiddeti standart sapmanın katları olarak hesaplanmıştır. Dilüsyonlardaki en son pozitiflik ELISA değeri olarak alınmış ve Log₁₀ tabanına göre değerlendirilmiştir (11).

Bulgular

İndirekt Floresans Antikor Testi (IFAT) İlgili Bulgular

IFAT tekniğinde antijenin lama fikse edilmesinde sıcaklıkla fikse etme metodu (60 °C de 5 dk), asetonla fikse etme metodundan daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Antiserum 1/10 dilüsyonu konjugenin ise 1/80 dilüsyonu en iyi sonuç vermiştir. IFAT testinin değerlendirilmesinde foto mikroskopun otomatik zaman ayarlayıcısının floresans ışığa göre çekim süresinin kısa veya uzun olma farklılığı da floresans yoğunluğunun kuvvetli, orta, zayıf veya yok diye değerlendirilmesinde ikinci bir kriter olmuştur. Kuvvetli floresans veren preparatlarda çekim süresi çok kısa bir zaman aralığına (15-48 sn) sahip olmuş ve pozitif olan serumlarda kuvvetli sarı-yeşil renk gözlenmiştir (Şekil 1). Negatif ve kontrol serumlarının bulunduğu halkalarda floresans serumda spesifik antikor bulunmadığı için görülmemiştir.

FIA veya PBS içeren *Y. ruckeri* bakterin inokulatları ile immunize edilen balıkların serumlarındaki antikor seviyelerinin tespiti ile ilgili olarak yürütülen IFAT testinin sonuçları Tablo 1 de verilmiştir. Bu sonuçlara göre bakterin enjeksiyonundan sonraki 1. haftada immunize edilen balıkların serumlarında antikorun varlığı tespit edilemezken 2-3. haftalarda denemenin her iki grubuna



Şekil 1. FITC ile işaretli anti-tavşan immunoglobulin, salmon antikoruna karşı oluşturulmuş ticari polyclonal tavşan antiserumu ve *Yersinia ruckeri* antijen-antikor kompleksinin fluoresans mikroskopta görünümü

Tablo 1. FIA ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterinleri ile immunize edilen iki deneme gruplarına ait 20 haftalık IFAT sonuçları

İmmünizasyon Sonrası Haftalar	Deneme Grupları		İmmünizasyon	Deneme Grupları Sonrası Haftlar	
	I	II		I	II
1	-	-	11	++++	++++
2	++	-	12	++++	+++
3	++	+++	13	++++	++
4	++++	++++	14	++++	++++
5	++++	++++	15	++++	++++
6	++++	++++	16	++++	++++
7	++++	-	17	++++	++++
8	++++	++++	18	++++	++++
9	++++	++++	19	++++	++++
10	++++	++++	20	++++	+++

I.PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu

II.FIA içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu

- : fluoresans yok + : var fakat zayıf fluoresans ++ : fluoresans var
+++ : orta dereceli fluoresans ++++ : kuvvetli fluoresans

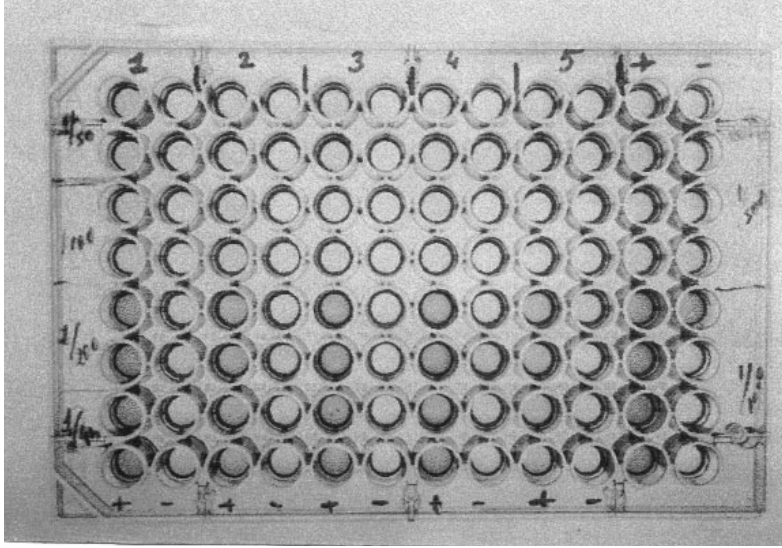
ait balıklarda zayıf bir antikor teşekkülü 4. haftadan itibaren 20. haftaya kadar kuvvetli antikor teşekkülü kuvvetli fluoresans ışığın gözlenmesi ile tespit edilmiştir.

Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Sonuçları

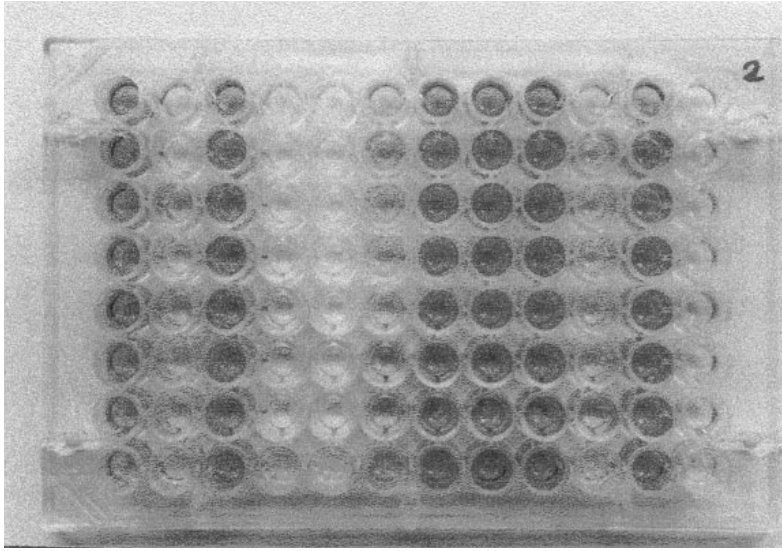
ELISA'da en iyi pozitif reaksiyonu oluşturan antijen protein yoğunluğu 5 µg/ml, antiserum dilüsyonu 1/400 ve konjugat dilüsyonu ise 1/1000 olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). Aynı test içinde 8 negatif balık serumunun

absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması +3SD değerleri hesaplanarak pozitiflik eşiği absorbans değeri 0,202 olarak saptanmıştır.

İmmünize edilen alabalıkların serumlarındaki antikor titreleri ile ilgili olarak yürütülen ELISA testlerinde oluşan renk reaksiyonu Şekil 3'de ve testin sonuçları Tablo 2 ve Şekil 4 de verilmiştir. Düşük titrelili antikor PBS'li bakterin ile immunize edilen balıklarda 2. haftada, FIA'lı bakterin ile immunize edilen (II. deneme grubu) balıklarda 3.



Şekil 2. ELISA testine ait en iyi pozitif reaksiyon oluşturduğu antijen protein değeri antiserum (1/400) ve konjugat dilüsyonlarının (1/1000) tespit edildiği microwell plate (yeşil renk pozitif reaksiyon)



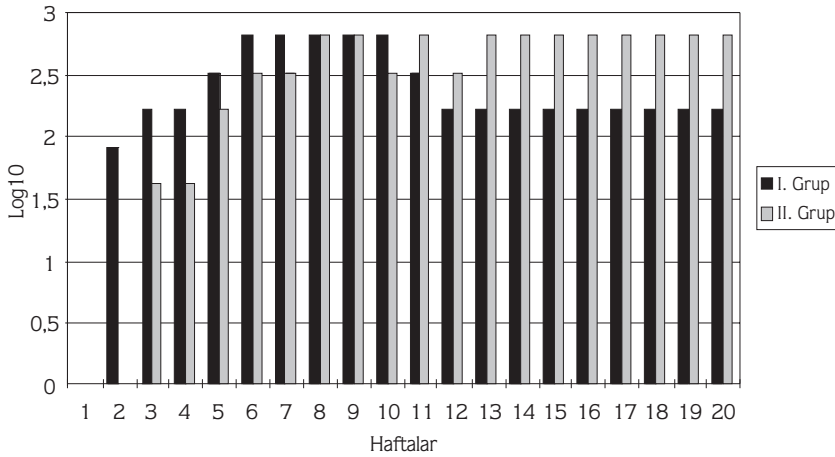
Şekil 3. ELISA testinin uygulandığı microwell plate'de renk reaksiyonları (yeşil renk pozitif reaksiyonu gösterir).

Tablo 2. FIA ve PBS İçeren *Yersinia ruckeri* bakterini immunize edilen alabalıkların ELISA testi ile belirlenen haftalık antikor titreri

İmmunizasyon Sonrası Haftalar	Deneme Grupları				İmmunizasyon Sonrası Haftalar	Deneme Grupları			
	I		II			I		II	
	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀		Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀	Log ₁₀
1	-	-	-	-	11	320	2.5	640	2.8
2	80	1.9	-	-	12	160	2.2	320	2.5
3	160	2.2	40	1.6	13	160	2.2	640	2.8
4	160	2.2	40	1.6	14	160	2.2	640	2.8
5	320	2.5	160	2.2	15	160	2.2	640	2.8
6	640	2.8	320	2.5	16	160	2.2	640	2.8
7	640	2.8	320	2.5	17	160	2.2	640	2.8
8	640	2.8	640	2.8	18	160	2.2	640	2.8
9	640	2.8	640	2.8	19	160	2.2	640	2.8
10	640	2.8	320	2.5	20	160	2.2	640	2.8

I.PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu

II.FIA içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu



Şekil 4. FIA ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen alabalıkların kan serumunda oluşan antikor titrelerinin ELISA tekniğine göre haftalık dağılımı

I. PBS'li bakterinle immunize edilen alabalık grubu
II. FIA içeren bakterinle immunize edilen alabalık grubu

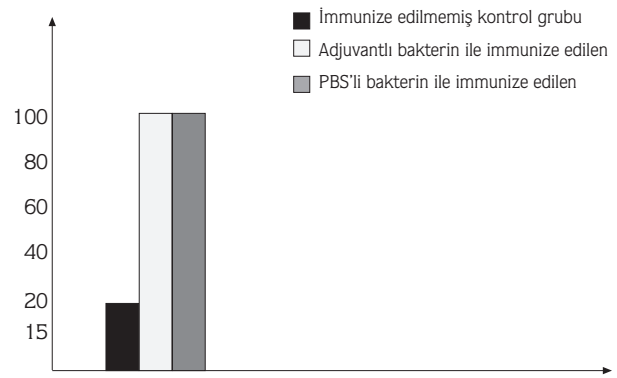
haftada gözlenmeye başlamıştır. 6-8. haftalarda bu titrenin yükseldiği görülmüş ve I. deneme grubunda bu titrenin 11. hafta sonunda biraz düştüğü, II. deneme grubunda ise aynı titrede devam ettiği görülmüştür.

Yersinia ruckeri bakterinin FIA veya PBS içinde i.p. olarak verilmesiyle immunize edilen gökkuşuğu alabalıklarında yüksek bir immunitenin olduğu bu balıklara kontrol amacıyla yapılan patojen bakteri enjeksiyonundan 3 gün sonra sadece kontrol grubu balıklarında ölümlerin görülmesi ile anlaşılmıştır. Kontrol grubundaki balıklarda ölüm 3 gün sonra başlamış ve 9. gün sonra sona ermiştir.

Her iki *Y. ruckeri* bakterin inokulatu ile immunize edilen balıklarda 3 hafta sonra RPS formülüne göre hayatta kalma oranı % 100 olarak bulunmuştur (Tablo 4, Şekil 5). Kontrol grubu balıklarda mortalite % 85 olarak tespit edilmiştir.

Tartışma

Balıkların immunizasyonunda kullanılan bakterinlerin hazırlanması için bakterin inaktivasyonunda fenol, kloroform, formalin ve bakteriyel süspansiyonların sonikasyonu gibi çeşitli kimyasal madde ve yöntemler tavsiye edilmekte ise de (20,21) *Yersinia ruckeri*



Şekil 5. Eprüvasyon uygulanan immunize ve kontrol grubu balıklarında hayatta kalma yüzdesi

bakterisinden hazırlanan aşılarında aşının güvenliği ve üretim kolaylığı açısından formalin kullanıldığı için (17,21) bu çalışmada da *Yersinia ruckeri* izolatından bakterin hazırlanmasında formalin kullanılmıştır. Formalin ile inaktif edilerek hazırlanan *Yersinia ruckeri* bakterini FIA ve PBS içinde farklı deneme gruplarına verilmiş ancak diğer araştırmacıların tavsiye ettiği gibi (1,18,22) PBS'li bakterinin FIA'lı bakterin kadar kuvvetli immunizasyon sağlama amacıyla bu gruba 3. hafta kuvvetlendirici 2. enjeksiyon uygulaması yapılmıştır. Bu ikinci kuvvetlendirici enjeksiyon serolojik testlerle ilgili

Tablo 4. Eprüvasyon uygulanan gökkuşuğu alabalıklarında hayatta kalma yüzdesi

Test Grupları	Toplam Balık Sayısı	Spesifik Ölen Balık Sayısı	Hayatta Kalma Yüzdesi (RPS)
Adjuvantlı bakterin ile immunize edilen	20	-	100
PBS'li bakterin ile immunize edilen	20	-	100
Kontrol grubu	20	17	-

bulgulara ait değerlerin incelenmesinden anlaşılacağı gibi antikor titrelerinin FIA bakterinin oluşturduğu serum antikor titresine yakın titrede (6.-11. haftalarda) oluşmasını sağladığı görülmektedir. Ancak bu kuvvetlendirici enjeksiyonun denemenin 11. haftasından itibaren daha düşük titrede antikor titresinin oluşmasına engel olmadığı görülmektedir.

İnsan ve veteriner hekimlikte ve balık patojenlerinin teşhisinde hızlı diagnostik test olarak kullanılan indirekt fluoresans antikor tekniği (16) bu deneysel çalışmada immun ve enfekte balık gruplarına ait kan serumlarındaki antikorların tespitinde başarıyla uygulanmıştır. Freund's incomplete adjuvant ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların serumlarındaki antikor varlığı ve seviyesi ile ilgili olarak hazırlanan IFAT testine ait preparatlarda kuvvetli fluoresans yoğunluğunun gözlenmesi 4. haftadan itibaren 20. haftaya kadar balıkların kan serumlarında kuvvetli antikor seviyesinin oluştuğunu göstermiştir.

Son yıllarda geliştirilen ve enfeksiyonların teşhisinde çok geniş bir kullanım alanı bulan ELISA serolojik test yöntemi balık hastalıklarının teşhisinde de geniş bir kullanım alanını bulmuş çok hassas ve fazla zaman almayan bir serolojik testtir (6,8,9,12,16). Bu çalışmada iki grup halinde FIA ve PBS içeren *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen balıkların serumları ile yürütülen ELISA sonuçları da IFAT bulgularını desteklemiştir. İmmunizasyonu takip eden 1. hafta sonunda her iki grup deneme balıklarının serumlarında antikor oluşmadığı, 2. hafta sonunda sadece PBS'li bakterine karşı antikor oluşmaya başladığı, 3. haftada ise FIA içeren bakterine karşı da antikor oluşumunun başladığı 4. haftalarda her iki grup balıklarda antikor titresinin yükseldiği ve denemenin son bulunduğu 20.haftaya kadar adjuvantlı bakterin ile immunize edilen alabalıkların kan serumlarında biraz daha yüksek titrede antikor bulunduğu ELISA testi ile tespit edilmiştir..

Kaynaklar

1. Ellis, A.E., General Principles of Fish Vaccination. In: Fish Vaccination, (Ellis, A.E., ed.) Academic Press Ltd. London,1988; 1-19.
2. Busch, R.A., Enteric Redmouth Disease. Symposium International de Talloires, 10-12 May,1982. Les Antigenes des Micro-organismes pathogènes des Poissons. Collection Fondation Marcel Merieux. 1982; 201-224.
3. Timur, G., Timur, M., An outbreak of enteric redmouth disease in farmed rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 1991; 11(5), 182-183.
4. Çağırğan, H., Yürekli Türk, O., First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout farm in Turkey. In: The fifth Conference of EAAP, Disease of Fish and Shellfish. 24-29, August, 1991, Book of Abstract, 131.

Yersinia ruckeri bakterinine karşı deneme balıklarının kan serumunda oluşan antikorların üretim fazı süresine (2-3 hafta) ait bulgular diğer araştırmacıların bildirdikleri üretim fazı süresiyle ilgili bulguları desteklediği gibi denemede antikor seviyesinin geliştiği (4-5-6. haftalar) ve bu seviyenin deneme süresince (20 hafta) kan serumunda sürekli yüksek kaldığı sürelerle ait bulgular diğer araştırmacıların bulgularını desteklemektedir (14, 18, 20, 23).

Sonuç olarak bu çalışmada günümüzde bir çok ülkede balık hastalıklarının teşhisinde veya immun balıkların serum antikor titrelerinin tayininde yaygın olarak kullanılan IFAT ve ELISA teknikleri ile deneme balıklarında ERM bakterinine karşı oluşan serum antikor seviyesinin immunizasyondan sonraki 20. haftalık deneme süresi içerisinde tespit edilmesine olanak sağlamıştır. Bu teknikler ile *Yersinia ruckeri* bakterinine karşı deneme balıklarının serumlarında immunizasyonu takiben 2. hafta sonra antikorların oluşmaya başladığı 4 ve 5. haftalarda antikor seviyesinin kuvvetlendiği ve 20 haftalık deneme süresince aynı seviyede kaldığı saptanmıştır.

Yine bu çalışmada ERM bakterininin FIA ile immunizasyonu ve rapel uygulamasının humoral immunitenin oluşumunda ve bakterinin daha uzun süre etkin olmasında önemli olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ancak rapel uygulamasının balıklarda stres oluşturması ve ikinci bir işgücünü gerektirmesi nedeni ile enjeksiyonla bakterin uygulamasının uzun etki süresi sağlaması açısından adjuvant kullanımının daha yararlı olacağı görüşüne varılmıştır.

Bakteriyel balık hastalıklarının hızlı ve kesin teşhisinde kullanılan IFAT ve ELISA tekniklerinden ELISA tekniğinin immun balıkların kanındaki serum antikor titresinin tayin edilmesi gereken durumlarda IFAT tekniği yerine tercih edilmesi gereken bir teknik olarak kullanılmasının gerektiği anlaşılmıştır.

5. Bullock, A.M., Laboratory Methods. In: Fish Pathology (Roberts, R.S. ed) Second Edition. Bailliere Tindall, London. 1989; 374-407.
6. Austin, B., Identification. In: Methods in Aquatic Bacteriology, (Austin, B., ed.) John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 1988; 95-112.
7. Schill, W.B., Bullock, G.L., Anderson, D.P., Serology. In: Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish. (Austin, B. and Austin, D.A., eds.). 1989; 98-112.
8. Dixon, P.F., Rapid Detection and Identification of Fish Pathogens by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: Fish and Shellfish Pathology. (Ellis, A.E., ed.) Academic Press, London, 1985; 11-16.
9. Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Bull. World Health Organ. 1976; 53, 55-65.
10. Busch, R.A., The Current Status of Diagnostic Serology for the Major Bacterial Diseases of Fishes. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines. Develop Biol. Standard. Wa. USA, 1981; 49, 85-96.
11. Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A., 1979. The Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). A Guide With Abstracts of Microplate Applications. Dynatech Europe Broughouse, London 123p.
12. Arkoosh, M.R., Kaattari, S.L., Quantitation of Fish Antibody to a Specific Antigen by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: Techniques in Fish Immunology. (Stoken, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkei, W.B., eds.). SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303 USA. 1993; 15-24.
13. Ellis, A.E., Vaccination Against Enteric Redmouth. In: Fish Vaccination, (Ellis, A.E., ed.) Academic Press Ltd. London. 1988; 85-92.
14. Cossarini-Dunier, M., Indirect linked immunosorbent assay (ELISA) to titrate rainbow trout serum antibodies against two pathogens: *Yersinia ruckeri* and Egtved virus. Aquaculture. 1985; 49, 181-187.
15. Bernoth, E. M., Böhm, K. H., Serological comparison between isolated strains of *Aeromonas salmonicida* by agglutination and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Vet. Med. B. 1988; 35, 637-647.
16. Akhlaghi, M., Munday, B. L., Whittington, R. J., Comparison of the efficacy of two sites of intraperitoneal injection in fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 1993; 13 (5), 176-179.
17. Olesen, N.J., Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterins by ELISA and passive immunization. J. Appl. Ichthyol. 1991; 7, 36-43.
18. Cossarini-Dunier, M., Secondary response of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to DNP-haemocyanin and *Yersinia ruckeri*. Aquaculture. 1986; 52, 81-86.
19. Anderson, D.P., Fluorescent Antibody Test. Techniques in Fish Immunology. (Stoken, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkei, W.B., eds.). SOS Publications, 43 De Normandie Ave. Fair Haven, N 107704-3303 USA, 1993; 1-8.
20. Amend, D.P., Johnson, K.A., Croy, T.R., McCarthy, D.H., Some factors affecting the potency of *Yersinia ruckeri* bacterins. Journal of Fish Diseases. 1993; 6, 293-299.
21. Anderson, D.P., Ross, A.J., Comparative Study of Hagerman Redmouth Disease Oral Bacterins. The Progressive Fish-Culturist. 1972; 34, 4, 226-228.
22. Tatner, M.F., Horne, M.T., The Effects of Vaccine Dilution, Length of Immersion Time, and Booster on the Protection Levels Induced by Direct Immersion Vaccination of Brown Trout, *Salmo trutta*, with *Yersinia ruckeri* Vaccine. Aquaculture. 1985; 46, 11-18.
23. Hung, H-W, LO, C-F, Tseng C-C, Kou, G-H, Antibody Production in Japanese Eels, *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. Journal of Fish Disease, 1997, 20, 195-200.