T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*) *Renibacterium salmoninarum*'aKARŞI AŞI GELİŞTİRİLMESİ

Ahmed Alhadi ALMABROK

Danışman	**Doç. Dr. Soner BİLEN**
Jüri Üyesi	**Prof. Dr. Derya GÜROY**
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Betül GÜROY**
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Adem Yavuz SÖNMEZ**
Jüri Üyesi	**Dr. Öğr.Üyesi Kerim GÜNEY**

DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

KASTAMONU –2019

TEZ ONAYI

Ahmed Alhadi ALMABROK tarafından hazırlanan "**Gökkuşağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Renibacterium salmoninarum*'a Karşı Aşı Geliştirilmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Doç. Dr. Soner BİLEN Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Derya GÜROY Yalova Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Betül GÜROY Yalova Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Adem Yavuz SÖNMEZ Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Kerim GÜNEY Kastamonu Üniversitesi	.....

27/09/2019

Enstitü Müdürü	Doç. Dr. Nur BELKAYALI	.....

TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

Ahmed Alhadi ALMABROK



ÖZET

DoktoraTezi

ALABALIKLARDA (*Onchorhynchus mykiss*) *Renibacterium salmoninarum*'a KARŞI AŞI GELİŞTİRİLMESİ

Ahmed Alhadi ALMABROK
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Soner BİLEN

Bu çalışmada gökkuşağı alabalıklarında (*Onchorhynchus mykiss*)bakteriyel böbrek hastalığına (BKD) neden olan *Renibacterium salmoninarum*'a karşı DNA aşısı geliştirilmesi amaçlanmıştır. Balıklar çalışmada kullanılan 9 adet 100 L'lik akvaryuma 40'er adet stoklanmıştır. DNA klonu oluşturulan MSA1 ve P22 genleri balıklara 150ng/µl/balık olacak şekilde intraperitonal olarak vurulmuştur. Çalışmanın 7 ve 30. günlerinde balıklardan kan ve doku örnekleri alınarak bağışıklık parametrelerinde meydan gelen değişimler incelenmiş ve buna ek olarak 30. gün sonunda balıklara *R. salmoninarum* patojeni ile kontrol testlerinetabi tutulmuştur, yaşama oranları süregelen 21 gün boyunca tespit edilmiştir. Deneme sonunda immünolojik yanıtlar incelendiğinde IL-1β, IL-8, IL-10, IL-12,IL-6, COX2, TGF-β, IgM, iNOS ve MHC2 gen sumun sonuçlarına göre MSA1 ve P22 genlerinin çalışmanın yedinci gününde kontrol grubuna göre attığı tespit edilmiştir ($P<0,05$). ORP ve MPO aktiviteleri ise 7. ve 30. günlerde deneme gruplarında kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir.LYS aktivitelerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Gökkuşağı alabalıklarında farklı iki DNA bazlı aşı ile aşılanmaları sonucunda yaşama oranlarında değişiklik gözlenmemiş olması ile birlikte P22 ve MSA1gen sunumlarının özellikle bağırsak ve dalakta artış göstermiş olması uygulamanın immunostimulant etki gösterdiğini kanıtlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Alabalık, Aşı, *Renibacterium salmoninarum*, *Onchorhynchus mykiss*

2019, 135sayfa

Bilim Kodu: 1207

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

IMPROVING A VACCINE AGAINST *Renibacterium salmoninarum* IN RAINBOW TROUT (*Onchorhynchus mykiss*)

Ahmed Alhadi ALMABROK
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Soner BİLEN

Abstract: In this study, it was aimed to develop a DNA vaccine against *Renibacterium salmoninarum*which causes bacterial kidney disease (BKD) in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). 40 Fish per tank were stocked into 9 tanks (100 L each). MSA1 and P22 genes were cloned and injected to fish intraperitoneally with the rate of 150ng/µl/fish.On the 7^{th} and 30^{th} days of the study, blood and tissue samples were taken from the fish and the changes in the immune parameters were examined. Additionally, at the end of the 30^{th} day, the fish were subjected to challenge test with *R. salmoninarum* pathogen and their survival rates were determined for the following 21 days. At the end of the experiment, when the immunological responses were examined, MSA1 and P22 gene expressions were enhanced ($P<0.05$) in comparison with control group according to results of IL-1β, IL-8, IL-10, IL-12, IL-6, COX2, TGF-β, IgM, iNOS and MHC2 gene expressions. On the other hand, ORP and MPO activities were increased on the 7^{th} and 30^{th} days of the study compared to control group. No change in LYS activities was observed. Although there was no change in the survival rates of the fish vaccinated with two different DNA-based vaccines, P22 and MSA1 gene expressions were increased particullary in spleen and intestine, showing immunostimulating effect of the current application.

Key Words: Rainbow trout, Vaccine, *Renibacterium salmoninarum*, *Onchorhynchus mykiss*

2019, 135pages

Scientific code: 1207

TEŞEKKÜR

Tez çalışması boyunca yardımlarını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Soner BİLEN'e, saha ve laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından dolayıArş. Gör. Osman Nezih KENANOĞLU'na ve son olarak da bu süreçte manevi desteğini hiç eksik etmeyen sevgili aileme teşekkürü borç bilirim.

Ahmed Alhadi ALMABROK
Kastamonu, Eylül, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI	ii
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ixii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiiii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
GRAFİKLER DİZİNİ	xv
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Balıklarda Enfeksiyöz Hastalıklar	3
1.1.1. Bakteriyel Hastalıklar	4
1.1.2. Viral Hastalıklar	5
1.2. Bağışıklık Sistemi	5
1.3. Hastalıklara Karşı Koruma Yöntemleri	6
1.3.1. Bağışıklık Uyarıcılar	6
1.3.1.1. Aşı tipleri	*6*
1.3.1.1.1. Ölü aşılar (İnaktif)	*6*
1.3.1.1.2. Atenüe aşılar (Canlı)	*7*
1.3.1.1.3. DNA aşıları	*7*
1.3.1.1.3.1. DNA aşılarının temel mekanizması	*8*
1.3.1.1.4. Alt ünite aşılar	*11*
1.3.1.1.5. Sentetik peptid aşılar	*11*
1.3.1.1.6. Parçacık aşılar	*12*
1.3.1.1.7. Rekombinant protein aşısı	*12*
1.3.1.1.8. Ökaryotik hücrelerde üretilen balık viral aşıları	*12*
1.3.1.1.9. Balık bakteriyel hastalıkları için rekombinant protein aşısı	*13*
1.3.1.1.10. Genetiği değiştirilmiş canlı aşılar	*13*
1.3.1.2. Aşılama Yöntemleri	*14*
1.3.1.2.1 Oral Aşılama	*14*
1.3.1.2.2. İmmersiyon	*14*
1.3.1.2.3. Enjeksiyon	14
1.4. *Renibacterium salmoninarum*	15
1.4.1. Duyarlılık	15
1.4.2. Bulaşma	16
1.4.3. İnkübasyon ve Yayılma	17
1.4.4. Patoloji	18

1.4.5. Teşhis 20
1.4.6. Kontrol 22
1.4.6.1. Yönetme *22*
1.4.6.2. İlaçla mücadele 23
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR 26
3. YÖNTEM 49
3.1. Materyal 49
3.1.1. Balık Materyali 49
3.1.2. Deneme Yeri 50
3.2. Yöntem 51
3.2.1. *Renibacterium salmoninarum* Kültürü 51
3.2.2. *Renibacterium salmoninarum* Genomik DNA İzolasyonu 52
3.2.3. MSA1 (1695bp) , İzolasyonu ve Klonlanması 53
3.2.3.1. PZR kurulumu (MSA1) *55*
3.2.3.2. MAS-1 geni primer dizileri *56*
3.2.3.3. Ligasyon (pGET 2.1/blunt vektör ile) *58*
3.2.3.4. Transformasyon *59*
3.2.3.5. pJET Koloni PZR *59*
3.2.3.6. Sekans PCR örneğinin saflaştırılması 62
3.2.4. P22, İzolasyonu ve Klonlanması 62
3.2.4.1. PZR kurulumu (P22) *64*
3.2.4.2. P22 geni primer dizileri: *65*
3.2.4.3. P22 A- tailing *67*
3.2.4.4. Ligasyon (pGEM-T easy vektör ile) *67*
3.2.4.5. Transformasyon *68*
3.2.4.6. M13 Koloni PZR *68*
3.2.4.7. Sekans PCR örneğinin saflaştırılması 71
3.2.5. İmmunolojik Analizler 72
3.2.5.1. Bağışıklık ile ilgili gen sunumlarının RT-PCR ile belirlenmesi ... *72*
3.2.5.1.1. Total RNA izolasyonu *72*
3.2.5.1.2. cDNA sentezi *72*
3.2.5.1.3.Quantitave RT-PCR *73*
3.2.5.2. Oksidatif radikal üretimi *75*
3.2.5.3. Lizozim aktivitesi (LYS) *76*
3.2.5.4. Myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi 76
3.2.6. Kontrol Testi 77
3.2.7. Deneyin Kurgulanması 77
3.2.8. İstatistiksel Analizler 78
4. BULGULAR 79
4.1. İmmunolojik Yanıtlar 79
4.1.1. Gen sunumları 79
4.1.1.1. IL-1β *79*
4.1.1.2. IL-8 82

4.1.1.3. IL-10 ..... *85*
4.1.1.4. IL-12 ..... *87*
4.1.1.5. IL-6 ..... *90*
4.1.1.6. COX 2 ..... *93*
4.1.1.7. TGF-β *95*
4.1.1.8. IgM *98*
4.1.1.9. iNOS *100*
4.1.1.8. MHC-2 102
4.2. Oksidatif Radikal Üretimi (ORÜ) 105
4.3. Lizozim Aktivitesi (LYS) 106
4.4. Myeloperoksidaz Aktivitesi (MPO) 106
4.5. Yaşama Oranları 106
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 109
KAYNAKLAR 116
ÖZGEÇMİŞ 136

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

C	Santigrat
gr	gram
kg	Kilogram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
OH	Hidroksil
O_2	Oksijen
OH^-	Hidroksit
U	Unite
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
^{o}	Derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

cDNA	Complementary DNA
COX	Cyclooxygenase
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleikasit
FAO	Food and Agriculture Organization
IL	İnterleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
LYS	Lysozyme
MHC	Major histocompatibility complex
MPO	Myeloperoxidase
ORÜ	Oksidatif Radikal Üretimi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
TGF	Transforming Growth Factor
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. PZR ürünü jel saflaştırma prosedürü 57

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Başlıca bakteriyel balık hastalıkları ve aşı uygulamaları	2
Tablo 1.2. DNA aşılarıyla ilgili avantajlar ve potansiyel riskler.	10
Tablo. 3.1. *Renibacterium salmoninarum* MSA1 geni sekansı	54
Tablo 3.2. PZR prosedürü	55
Tablo 3.3. PZR termal döngüsü	55
Tablo 3.4. MAS-1 geni primer dizileri	56
Tablo 3.5. PZR Kurulumu.....	56
Tablo 3.6. PZR termal döngüsü	56
Tablo 3.7. PZR termal döngüsü	61
Tablo 3.8. P22 gen dizilimi	63
Tablo 3.9. PZR prosedürü	64
Tablo 3.10.PZR termal döngüsü	64
Tablo 3.11.P22 geni primer dizileri	65
Tablo 3.12.PZR Kurulumu.....	65
Tablo 3.13.PZR termal döngüsü	65
Tablo 3.14.P22 A- tailing protokolü	67
Tablo 3.15.PZR döngüsü	70
Tablo 3.16.Çalışmada kullanılan primerler.....	73

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4.1. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-1β gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 80
Grafik 4.2. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-1β gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 80
Grafik 4.3. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-1β gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 81
Grafik 4.4. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-1β gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 81
Grafik 4.5. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-8 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 82
Grafik 4.6. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-8 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 83
Grafik 4.7. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-8 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 84
Grafik 4.8. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-8 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 84
Grafik 4.9. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-10 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 85
Grafik 4.10. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-10 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 86
Grafik 4.11. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-10 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 86

Grafik 4.12. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-10 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 87
Grafik 4.13. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-12 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 88
Grafik 4.14. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-12 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 88
Grafik 4.15. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-12 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 89
Grafik 4.16. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-12 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 90
Grafik 4.17. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-6 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 91
Grafik 4.18. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-6 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 91
Grafik 4.19. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-6 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder 92
Grafik 4.20. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-6 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 92
Grafik 4.21. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda COX-2 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 93
Grafik 4.22. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda COX-2 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 94
Grafik 4.23. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda COX-2 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 94

Grafik 4.24. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda COX-2 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 95
Grafik 4.25. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda TGF-β gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 96
Grafik 4.26. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda TGF-β gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 96
Grafik 4.27. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda TGF-β gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 97
Grafik 4.28. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda TGF-β gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 97
Grafik 4.29. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IgM gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 98
Grafik 4.30. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IgM gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 98
Grafik 4.31. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IgM gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 100
Grafik 4.32. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IgM gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 100
Grafik 4.33. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda INOS gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder 100
Grafik 4.34. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda INOS gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 101
Grafik 4.35. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda INOS gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder 101

Grafik 4.36. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda INOS gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder 102
Grafik 4.37. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda MHC-2 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder 103
Grafik 4.38. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda MHC-2 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder 103
Grafik 4.39. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda MHC-2 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder 104
Grafik 4.40. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda MHC-2 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder 105
Grafik 4.41. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda ORÜ meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder 105
Grafik 4.42.MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda LYS aktivitelerinde meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder 106
Grafik 4.43. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda MPO aktivitelerinde meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. 107
Grafik 4.44. Kontrol, MSA1 ve P22 uygulanan grupların Renibacterium salmoninarum bakterisi enjeksiyonundan sonra 30 günlük yaşama oranları.. 108

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Sayfa

Fotoğraf 3.1. Balıklara anestezi uygulaması 49
Fotoğraf 3.2. Anestezi uygulanmış gökkuşağı alabalıkları 50
Fotoğraf 3.3. Gruplara ayrılmış balıklar ve deneme ortamı 51
Fotoğraf 3.4. *R. salmoninarum* kültüründe kullanılan soğutmalı çalkalamalı inkübatör 52
Fotoğraf 3.5. MSA1 geni 58
Fotoğraf 3.6. Elektroforez jelde yürütülen MSA geni bantları 60
Fotoğraf 3.7. SnapGene sekanslama programı görüntüsü 62
Fotoğraf 3.8. P-22 bant oluşumu 66
Fotoğraf 3.9. P 22 ve MSA bant dizilimleri 69
Fotoğraf 3.10. SnapGene programı ekran görüntüsü 71
Fotoğraf 3.11. Balıklara *R. salmoninarum* enjeksiyonu 76
Fotoğraf 3.12. Bakteri verilmiş balıklar 77
Fotoğraf 3.13. Balıkların yaşatıldığı oratamda kapalı devre sistem 78

1. GİRİŞ

Su ürünleri üretiminde en önemli kritik sorunların başında, yoğun üretim yapılan alanlarda hastalıklardan kaynaklanan kayıplar ve bunun neden olduğu ekonomik değer kayıpları öne çıkmaktadır. Bu durumlarda şimdilik aşılama işlemi uygun aşıların kullanımı ile balıkların bağışıklık sistemlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Özellikle yoğun üretim yapılan alanlarda aşılama kayıpların önlemesinde anahtar rol oynayabilir. Temelde aşı, hastalık yapan amillerin antijenlerinin özellikle konakçının bağışıklık sistemini harekete geçiren parçaların izole edilerek canlılara verilerek ilgili patojene karşı doğal bir bağışıklığın oluşmasını sağlamak üzerine çalışmaktadır. Balık üretiminde kullanılan aşılar ise genel olarak üç ana kategoride değerlendirilmektedir. Bunlar, canlı aşılar, tüm ölü aşılar ve ek olarak DNA bazlı aşılardan oluşmaktadır. Aşıların etkinliği ise genel olarak aşı içerisinde adjuvant, immunostimulant ve aşı taşıyıcıların kullanımı ile artmaktadır. Bununla birlikte aşı uygulamalarının da bu işlemde etkileri büyüktür. Genel olarak bakıldığında enjeksiyon uygulamalarının oral ve banyo yöntemlerinden daha verimli olduğu söylenebilir.

Son dönemlerde bağışıklık, biyoteknoloji ve moleküler biyoloji alanında yaşanan gelişme ve yeni bulgular, gelişmeler ile birlikte balık hasatalıklarına sebep olan patojenlerin tanımlanması ve hızlı teşhislerinin gelişmesi ile ve bu hastalıklara karşı yeni tip aşı ve immunostimülantların geliştirilmesi balık üretiminde yaşanan kayıpların azaltılmasınavesile olmuştur (Ballesteros vd., 2014; Dhar vd., 2014).

Şu ana kadar ticari olarak elde edilebilen sadece 5 aşı formalin ile öldürülmüş bakteri orjinli ki bu bakteriler *Yersinia ruckerii, Vibrio anguillarum, Vibrio salmonicida, Vibrio ordalli* ve *Aeromonas salmonicida* ile rekombinant aşı olarak pankreatik nekrosis virüsüne karşı geliştirilen 1 adet olmak üzere toplam 6 adet mevcuttur (Kamalii vd., 2018). Bununla birlikte tüm bu aşılar patojenik organizmalardan üretilmiş olmakla birlikte bu organizmaların yaşadıkları alanlar ve sahip oldukları farklı antijenitiler sonucunda bazı aşıların aynı hastalık amile karşı çalışmadığı bilinmektedir. Örneğin, *A. hydrophila*'ya karşı ticari aşılar mevcut olmakla birlikte

çok geniş antijeniteye sahip olan bu organizmaya karşı her ortamda bu aşının çalışmadığı bilinmektedir. Bu aşıların bir çok alanda kullanılıyor olmasına ve hala çok ciddi çalışmalar yapılmasına rağmen, viral enfeksiyonlara karşı yeterli miktarda ve çalışanaşı son derece azdır (Salgado-Miranda vd., 2013).

Tablo 1.1. *Başlıca bakteriyel balık hastalıkları ve aşı uygulamaları*

Bakteriyel Hastalık/Patojen	**Etkilenen Başlıca Balık Türleri**	**Başlıca Bölgeler/Ülkeler**	**Piyasada Satılan Aşılar**
Vibriosis (*Listonella anguillarum* ve V. spp.)	Salmonids	Küresel	Var
	Cod/halibut		Var
	Sea bass/ bream		Var
	Amberjack/yellowtail		Var
Coldwater vibriosis (*Vibrio salmonicida*)	Salmonids	Kuzey Avrupa,Kanada/ABD	Var
Wound disease (*Moritella viscosa*)	Salmonids	Kuzey Avrupa	Var
Furunculosis (*Aeromonas salmonicida subsp.salmonicida*)	Salmonids	Kuzey Avrupa,Kanada/ABD	Var
Atypical *Aeromonas salmonicida*	Salmonids	Küresel	Var
	Various FW/SW species		Yok
ERM/Yersiniosis (*Yersinia ruckeri*)	Salmonids, FW	Avrupa, Şili,Kanada/ABD	Var
Piscirickettsiosis (*Piscirickettsia salmonis*)	Salmonids	Şili	Var
Bakteriyel solungaç hastalığı (*Flavobacterium branchiophilum*)	Various species, e.g.,salmonids ve carp,FW	Kanada//ABD, Avrupa, Şili, Japonya	Yok
Flavobacteriosis (*Flavobacterium psychrophilum*)	Salmonids, FW	Şili, Kanada/ABD(Batı)	Var

Tablo 1.1. Devamı

Columnaris (*Flavobacterium columnare*)	Channel catfish	ABD	Var
	Salmonids, FW	Şili	Var
Rainbow trout fry syndrome (*Flavobacterium psychrophilum*)	Salmonids, FW	Avrupa, Kanada/ABD, Şili	Yok
Enteric septicaemia of catfish (*Edwardsiella ictaluri*)	Catfish species	ABD	Var
		Asya	Yok
Edwardsiella septicaemia (*Edwardsiella tarda*)	Channel catfish	ABD	Yok
	Eel, Japanese flounder	Asya	Yok
Bakteriyel böbrek hastalığı (*Renibacterium salmoninarum*)	Salmonids	Şili, Kanada/ABD	Var
		Avrupa, Japonya	Yok
Lactococciosis (*Lactococcus garvieae*)	Rainbow trout	İtalya, Fransa, İngiltere	Var
	Amberjack/yellowtail	Japonya	Var
Pasteurellosis (*Photobacterium damsela subspecies piscicida*)	Sea bream/sea bass	Akdeniz	Var
	Amberjack/yellowtail	Japonya	Yok
Streptococciosis (*Streptococcus iniae*)	Tilapia	Asya	Var
(*Streptococcus phocae*)	Asian sea bass	Asya	Yok
	Salmonids	Şili	Yok

1.1. Balıklarda Enfeksiyöz Hastalıklar

Balık hastalıkları balık üretiminde kısıtlayıcı bir faktör olarak rol oynamakta ve özellikle kuluçkahanelerde ağır ölümlere neden olmakta ve böylece kârlılığı olumsuz yönde etkilemektedir. Hastalıklarla baş etmenin en iyi yolu hastalıklardan korunmaktır. Kötü su kalitesi, kötü beslenme ve yüksek stoklama oranı gibi etkenlere

ve stres yaratan diğer faktörlere karşı gerekli önlemlerin alınması esastır. Mikroorganizmalardan ileri gelen hastalıklar bulaşıcı karakter taşır ve enfeksiyoz hastalık adını alır. Ancak her enfeksiyoz hastalık bulaşıcı karakterde değildir. Su ortamında yaşayan bakteriyel türlerin bazıları, balıklarda hastalığa neden olmada doğrudan bir sonuç olmadan doğanın dengesi için önemlidir. Bununla birlikte, 34 farklı bakteri familyasına ait yaklaşık 125 farklı bakteri türü, dünyadaki çeşitli balık hastalıkları ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, 16 virüs ailesine ait yaklaşık 100 balık virüsü dünya genelinde izole edilmiş olup, Türkiye'de başlıca 5 balık virüsü tanımlanmıştır. Viral ve bakteriyel balık patojenlerinin listesi genişlemeye devam etmektedir. Büyümek için bakterilerin besin sağlayan organik bir alt yapıya ihtiyacı vardır; bazıları serbest yaşayan organizmalar olarak hayatta kalırlar veya balık patojenleri olarak bulunurlar, bazıları ise sadece bir konakta süresiz olarak hayatta kalırlar (Plumb ve Hanson, 2010). Akuakültürde bulaşıcı hastalıkların en yaygın etkenleri bakteriler ve virüslerdir.

1.1.1. Bakteriyel Hastalıklar

Balıklarda birçok hastalık yapan bakteri görülmekte ve su ürünleri yetiştiriciliğinde balık ölümleri ile beraber önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu patojenlerden başlıca kayıplara yol açanlar; bakteriyel böbrek hastalığına (BKD) yol açan *Renibacterium salmoninarum,* furunkulozise neden olan *Aeromonas salmonicida,* vibriozis hastalığının sebebi *Vibrio anguillarum*, yersiniozis hastalığının etkeni *Yersinia ruckeri*, diğer Aeromonas türleri (*A. hydrophyla, A. sobria, A. caviea, A. schuberti, A. veroni*), columnaris hastalığına neden olan *Flavobacterium columnaris*, balıklara önemli kayıplara yol açan Pseudomonas türleri *(P. putida, P. luteola, P. aeroginosa, P. fluorescens*) ve *Edwarsiella tarda* ile *Edwarsiella ictaluri* olarak gösterilebilir. Bakteriyel balık hastalıklarına ilişkin epizootiyolojik çalışmaların önemli olması ve ülkemizde bu konuda bazı araştırmalar (Diler vd., 1998) bulunmasına rağmen yeterli düzeyde değildir.

1.1.2. Viral Hastalıklar

Genetik birer mucize olan virüsler çok küçük olmaları ve ancak elektron mikroskobu ile görülebilmeleri, nanometre ile ölçülebilmeleri ve en önemli olarak da sadece canlı hücreler içinde üreyebilmeleri ile diğer mikroorganizmalardan ayrılırlar. Basit olarak virüslerin yapılarında bir tek nükleik asit yani RNA veya DNA'nın bulunmasının yanında, bunu kaplayan ve koruyan özel antijenik bir protein kılıfı vardır. Viral nükleik asit virüsün üreyebilmesinde önemli olup virüsün parazit olarak yerleştiği hücrenin metabolizmasını etkileyerek hücredeki normal metabolik işlemlerin yeni virüs partikülleri oluşturmak üzere değişik bir yöne yönelmesine neden olur. Bu olay sonucunda enfekte hücrede yeni nükleik asitler ve bunların etrafım çeviren kapsid adı verilen protein muhafazaları oluşur. Virion adını alan bu ünitenin kapsid viral genom denilen nükleik asidin korunmasını, hücre dışına çıktığında ölmemesini ve başka duyarlı hücreler tarafından absorbe edilerek bunların içine girebilmesini sağlar. Kapsid kapsomer denilen daha küçük ünitelerden yapılmış olup virüse özgü antijenleri bulundurmaktadır.

Başlıca kayba yol açan virüslere örnek olarak; infeksiyöz pankreatik nekrozis virüsü (IPNV), viral hemorajik septisemiye neden olan bir rhabdovirüs çeşidi VHSV, İnfeksiyöz hematopoetik nekrozis hastalığının sebebi IHN virüsü, İnfeksiyöz salmon anemi virüsü (ISAV), sazanların bahar viremisi (SVC) hastalığının etkeni olan rhabdovirüs türü, Herpes virus salmonid hastalığının sebebi olan Herpes virüsü ve Viral eritrositik nekrozis (VEN) sebebi olan iridovirüs çeşidi örnek gösterilebilir.

1.2.Bağışıklık Sistemi

Balıklarda homoiterm omurgalıların aksine kemik iliği ve lenf yumruları bulunmazken, bunların yerine immün sistemde yer alan temel lenfoid organlar olarak timus, böbrek, dalak, karaciğer ve bağırsakla ilişkili lenfoid dokular yer almaktadır. İmmün sistemin temel fonksiyonu hastalıklara neden olan mikroorganizmalara karşı balığı korumaktır. Organizmanın fiziksel, kimyasal, hormonal, hücresel ve humoral savunma faktörleri non-spesifik defans faktörleri olup balıkların hastalıklara karşı

dayanıklı olmasını temin ederler. Spesifik savunma mekanizmaları içinde ise anterior böbrek, dalak ve timus yer alır.

1.3.Hastalıklara Karşı Koruma Yöntemleri

Balıkları hastalıklara karşı korumak için su kalitesinin yükseltilmesi, pollutantların (suyu kirleten kimyasal maddeler) giderilmesi, biyolojik mücadele yapılması, akut toksisiteye ve kronik toksisiteye neden olan toksik maddelerin ortamdan uzaklaştırılması, içinde yaşadığı ortam olması açısından balıklar için önemlidir.

Kültürü yapılan balıklarda hastalıklardan korunma esastır. Yapılması gerekenler, yeterli bakım, hastalıklara dirençli türlerin geliştirilmesi, yeterli beslemenin yapılması ve ilave maddelerin, vitaminlerin katılması, aşıların kullanımı, kemoterapotik maddelerin (antibiyotik ve dezenfektanların) kullanımı ve enfeksiyona neden olan etkenlerin hareketinin önlenmesidir.

1.3.1. Bağışıklık Uyarıcılar

Bağışıklık uyarıcılar (immünostimülantlar), bağışıklık sistemini uyararak güçlendiren, sentetik ve tabii bazı maddelerdir. Stimulant maddeler, spesifik olmayan savunma mekanizmalarını veya spesifik bağışıklık yanıtı yükselten bir kimyasal madde, ilaç veya bitki yada bitkisel ürünler olarak nitelendirilebilir. Balıkları hastalıklardan korumak ve ölümleri azaltmak için immünostimulantlar kullanılır. Fakat immünostimulantlar balığı bütün hastalıklara karşı koruyamaz. (Alınterim B., 2011)

Aşılar, mikroorganizmalar ve bunların ürünlerinden elde edilmiş bağışıklık kazandırma yeteneğine sahip, fakat hastalık yapmayan biyolojik maddelerdir. Aşılar ancak sağlıklı balıklara uygulanabilir.

1.3.1.1. Aşı tipleri

1.3.1.1.1. Ölü aşılar (İnaktif)

Isı, sıcaklık, formaldehit gibi fiziksel veya kimyasal etkenlerle; bakteri ve virüslerin öldürülmesi sonucu elde edilir. Bununda bazı sakıncaları olmasına karşın iyi bir

immun cevap (bağışıklık) şekillenir. Formaldehit ile bakterileri öldürmek mümkündür.

1.3.1.1.2. Atenüe aşılar (Canlı)

Mikroorganizmalar, uzun süre doğal konakçılarının haricinde veya mutant üreme organları haricinde seri pasajlar halinde üretildiklerinde virülansları düşer, buna karşın immunojeniteleri artar. Bu yolla elde edilen aşılara canlı (attenue) aşılar denir. Bu tür aşılar çok iyi bağışıklık sağlar, ancak aşı suşunun orjinal konakçısı olan balıktan balığa pasajı ile virülans artması riski mevcuttur. Bu nedenle bu tür aşıların kullanılmasına çok dikkat gerektirir. Kullanılması risklidir.

1.3.1.1.3. DNA aşıları

1990 Yılların başında ilk olarak plasmid DNA'nın kas içi uygulaması sonucunda doğrudan fare miyositleri tarafından alındığı ve yabancı antijene karşı ana hücreler tarafından tepkiler oluşturuduğu tespit edilmiştir (Wolff vd., 1990).

Bundan çok kısa bir süre sonra DNA aşılarının humoral (Tang vd., 1992) ve hücresel (Ulmer vd., 1993; Sedegah vd., 1994) bağışıklık yanıtların kodlanan aşı antijenine karşı arttığı tespit edildi. Daha sonrasına hayvan modeller üzerinde DNA aşılarının birçok hastalığa akrşı özellikle viral, bakteriyal, parazit ve otoimmune hastalıklara karşı etkinliği tespit edildi. Ayrıca bir çok DNA aşısının Faz I klinik denemeleri tamamlanmıştır (Wang vd., 2001; Wang vd., 1998; MacGregor vd., 1998; Calarota vd.,1998; Tacket vd., 1999).

Plasmid DNA aşıları kullanımda olan aşılar içerisinde birçok avantaja sahip olup bunlar;

a- DNA aşıları konvesiyonel alt ünite aşılarının aksine, CD^{8+}T hücreleri tarafından yürütülen bağışıklık yanıtların MHC-I antijen sunumu yolu üzerinde etkili bir tanımlama işlemi gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Donnelly vd., 2000). Bu yolda, plasmid DNA aşısı güvenlik ile ilgli endişeeri ortadan kaldırarak canlı viral vektör aşıların çalışma prensibleri gibi çalışmaktadır.

b- Plasmid DNA aşıları standart moleküler yöntemler kullanılarak kolayca manipüle edilebilir ve çeşitli şekillerde kullanılabilir. Plazmid DNA aşıları, standart moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak kolayca değişikliğe uğratılabilir ve ölçeklenebilir üretim yöntemleri kolaylıkla temin edilebilir.

c- DNA aşılarının göreceli basitliği ve doğal istikrarı nedeniyle, özellikle gelişmekte olan ülkelerde aşı dağıtımının maliyet olarak düşük ve uygulamasının nispeten kolay olduğunu kanıtlaması muhtemeldir;

d- DNA aşıları doğal olarak güvenlidir. Çoğu DNA aşısı plazmiti dairesel bir formda bulunduğundan, konakçı genomuna entegre olmazlar ve kopyalanamazlar (Wolff vd., 1990). Ek olarak, lupus eğilimli farelerde bile ek mutajenez veya otoimmün tepkilere dair kanıt bulunamamıştır (Mor vd., 1997).

1.3.1.1.3.1. DNA aşılarının temel mekanizması

DNA aşıları çeşitli yollardan (yani intradermal, mukozal ve intramüsküler) ve çeşitli tekniklerle (yani iğne ve şırınga, biojector veya "gene gun" yoluyla) verilebilir. Bugüne kadar en yaygın kullanılan yol intramüsküler aşılama olmuştur. Plazmid DNA'nın kas içine verilmesini takiben aşı DNA'sı, öncelikle miyositler ve bir dereceye kadar kemik iliği kaynaklı antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından alınır. APC'ler tarafından alındıktan sonra, DNA ile kodlanmış aşı antijeni eksprese edilir ve daha sonra MHC Sınıf I molekülleri ile birlikte bağışıklık sistemine sunulur. Ek olarak, yabancı antijenin MHC Sınıf I tanıtımı, somatik hücrelerin daha sonra olgunlaşmamış dendritik hücreler tarafından alınan yabancı antijeni eksprese ettiği ve bıraktığı çapraz çalışma yoluyla da sağlanabilir (Fields vd., 1998). Yabancı antijen ekspresyonu ve MHC Sınıf I molekülleri ile sunumu, saf CD^{8+} T hücrelerinin aktifleştirilmiş efektör hücreler haline gelmesini sağlamak için gereklidir. Ek olarak miyositler, MHC Sınıf II molekülleri ile birlikte bağışıklık sistemine sunulması için profesyonel APC'ler ile fagositoz için yabancı antijen salgılayabilirler. Eksojen aşı antijen ekspresyonu böylece antikorun ve CD^{4+}T yardımcı hücre immün yanıtlarının uyarılmasına neden olur (Egan vd., 2002).

Su ürünleri yetiştiriciliğindeki aşıların çoğu, bir adjuvan ile formüle edilmiş ve enjeksiyon yoluyla verilen etkisizleştirilmiş ürünlerdir ve temel olarak koruyucu

antikorların üretimine başlanarak koruma sağlarlar. Bu teknoloji birçok bakteriyel hastalık için iyi çalışır (Sommerset vd., 2005), çoğu durumda nötralize edici antikorlar, bakteriyel bir enfeksiyonu önlemek veya durdurmak için yeterlidir. Bununla birlikte, viral hastalıklarda yeterli koruma sağlamak için immün tepkinin hücresel kollarını uyarmak çoğu zaman gereklidir (Biering vd., 2005). Günümüzde su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan viral aşıların çoğunun sınırlı etkinliğe sahip olduğu gerçeği (Gomez-Casado vd., 2011) etkisizleştirilmiş protein antijenleriyle olan yaklaşımın birçok viral hastalık için suboptimal olduğunu açıkça göstermektedir. DNA aşılaması, antijenlerin kendileri yerine koruyucu antijenleri kodlayan bir genin veya genlerin kullanımına dayanan genetik immünizasyondur. DNA aşıları, bir patojenden türetilmiş bir veya daha fazla gen içeren genetik yapılardır ve koruyucu bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmak amacıyla aşıdaki bu genlerden geçici protein üretimini kolaylaştırmak için tasarlanmışlardır. DNA aşıları genellikle bakteriyel konakçılarda çoğalabilen dairesel bir DNA molekülü olan saflaştırılmış bir bakteri plazmidi formundadır. Yapılar, hem bakteriyel konakçıda plazmidin çoğaltılmasını, hem de üretim amaçları için aşılanan hayvanlarda aşı genlerinin ekspresyonunu sağlamak için düzenleyici elemanlar içerecektir. Bazı durumlarda NAV (nükleik asit aşısı) terminolojisi veya genetik aşı kullanılır ve bu terimler ayrıca DNA'dan (RNA dahil) başka nükleik asitlere dayanan aşıları da içerir. DNA aşıları genellikle adjuvan olmadan intramüsküler enjeksiyonla verilir. Plazmidler hücreleri, özellikle miyositleri ve aynı zamanda dendritik hücreler gibi profesyonel antijen sunan hücreleri de transfekte edecektir (Liu, 2011). Transfekte edilmiş hücreler plazmidlerden protein üretir ve bunu MHC sınıf I molekülleri üzerinde sunar, bu şekilde viral bir enfeksiyonu taklit eder. Bu, adaptif bağışıklık sisteminin üç kolunun da uyarılmasına yol açar; yani antikorlar, yardımcı T hücreleri ve sitotoksik T lenfositleri (CTL' ler). Balıklarda DNA aşılarına karşı bağışıklık tepkisi yakın zamanda gözden geçirilmiştir (Kurath, 2008; Tonheim vd., 2008) ve üç faza ayrılmıştır. Bunlardan ilki, spesifik olmayan ancak en azından rabdovirüs viral hemorajik septisemi virüsü (VHSV) için erken antiviral cevaptır (EAVR). Ayrıca aşıda bulunmayan bir virüse karşı heterolog koruma sağlayabilir (Sommerset vd., 2003). Takip eden spesifik antiviral cevap (SAVR), genellikle spesifik antikorların ortaya çıkması ve korunmanın ve antikor titrelerinin azaltıldığı, ancak yine de önemli olduğu, uzun vadeli antiviral cevap (LAVR) tarafından takip edilen artmış koruma

ile karakterize edilir. DNA aşılarının spesifik bir avantajı, bağışıklık sisteminin hücresel kolunun aktivasyonundan dolayı, hücre içi olarak barındırılan virüsün öldürülmesinde etkili olmalarıdır; bu, önceden mevcut olan hastalığı tedavi etmek için geleneksel inaktive aşılara karşı spesifik bir avantajdır.

Buna göre, DNA aşıları, etkisiz hale getirilmiş aşılardan çok daha fazla bir viral enfeksiyonu taklit edebilir ve bazı durumlarda bu, daha iyi bir koruyucu immün tepkisi ile sonuçlanır.

Tablo 1.2. *DNA aşılarıyla ilgili avantajlar ve potansiyel riskler. (Moreno ve Timon, 2004).*

Avantajlar	Potansiyel riskler
- Üretilmesi ve iletilmesi kolaydır, "soğuk zincir" ihtiyacını ortadan kaldırır.	- Plazmidlerin aylarca veya yıllarca in vivo olarak kalma kapasitesi, tolerans ve hatta otomatik reaktiviteye yol açabilir.
- Bağışıklık sistemini sürekli olarak uyaran stabil ve uzun süreli antijen ifadesi.	- Rekombinant DNA'nın konakçının genomuna stabil entegrasyonu, onkogenler veya tümör baskılayıcı genler gibi bazı genlerin aktifleştirilmesine veya devre dışı bırakılmasına neden olabilir.
- Antijen işleme ve hem MHC sınıf I hem de sınıf II moleküllerine yükleme, daha yakından viral bir enfeksiyona benzer.	- Kodlanmış bakteriyel genler, antibiyotiğe dirençli genler ve sadece çoğaltma veya üretim için gerekli diğer diziler (bu genler transfekte hücrelerde düşük oranlarda bile ifade edilir).
- Nitel olarak farklı bağışıklık tepkileri ortaya çıkar.	- Plazmidin omurgasında bulunan CpG sekansları spesifik olmayan bir immün tepkiye neden olabilir.
- Protein antijenisitesini cDNA seviyesinde manipüle etme imkanı.	
- Plazmid-DNA-kodlanmış sitokinler veya birlikte-uyarıcı moleküller ile birlikte verildiğinde, kodlanmış antijene cevabın arttırılması veya modülasyonu imkanı.	

1.3.1.1.4. Alt ünite aşılar

Alt birim aşıları, rekombinant vektörlerde patojenlerin spesifik immünojenik proteinlerinin ekspresyonuna dayanır. Rekombinant proteinler daha sonra in vitro olarak büyük miktarlarda eksprese edilir ve sonra saflaştırılır. Vektörlerin ve hücre sistemlerinin seçimi şunlardan etkilenir: (i) büyük miktarlarda heterolog proteinlerin in vitro üretimini kolaylaştırabilme; (ii) manipülasyon kolaylığı; ve (iii) antijenik proteinin konformasyonel yapısını ifade etme yeteneği. Sonuç olarak, balık hastalıkları için alt ünite aşılarının üretimi için farklı prokaryotik ve ökaryotik hücre sistemleri kullanılmıştır. Genellikle bu aşıların, araştırma geliştirmenin ilk aşamalarından sonra daha az pahalı olması beklenir.

1.3.1.1.5. Sentetik peptid aşılar

Sentetik peptitler uygun antijenik bölge olarak veya bir alt ünite aşı olarak görev yapmak için kullanılabilir. (Coeurdacier vd., 2003; Tam, 1988). Sentetik peptitlerin IHNV, nodavirüs, VHS, rabdovirüs ve IPNV, birnavirüs için antikor üretimini uyarabildiğini bulmak için bazı bilim adamları tarafından araştırmalar yapılmıştır (Coeurdacier vd., 2003). Peptit aşıları, konakçıya uygulandığında koruyucu bağışıklık tepkisi uyandırabilen sentetik peptidlerden oluşur. Peptit aşıları üretmek için, antijenik protein üzerindeki epitoplar olarak da bilinen immünojenik bölgeleri tanımlamak gerekir. Epitop terimi, spesifik olarak antikorlara veya immün T hücrelerinde bulunan reseptörlere spesifik olarak bağlanan antijenlerde 6-8 aminoasit uzatımı anlamına gelir. Spesifik B hücreleri tarafından üretilen antikora bağlanan bu epitoplar, B-hücresi epitopları olarak adlandırılırken, aktive olmuş yüzeydeki reseptörler tarafından tanınırlar. T hücreleri, T hücresi epitopları olarak adlandırılır. Monoklonal antikorlar, B hücresi epitoplarını tanımlamak için vazgeçilmezdir. Örneğin IHNV glikoproteini üzerindeki 270-336 aminoasit, IPNC'nin VP2 proteini üzerindeki epitop tanımlanmıştır. Ayrıca, *E. coli* kullanılarak IPNV'nin Sp suşunun IPNV VP2 proteininin silme kısımları eksprese edilmiş, VP2 üzerindeki 86-210 aminoasitlerin gerilmesindeki epitop, başka bir konserve edilmiş nötralizasyon epitopu olarak tanımlanmıştır. N1-F2, aminoasitler 204-330 bölgesinde bulunur. Bununla birlikte, bu peptid aşısını kullanan in vivo etkinlik çalışması bugüne kadar bildirilmemiştir.

1.3.1.1.6. Parçacık aşılar

Bakteriler ve parazitik hücre lizatları, sonikleşmiş hücreler ve lipopolisakaritler (LPS) gibi diğer alt hücreli maddeler, preparasyonlarda kullanılan antijenlerin bir kısmını oluşturur. Bununla birlikte, bu aşılar su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanım için henüz mevcut değildir.

1.3.1.1.7. Rekombinant protein aşısı

Aşı antijenleri olarak rekombinant proteinlerin, *Escherichia coli*'de eksprese edilen çeşitli insan ve hayvan patojenlerine (Diane Williamson vd., 1995) karşı faydalı koruma sağladığı gösterilmiştir (Gilmore vd., 1988; Lorenzen vd., 1993), ve ayrıca maya (Allnutt vd., 2007) ve böcek hücrelerinin (Cain vd., 1999), hedeflenen bir patojene karşı koruyucu bağışıklık sağladıkları da gösterilmiştir. İdeal olarak, bir rekombinant protein aşılarının üretimi, immünojenik alt ünitenin veya proteinin ilgilenilen patojenden tanımlanması ve immünojenikliğinin in vivo ve in vitro olarak doğrulanması ile başlar. Örneğin, IHNV ve VHSV'den saflaştırılmış glikoproteinler, balıklarda alt ünite aşıları olarak kullanılmıştır ve bağışıklık koruyucu oldukları gösterilmiştir. Genellikle rekombinant proteinleri ifade etmek için kullanılan vektör sistemleri virüs veya bakteri plazmitleridir. Prokaryotik sistem olarak en yaygın kullanılan balıkta viral, bakteriyel ve parazitik antijenleri üretmek için hem prokaryotik hem de ökaryotik ekspresyon sistemleri kullanılmıştır.

1.3.1.1.8. Ökaryotik hücrelerde üretilen balık viral aşıları

Prokaryotik hücrelerin yanı sıra, böcek virüsleri olarak birkaç ökaryotik hücre, balık viral proteinleri üretmek için vektör olarak bakulovirüs ile rekombinant protein ekspresyonu konakçısı olarak kullanılmıştır. IPNV poliproteini ve IHNV glikoproteininin bakulovirüs içinde eksprese edildiği ve antijenik olduğu bulunmuş ancak daha sonra balık immün korumasında etkinliği henüz test edilmemiştir. VHSV ayrıca böcek hücrelerinde çoğalabilmekte olup, VHSV tarafından öldürülmüş aşıdan daha immün korumalı olan biyolojik olarak aktif G proteini üretebilir. Bununla birlikte, buradaki problem, bu rekombinant glikoproteinin üretimine ek olarak, böcek hücrelerinin ayrıca bakulovirüs partikülleri üretmesidir. Bu, eksprese edilen proteinin

saflaştırılmasını zorlaştırır, çünkü eksprese edilmiş proteini aşı olarak kullanmadan önce bu bakulovirüs partiküllerinin inaktive edilmesi gerekir. Öte yandan, tam uzunlukta bir protein olarak bakteri ve böcek hücresi tarafından üretilen proteinler üzerinde daha iyi sonuç verir.

1.3.1.1.9. Balık bakteriyel hastalıkları için rekombinant protein aşısı

Proteazlar ve demirle düzenlenmiş dış zar proteinleri gibi balık bakteri dışı hücre ürünlerinden bazıları, son birkaç yılda rekombinant aşı gelişimi için hedef antijenler olmuştur. *A. salmonicida*'nın 70 kD serin proteazının füzyon proteini klonlanmış, eksprese edilmiş ve bir prototip aşı olarak kullanılmıştır. Dünyadaki birçok araştırmacı, rekombinant dış membran proteinlerinin aşı adayları olarak potansiyel kullanımını araştırmıştır. *A.salmonicida*'nın Hemolysin geni klonlanmıştır, ancak bu proteini kullanan in vivo immünizasyon çalışmaları için hiçbir rapor mevcut değildir. Bu rekombinant proteinler aşı olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Son zamanlarda, bazı araştırmacılar 43 kD dış membran proteini olan *A.hydrophila*' nın doğal majör adezyonunun aşı olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir.

1.3.1.1.10. Genetiği değiştirilmiş canlı aşılar

Genetik mühendisliği kullanılarak canlı zayıflatılmış aşı üretimi tipik olarak patojende bir zayıflamaya neden olan metabolik yolun veya virülans geninin silinmesi, bozulması veya eklenmesi ile yapılır. (Meeusen vd., 2007). Tanımlanmış genetik değişikliklere sahip patojenler veya immünojenik proteini kodlayan geni taşıyan mikrobiyal vektörler canlı aşılar olarak kullanılabilir. Canlı aşılar, alıcı konağın içinde doğal enfeksiyona benzer şekilde çoğalır ve bu da güçlü bir bağışıklık sağlar. Bu tür bir aşının, kopyalanmayan aşı ürünlerinden daha fazla immünojenik olduğu raporedilmiştir. Son on yılda, balık patojenlerine karşı bu tür canlı aşıların üretilmesi için bazı araştırmalar yapılmıştır.

A. salmonicida ve *A. hydophila* gibi bazı balık bakteri patojenlerine karşı canlı aşılar kullanılmıştır. Homolog rekombinasyon, kimyasal mutagenez ve transpozon mutagenez gibi çeşitli teknikler, avirülan olan ve canlı aşılar olarak kullanılabilecek

mutant bakteri üretmek için kullanılır. Avirulent suşu, VHSV ve IHNV glikoproteinlerinin epitoplarını taşımak için bir taşıyıcı vektörü olarak bir A440 *A. salmonicida* suşu gökkuşağı alabalıklarında canlı aşı olarak kullanılmış ve bağışık hale getirilmiş balıklar, IHNV ve VHSV'ye karşı öldürücü tehditlere karşı koruyucu bağışıklık göstermiştir.

1.3.1.2. Aşılama Yöntemleri

1.3.1.2.1 Oral Aşılama

Bu yöntemde aşılar balık gıdalarına karıştırılarak ağızdan verilir. Fakat aşı sindirim kanalından geçerken değişikliğe uğradığından ya da yem maddeleri ile ilişkiye girebileceğinden aşının bağışıklık gücü azalır. Aşılama için stressiz bir yoldur. Her boydaki balık yoğun şekilde aşılanabilir. Ancak bir başka dezavantajı ise farklı yem tüketimi nedeniyle popülasyondaki balıkların aynı oranda aşılanamamasıdır.

1.3.1.2.2. İmmersiyon

Banyo yolu ile yapılan aşılama iki şekilde olmaktadır. Normal suya katılarak yapılan aşılama ve hiperozmotik daldırma. Hiperozmotik daldırmada balık yoğun tuzluluğa maruz bırakıldıktan sonra aşılı suda balığa banyo yaptırılır. Yoğun tuzlu suda balık su kaybeder, sonra aşılı suda banyo yapılırsa vücuda su-aşı girmesi sağlanmış olunur. İki yöntem arasında etki bakımından farklılık olmadığından hiperozmotik daldırma yöntemi pek kullanılmaz.

1.3.1.2.3. Enjeksiyon

Enjeksiyon ile aşılamada aşı balıklara karın bölgesinden intraperitonal yolla yapılır. Balıklar aşı yapılmadan önce uygun bir anestezik madde ile anestezi edilmelidir. Enjeksiyon yöntemi ile yapılan aşılamalar otomatik enjektör ve tecrübeli bir ekip tarafından kısa sürede yapılmalıdır. En uzun ve en yüksek bağışıklık sağlar. Birçok hastalığa karşı kullanılabilir ve birkaç hastalık için kombine edilebilir. Ayrıca çevre kirliliği yaratmaz

1.4. *Renibacterium salmoninarum*

1.4.1. Duyarlılık

Bir salmonid konakçının bakteriyel böbrek hastalığına (BBH) karşı duyarlılığını etkileyen farklı unsurlar vardır. *R. salmoninarum* ile enfekte olup BBH geliştiren türler sadece Atlantik somonu (*Salmo salar*), çeşitli Pasifik somonu türleri (*Oncorhynchus spp.*), alabalık (*Salmo spp., Salvelinus spp.*) ve gölge balığı (*Thymallus*) gibi salmonid türleri olduğu için bu hastalık yalnızca salmonidlere özgü bir hastalık olarak bilinmektedir. Salmonid olmayan balıklarda *R. salmoninarum* deneyleri ile ilgili literatürde yeterli bilgi olmamasına rağmen yapılan bir çalışmada *R. salmoninarum*' a maruz bırakılan *Lampetra tridentata* türünde hastalık ortaya çıkmamıştır (Bell ve Traxler, 1986). *Anoplopoma fimbria* türünde, BBH her ne kadar doğal olarak meydana gelmese de intraperitoneal enjeksiyon ile deneysel olarak gerçekleştiği bildirilmiştir (Bell vd., 1990).

Salmonid türleri arasında BBH'na duyarlılık önemli ölçüde farklılık gösterirken, Pasifik somon türleri en duyarlı, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ise en dirençli türdür (Evelyn vd., 1988; Bruno, 1988; Sakai vd., 1991). Bir tür içindeki genetik değişkenlik de duyarlılık konusunda intraspesifik farklılıklar ortaya çıkarabilir. Örneğin Winter vd. (1980), koho somonu ve gökkuşağı alabalığı türlerinde genotipe bağlı olarak BBH'na direnç hususunda farklılıklar olduğunu bildirmiştir. Kral somonu (*Oncorhynchus tshawytscha*) ve Atlantik somonu (*Salmo salar*) türlerinde BBH duyarlılığının kalıtım derecesi incelendiğinde BBH kalıtım derecesi bileşenlerinin bu salmonid türlerindeki herhangi bir başka bakteriyel hastalıktan daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Beacham ve Evelyn, 1992). BBH direnci için stokların genetik manipülasyonu umut verici bir konu olmakla birlikte literatürde yaygın olarak bulunmamaktadır. Kromozom sayısı manipülasyonu ile BBH direncinin arttırıldığına dair literatürde bir kanıt yoktur. Brune ve Johnstone (1990) BBH direnci konusunda triploid ve diploid Atlantik somonlarında bir fark bulamamıştır.

Balığın yaşı, BBH duyarlılığı üzerinde bir etkiye sahip gibi gözükse de her aşamadaki jüvenil ve yetişkin salmonid bireyleri bu hastalığa karşı korunmasızdır. Stres duyarlılığı ve konakçı immünolojik kabiliyetinin yeterliliği yaşa bağlıdır ve BBH gelişimi üzerine doğrudan etki eder. Örneğin smoltifikasyon, BBH duyarlılığını artıran fizyolojik bir stres uygular (Paterson vd., 1981b).

Bakteriyel böbrek hastalığı, büyük ölçüde yetiştirilen (kuluçkahane) balıkların bir problemi olarak kabul edilir ancak vahşi popülasyonlar da oldukça duyarlı görünmektedir (Bruno, 1988a). *Renibacterium salmoninarum,* dünya genelinde her yerde yabani salmonid popülasyonlarında tespit edilmiş ve BBH salgınları da aynı şekilde vahşi balıklardan rapor edilmiştir (Mitchum ve vd., 1979).

Çeşitli dışsal, yani çevresel faktörler de bir salmonidin BBH'na duyarlılığını önemli ölçüde etkiler. Sıcaklık, hem patojenin virülansını hem de konağın immünolojik tepkisini etkilediği için BBH gelişimini etkileyen çevresel bir parametredir. Benzer şekilde, BBH gelişimi ve salgınların ortaya çıkışı, muhtemelen su sıcaklığındaki dalgalanmalara bağlı olarak mevsimsel olarak değişir (Fryer ve Sanders, 1981). Tuzluluk dahil diğer su kalitesi parametrelerinin de BBH gelişimini etkilediği bildirilmiştir. Anadrom salmonid türlerinin, tatlı sudan tuzlu suya göç etmesi sırasında önemli derecede BBH kaynaklı mortalite düzeylerinin görüldüğü belirtilmiştir (Banner vd., 1983; Paterson vd., 1981). Besinsel parametreler de salmonidler arasında BBH duyarlılığını etkileyen başka bir dışsal değişkendir. Çeşitli iz mineraller ve vitaminleri içeren diyet takviyesinin, salmonidlerde BBH prevalansını önemli ölçüde azalttığı bildirilmektedir. Artan iyot ve flor seviyeleri, gökkuşağı alabalığı ve Atlantik somon balıklarında azalmış BBH ile ilişkilendirilmiştir (Lall vd., 1985; Bowser vd., 1988). Buna karşılık, kral somonunda E vitamini veya selenyum takviyesi ile *R. salmoninarum* prevalansı arasında bir ilişki bulunamamıştır (Thorarinsson vd., 1994).

1.4.2. Bulaşma

Renibacterium salmoninarum doğrudan balıktan balığa hem yatay hem de dikey olarak bulaşır. Yatay bulaşma, enfekte olmuş veya hem enfekte olmuş hem de

taşıyıcı birey ile enfekte olmamış bireylerin doğrudan teması sonucu ya da enfekte olmuş dokunun tüketilmesi sonucu gerçekleşir (Mitchum ve Sherman, 1981; Wood ve Wallis, 1955). Fekal-oral geçiş ayrıca, enfekte olmuş konakçı balık dışkısında *R. salmoninarum* bulunması ve 21 güne kadar sudaki organik atıklar üzerinde yaşayabilmesi nedeniyle de meydana gelebilir (Austin ve Rayment, 1985; Balfry, 1990). Yatay bulaşma için *R. salmoninarum* taşıyıcıları klinik belirti gösteren hastalıklı bireyler veya belirti göstermeyen enfekte taşıyıcılar olabilir. Balık-balık teması olmadığı zamanlarda su kaynaklı organizmalar aracılığıyla hastalığın yatay olarak bulaştığı ortaya konmamıştır ve olası olduğu da düşünülmemektedir (Kaattari vd., 1989). Bununla birlikte, yumurtaların (ovum içi) ve akabinde gelişen larvaların *R. salmoninarum* ile enfekte olması şeklinde gelişen dikey bulaşma doğada meydana gelen enfeksiyonun daha önemli bir yolu olarak ortaya çıkmaktadır (Evelyn vd., 1986a; Evelyn vd., 1984).

Henüz *R. salmoninarum* ile bağlantılı olan hiçbir spesifik vektör veya salmonid olmayan rezervuar tanımlanmamıştır. Mavi midyenin (*Mytilus edulis*) deniz suyunu *R. salmoninarum*'dan arındırdığı bildirilmiş ancak bu yumuşakçanın canlı organizmaları barındıracak bir rezervuar olabileceği düşünülmemektedir (Paclibare vd., 1994). Bununla beraber, salmonidlerde kullanılan zayıf ve yetersiz muamele veya örnekleme uygulamaları da *R. salmoninarum*'unyatay bulaşmasını tetikleyen mekanik vektör kaynağı yaratabilir. Örneğin, Elliott vd. (1994), somonların kodlanmış tel etiketlemesinin, patojeni kontamine iğneler yoluyla bulaştırabileceğini göstermiştir.

1.4.3. İnkübasyon ve Yayılma

İlk maruziyetten klinik hastalığa kadar geçen süre, çeşitli koşullara bağlı olarak değişiklik gösterir. İnkübasyon, daha önce de belirtildiği gibi çevresel faktörlerden (su sıcaklığı, tuzluluk vb.) etkilenebilen unsurlar olan patojenin virülansı ve salmonid konağın immüno-yeterliliğine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. BBH genel olarak kronik bir hastalık olarak kabul edilse de akut epizootikler nadir değildir ve kesin bir kuluçka süresi tanımlanmamıştır.

R. salmoninarum patojeninin konakçıya ilk girişinin, gözde veya gastrointestinal sistemde bulunan deri veya mukoza zarları yoluyla gerçekleştiği bilinmektedir. Patojenin buna müteakip hangi yolu izleyerek yayıldığı henüz belirlenmemiş olsa da konakçı içinde fagozitler aracılığıyla intraselüler olarak veya dolaşım sistemi ve diğer vücut sıvıları ile ekstraselüler olarak hareket etmesi muhtemeldir (Evendon vd., 1993). Hangi durumda olursa olsun, maruz kaldıktan sonra sistemik yayılmanın hızlı bir şekilde gerçekleşme ihtimali yüksektir. Bruno (1986a), intraperitoneal enjeksiyon yoluyla *R. salmoninarum* enjekte edilen balıkların böbrek ve dalak hücrelerinde bakteri mevcudiyetini maruz kalmadan sonraki 45 dakika içerisinde ortaya koymuştur.

1.4.4. Patoloji

Konakçı dokusunda BBH'ndan dolayı meydana gelen patolojik değişimlerin oldukça ciddi ve multisistemik olması muhtemeledir. Bu dokularda meydana gelen lezyonlardan genellikle yangı esnasındaki ikincil süreçler sorumludur. Bu süreçler ile ilgili bazı literatürdeki açıklamalar şunlardır: Patojenin hasar verdiği konak hücresinden salgılanan bakteriyel sitotoksinler ve/veya proteolitik etmenler; konakçı hücresinde meydana gelen ve bakterinin neden olduğu mekanik hasarlar sonucu enzimler ve yangısal aracıları da içeren ekstraselüler hücre bileşenlerinin salgılanması; *R. salmoninarum* antijeni tarafından tetiklenen ve konakçı bağışıklık sisteminin kendi dokularına saldırmasına neden olan immünolojik hipersensitivite reaksiyonu (Evendon vd., 1993; Young ve Chapman, 1978). Ayrıca bu mekanizmaların bir kombinasyonunun meydana gelmesi de oldukça mümkündür. Bahsedilen her mekanizmanın hastalık gelişimine nispi katkısı, klinik ve patolojik BBH tezahürlerinde karşılaşılan değişkenliği kısmen de olsa açılayabilir.

R. salmoninarum ile enfekte olmuş balıklardaki dış lezyonlar sıklıkla değişkenlik gösterse de aşağıda belirtilen semptomları içerebilir: Özellikle yüzgeçler ve harici vücut boşlukları etrafında görülen peteşiyal kanamalar; tek taraflı veya bilateral egzoftalmi, nihayetinde yırtılıp büyük ülserli lezyonları meydana getirmek üzere birleşen deri kabarıklıkları (bakteri ve seröz, serosanguinöz veya irinli sıvı

içeren),deri apseleri, bozulmuş deri pigmentasyonu ve vücut boşluğunda sıvı birikmesi nedeniyle meydana gelen karın gerginliği.

İç lezyonlar da benzer şekilde değişiklik gösterebilir, ancak sıklıkla şunları içerir: iç organların, özellikle karaciğer, dalak ve böbreklerin gaz ile şişmesi; fokal apseler ve/veya iç organlardan, özellikle karaciğer, dalak ve böbrekten yayılan irinli sızıntı; iç organlar ve vücut duvarı kaslarındaki peteşiyal kanama; genellikle soluk ve benekli karaciğer, kızıllaşmış dalak ve griden beyaza dönen böbrek şeklinde ortaya çıkan iç organların renk değişimi; çeşitli iç organların psödomembranöz kaplanması; ve vücut boşluğunda bol miktarda seröz/serosanguinöz sıvı birikimi (Evendon vd., 1993; Bullock ve Herman, 1988; Fryer ve Sanders, 1981).

Histolojik olarak BBH patolojisi de oldukça fazla değişkenlik gösterir, ancak genellikle kronik yangı belirtileri ile ilişkilendirilir. BBH histopatolojisinin ayırt edici özelliği multisistemik, difüz granülomatöz enflamatuar lezyonlardır (Fryer ve Sanders, 1981). Granülom oluşumu çeşitli dokularda ortaya çıkabilir ve makrofajlar, nötrofiller ve trombositlerin neden olduğu hücresel doku infiltrasyonu eşliğinde veya ondan önce meydana gelir.

En sık ve ciddi şekilde etkilenen organlar arasında karaciğer, dalak, boşaltım böbreği ve hematopoetik böbrek yer alır. Ek olarak, kalp, gonad, solungaç, hava kesesi, gastrointestinal sistem (pankreas dahil) ve duyu organlarını içeren merkezi sinir sisteminin sıklıkla BBH kaynaklı lezyonlar gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca diğer organ sistemlerinde de yoğun nekrotizan miyokardit, hafif ila şiddetli meningoensefalit/ventrikülit ve benzeri yangısal değişiklikler tanımlanmıştır (Bruno, 1986a). Etkilenen tüm dokularda, çok sayıda *R. salmoninarum* ile hem hücre içinde hem de hücre dışında sıklıkla karşılaşılır.

Ultrayapısal lezyonlar, genellikle şiddetli akut-kronik yangıyla ilişkili hücresel hasar ile meydana gelir. BBH'nın neden olduğu lezyonlardaki hücresel değişiklikler: mitokondrinin şişmesi ve yırtılması, endoplazmik retikulumun genleşmesi, sitoplazmanın yağ infiltrasyonu, liozomal ve nükleer morfolojik bozulmalar, vakuollaşma, bazal sınırlar boyunca kolajen birikimi, hiyalin granül birikimi (renal

tübül hücreleri) ve eninde sonunda hücre zarı bütünlüğünün yitirilmesi olarak sıralanabilir (Young ve Chapman, 1978).

BBH'ndaki morfolojik bulgular çeşitli fizyolojik değişikliklerle ilişkilidir. BBH, hematokrit, hemoglobin, eritrosit çapı ve olgun-olgunlaşmamış eritrosit oranı değerlerinde azalmaya neden olarak kan parametrelerini etkiler (Bruno ve Munro, 1986; Suzumoto vd., 1977). BBH kaynaklı aneminin, muhtemelen dalakta eritrosit tutulmasıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. BBH geçiren salmonidlerde serum kimyası parametrelerinde de değişiklik tespit edildiği bildirilmiştir. Bu değişiklikler: hipoproteinemi, hipokolesterolemi, hiponatremi, hiperkalemi, hipoglisemi ve hiperbilirubinemidir (Bruno, 1986b; Fryer ve Sanders, 1981). Azalan serum protein seviyelerinin, böbrek veya karaciğer yetmezliği ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır (diğer bir deyişle aşırı protein atılımı veya azalan protein sentezi). Hiperbilirubinemi, karaciğer fonksiyon bozukluğuna bağlanabilir. Elektrolit dengesizliği, doğrudan böbrek yetmezliğiyle veya multisistemik hücresel hasara müteakip karşılıklı hücresel membran elektrolit gradyanlarının bozulmasıyla ilişkili olabilir. Her halükarda, bu dengesizlikler intra/ekstravasküler hidrostatik basınç ve sıvı dengelerini etkiler, bu da ekstravasküler alanlarda ve dolaşım sisteminde serbest sıvı birikimi gibi daha fazla fizyolojik fonksiyon bozukluğu ile sonuçlanır (Bruno, 1986b). Ciddi sıvı dengesizliği ve dolaşım yetmezliğinin yanı sıra hayati organlardaki işlev bozukluğu (öncelikle böbrek), BBH kaynaklı ölümün başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilir (Hayakawa vd., 1989; Evendon vd., 1993).

1.4.5. Teşhis

R. salmoninarum'un tespiti ve BBH'nın teşhisi son birkaç on yılda büyük ölçüde hassas hale getirilmiştir. Geçmişte BBH'nın erken teşhisi, etkilenen dokularda gram pozitif diplobasillerin tanımlanması ve klinik bulgular ile ilişkilendirilmesi neticesinde sağlanıyordu. Daha sonra, hassas kültür teknikleri geliştirilerek yapay ortamlarda bakteri çoğaltılması mümkün kılındı ve bu sayede *R. salmoninarum*'un mevcudiyeti doğrulanabildi. Bununla birlikte, bu tanısal yöntemler genellikle pratik değildir ve yetersizdir, çünkü Gram boyama diğer korineform bakterileri engellemez ve kültür ortamında *R. salmoninarum*'un başarılı kültürü en iyi şartlarda üç haftadan

fazla sürebilir (Fryer ve Sanders, 1981).Bu nedenle, bakteri kültürünün teşhis açısından oldukça güvenilir olduğu kanıtlanmış olsa da, zaman kısıtlaması bunu tek başına kullanıldığında teşhis için istenmeyen bir seçenek haline getirir.

Çeşitli serolojik teknikler BKD tanısının kolaylığını ve güvenilirliğini büyük ölçüde geliştirmiştir. Chen vd. (1974), enfekte olmuş konak dokusunda *R. salmoninarum*'un çözünür antijenini saptamak için bir immünodifüzyon testi bulmuşlardır. Benzer şekilde, Kimura (1978) dokularda *R. salmoninarum* antijenini tespit etmek için bir *Staphylococcus* pıhtılaşma tekniğini tarif etmiştir. Bullock ve Stuckey (1975), *R. salmoninarum*'un hücre yüzeyi antijenine karşı geliştirilen bir floresan antikor tekniğini (FAT) aktarmıştır. Bu testin hız ve hassasiyet kabiliyeti nedeniyle BBH tanısında önemli bir gelişme olduğu belirtilmiştir (Fryer ve Sanders, 1981). Bu dolaylı FAT'nin bazı varyasyonlarının klinik ve araştırma ile ilgili tanıda oldukça faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Bullock vd., 1980; Cvitanich, 1994; Elliott ve Barila, 1987; Evenson vd., 1994).

Pascho ve Mulcahy (1987) de *R. salmoninarum* antijeninin tespiti için ELISA testi geliştirerek BBH teşhisine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Bu testin ileride geliştirilmesi sonucunda hassasiyeti, spesifikliği ve kullanım kolaylığı da artmıştır (Hsu vd., 1991; Sakai vd., 1987). Bununla beraber karşı immünoelektroforez (Cipriano vd., 1985), melanin içeren hücrelerin immünohistokimyası (Jansson vd., 1991) ve western blot (Olivier vd., 1992) gibi serolojik yöntemler de *R. salmoninarum* antijeninin tespitinde hala kullanılmaktadır. *R. salmoninarum*'un çözünebilen antijenini teşhis eden serolojik yöntemlerin, çeşitli FAT tekniklerine nazaran daha hassas olduğu görülmektedir. Yine de, özellikle asemptomatik balıklar için, her iki teknik de klinik bulgular, histopatoloji ve/veya Gram boyamaya dayalı teşhis yöntemlerinden daha güvenilirdir (Griffiths vd., 1991; Cipriano vd.,1985). BBH için mevcut olan çeşitli teşhis yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları değerlendirildiğinde, en cazip yaklaşımın seroloji, bakteri izolasyonu ve histolojiyi içeren çoklu teknikleri kapsadığı söylenebilir (Teska vd., 1995).

BBH tanısında diğer bir etkili yöntem genetik probların ve gen amplifikasyon tekniklerinin kullanımıdır. *R. salmoninarum* için hem DNA hem de RNA probları

geliştirilmiş ve bakteriyi konakçı dokusunda tespit etmek için başarıyla kullanılmıştır (Leon vd., 1994a). Gen apmlifikasyonu yani polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), hassasiyeti arttırmak için genetik problarla birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır (Leon vd., 1994b; Brown vd., 1994). BBH'nın genetik teşhisinin serolojik yöntemlere göre hassasiyet ve spesifiklik gibi üstün özellikleri mevcuttur. Ayrıca bakteri izolasyon tekniklerinde olduğu gibi zaman problemi de yoktur (Butendieck vd., 1995).

1.4.6. Kontrol

1.4.6.1. Yönetme

BBH için kontrol önlemleri bir dizi yaklaşım içerir. Yetiştiricilik ve yönetim tekniği ile ilgili çeşitli unsurların *R. salmoninarum* enfeksiyonu ve hastalık gelişimini engelleyici faktörler olabileceği ortaya konmuştur. BBH patogenezinde risk teşkil eden su sıcaklığı ve su kimyası gibi çevresel parametreler, patojenin virülansını ve çevresel stresi azaltmak için balıkların yararına manipüle edilebilir. Daha önce bahsedildiği üzere özellikle iz mineraller ve vitaminler bileşenlerini içeren besin öğeleri de BBH kontrolünde araç olarak kullanılabilir ve salmonidlerin BBH'na duyarlılığını azaltabilir. Aynı şekilde BBH'na karşı genel konakçı duyarlılığını azaltmak için stokların genetik manipülasyonu da gerçekleştirilebilir.

Daha spesifik olarak, *R. salmoninarum*'un balıktan balığa geçişinin engellenmesi de BBH kontrolünde önemli bir araçtır. Geçmişte, *R. salmoninarum* ile enfekte olmuş salmonid dokusu içeren yemlerin pastörizasyonu ile yatay bulaşma başarılı bir şekilde azaltılmıştır (Fryer ve Sanders, 1981). Canlı balıklar arasındaki yatay bulaşma, yetiştiricilik tesisindeki sularda bulunan organik kalıntı seviyesini en aza indirgemek maksadıyla (Austin ve Rayment, 1985), kuluçkahanalerde ozonlama veya klor bazlı dezenfektanların kullanılmasıyla da azaltılabilir (Austin, 1983; Pascho vd., 1995).

Yetiştiricilik tekniği ile ilgili modifikasyonların BBH kontrolünde dikey bulaşmayı azaltma konusunda da etkili bir araç olduğu gösterilmiştir. *R. salmoninarum* antijen prevalansına göre anaç bireylerin seçilmesi sonucunda, sonraki kuşaklarda antijen

prevalansının ve BBH kaynaklı mortalitenin ciddi ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Pascho vd., 1991; Elliott vd., 1995). Benzer şekilde Aedo ve Bustos (1991), *R. salmoninarum* ihtiva etmeyen yumurta almak için anaçların ayrılması ve aseptik yumurta eldesi tekniklerini tarif etmiştir. Bununla beraber yumurtlamada yaygın olarak kullanılan dezenfeksiyon teknikleri ne var ki dikey bulaşmanın kontrolünde uygun bir yöntem olarak görülmemektedir (Evelyn vd., 1984).

1.4.6.2. İlaçla mücadele

İmmunoprofilaksi, hastalık kaynaklı ölümleri azaltarak genellikle olumlu bir etki meydana getirir. Bu kanı aynı zamanda aşılama işlemi için de geçerlidir. Bununla birlikte, balık çiftliklerinde hastalık salgınları ile karşılaşıldığında antibiyotik ve diğer kimyasal ilaçlar kullanıldığı için BBH, bağışıklık sisteminin bu ilaçlar tarafından uyarılmasıyla da önlenebilir. Akuakültürde kullanılan antibiyotikler hem çevreye hem de insan ve hayvan sağlığına tehdit oluşturan patojenik ve patojenik olmayan mikroorganizmalarda direnç oluşturur (Sørum, 1998). Sonuç olarak, uzun süreli antibiyotik kullanımı, balık yetiştiriciliği gibi ticari bir biyo-üretimde kabul edilemez.

BBH kontrolü veya tedavisinde antibiyotik kullanımı, diğer tüm kontrol önlemlerinden daha başarılı olmuştur. 1950'lerin başında, yeme ilave edilen sülfonamid antibiyotikler BBH kontrolünde başarılı olmuş, ancak *R. salmoninarum*'un salmonid popülasyonundan uzun süreli olarak uzaklaştırılması, bu bakteriyostatikler ile sağlanamamıştır (Elliot vd., 1989). Wolf ve Dunbar (1959), on farklı antibiyotiğin BBH tedavisinde etkinliğini incelemiş ve en tatmin edici terapötik rejimin, 21 gün boyunca 100 mg/kg/gün eritromisin uygulaması olduğunu bildirmiştir. Austin (1985) de benzer şekilde BBH'na karşı etkinlik açısından 70'in üzerinde antibiyotiği değerlendirmiş ve klinik BBH'nın erken aşamalarında etkili olan birkaç (klindamisin, kitasamisin, penisilin G, spiramisin ve eritromisin) antibiyotik tespit etmiştir. Bunlara ek olarak sefradin, linkomisin ve rifampisinin de etkili ajanlar olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda daha önce 21 günlük rejim önerilen çalışmaya kıyasla 10 günlük bir eritromisin uygulamasının yeterli olacağı ortaya konmuş ve direnç geliştirebilecek bir mikrofloranın

engellenmesi amacıyla antibiyotiklerin mümkün olduğunca çevreye az salınması gerektiği belirtilmiştir. Daha yakın zamanda ise enrofloksasinin BBH'na karşı etkili bir kemoterapötik olduğu gösterilmiştir (Hsu vd., 1994). Genel olarak BBH kontrolünde tercih edilen antibiyotik eritromisindir.

Eritromisin kemoterapisi bazı önemli hususlar teşkil etmektedir (Wolf ve Dumber 1959). Uygulama yolu önemli bir etkendir. Yeme ilave edilerek uygulanan eritromisinin etkinliği yem lezzetinin değişkenlik göstermesi nedeniyle tartışmalıdır (Moffitt, 1992). Banyo yöntemi ile tedaviye ilişkin sınırlı sayıda çalışma olup, bu uygulama yolu henüz başarılı sonuçlar vermemiştir (Elliott vd., 1989). Bağırsak dışı enjeksiyonun birçok çalışmada etkili olduğu gösterilmiştir. Bu yöntem, hem en yaygın olarak kullanılan hem de en başarılı görülen tekniktir (Elliott vd., 1989; Evelyn vd., 1986b; Armstrong vd., 1989; Lee ve Evelyn, 1994; Brown vd., 1990).

Eritromisin uygulaması sırasında salmonidin yaşı, tedavi etkinliği için çok önemlidir. Salmonid yumurtaların suda sertleşmeden önce eritromisin ile muamele edilmesinin*R. salmoninarum*'un uzaklaştırılmasında etkisiz olduğu gösterilmiştir (Evelyn vd., 1986a; Bruno ve Munro, 1986). Ancak üreme öncesi anaçlara bağırsak dışı enjeksiyon yolu ile eritromisin uygulamasının *R. salmoninarum*'un dikey bulaşmasını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Evelyn vd., 1986b; Armstrong vd., 1989; Brown vd., 1990; Lee ve Evelyn, 1994).Bu hususta tedavi zamanlaması da önemlidir; yumurtlamadan önceki 34. ile 56. gün arasında verilen son bağırsak dışı enjeksiyon en etkili olanıdır (Evelyn vd.,1986b).

Elbette BBH kontrolünde eritromisin başta olmak üzere antibiyotik veya kemoterapi kullanımının dezavantajları da vardır. Salmonidlerde, eritromisin kullanımı ile renal tübüler lezyonlar ve lizozomal konjestif aşırı yüklenme de dahil olmak üzere iyatrojenik lezyonlar oluşma potansiyeli vardır.Terapötik eritromisin seviyelerinin neden olduğu bu histolojik değişikliklerin şimdiye kadar büyük ölçüde geri dönüştürülebilir olduğu gösterilmiştir (Hicks ve Geraci, 1984).Balık yetiştiriciliğinde bazı kemoterapötik maddelerinonaylanmamış olması da kısıtlayıcı bir etkendir (Moffitt, 1991). Bununla birlikte, antibiyotik direncinin gelişmesi de su ürünlerinde antibiyotik kullanımı ile ilgili endişe oluşturmaktadır. Bell vd. (1988) halihazırda

eritromisine dirençli bir *R. salmoninarum* suşu geliştiğini bildirmişlerdir ki, bu günümüzde BBH kontrolünde sınırlı alternatif yöntemler olduğundan çok önemli bir bulgudur.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Aşı ile ilgili olarak yapılan çalışmalar mevcut olup DNA aşısı ve üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda en güncel araştırma konuları içerisinde yer almaktadır. Bu bağlamda balık yetiştiriciliğinde kullanılabilecek potansiyele sahip aşılar ve yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Liu vd.(2019) yaptıkları çalışmada, Japon pisi balığı (*Paralichthys olivaceus*) için *S. iniae*'ye karşı etkili aşılar geliştirmek amacıyla, streptolisin S ile ilişkili gen kümesine ait sagH genine dayanan bir DNA aşısı geliştirmişlerdir. *Streptococcus iniae*'i, doğal ve kültür balıkları türlerinde hastalık salgınlarıyla ilişkili olan önemli bir su ürünleri patojeni olarak belirtmişlerdir. Streptolisin S, *S. iniae*'nin önemli bir virülans faktörü olarak tanımlanmıştır. PSagH ile aşılanmış balıklarda, dokularda sagH'nin transkripsiyonunu ve pSagH ile aşılanmış balıkların kaslarında immünohistokimya ile SagH proteini de tespit etmişlerdir. SagH'nin bağışıklık koruyucu etkisi, birinci ve ikinci ayda pSagH ile aşılanan balıkların, *S. iniae* serotip I'e karşı sırasıyla %92.62 ve %90.58 oranında yüksek bir nispi hayatta kalma (RPS) sergilediğini göstermişlerdir. Ek olarak, SagH, *S. iniae* serotip II'ye karşı güçlü bir çapraz koruma sağlamış ve birinci ve ikinci ayda sırasıyla %83.01 ve %80.65'lik bir RPS ile sonuçlanmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, pSagH ile aşılanan balıkların, çok daha güçlü solunum patlama aktivitesi ve daha spesifik antikor titresi oluşturabildiğini bulmuşlardır. Kantitatif gerçek zamanlı PCR sonuçları ile, pSagH'nin, hem doğal hem de adaptif immün yanıtlarda yer alan birçok immün genin ekspresyonunu düzenlediğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar ile birlikte, pSagH'nin, Japon pisi balığı yetiştiriciliğinde *S. iniae* serotip I ve II enfeksiyonuna karşı aday bir DNA aşısı adayı olduğunu belirtmişlerdir.

Lim vd. (2019) araştırmalarında, VHSV'nin G protein bazlı DNA aşısına bir miR-155 eksprese edici kaset yerleştirmişler ve miR-155'in antiviral aktivitesini ve pisi balığı üzerindeki aşı etkinliği üzerindeki etkilerini analiz etmişlerdir. Rhabdoviral G protein bazlı DNA aşıları, kültür balıklarını rabdoviral hastalıklardan korumanın yararlı bir yolu olarak kabul edilmiştir.Kore'de, viral hemorajik septisemi virüsü (VHSV) IVa genotipi, pisi balığı yetiştiriciliğinde (*Paralichthys olivaceus*) görülen

ölümlerin başlıca sebebi olarak belirtilmiştir. Pisi balığı yavrularını intramüsküler (i.m.), 10 ug / balık (1. deneme) veya 1 ug / balık (2. deneme) DNA aşı plazmitleri ile immünize etmişlerdir. Bununla birlikte, ölüm oranları ve serum nötralizasyon titrelerinde, 1µg ve 10µg plazmit / balıklarla aşılanmış balıklar arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır; 1µg plazmit / balıkla enjeksiyonun, pisi balığı yavrularında etkin adaptif immün yanıtları uyarmak için yeterli olacağını belirtmişlerdir. Hayatta kalma oranlarında, sadece G proteini eksprese eden plazmidler ile immünize edilmiş balıklar ya hiç ölmediklerinden veya çok düşük ölüm oranı gösterdikleri için, miR-155'in adjuvan etkisinin görülmediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, serum nötralizasyon aktivitelerinde, G geni ya da G geni ile beraber DNA aşılarını eksprese eden miR-155, kontrol aşılarından (PBS ve boş vektör) daha yüksek aktivitelere neden olsa da, sadece G geni ile G geni ve miR- arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Serum virüsidal aktivitesinde, G geni ile miR-155 eksprese eden DNA aşısıyla immünize edilmiş balık, immünizasyondan 3 gün sonra (dpi) hirame rabdovirüsüne (HIRRV) karşı, diğer gruplara kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek aktivite göstermiştir ve bunun vektörden üretilen miR-155'in pisi balığında doğal immün tepkilerini artırabileceğini ortaya koymuşlardır. Özellikle 28d.p.i.'de VHSV'ye karşı belirgin şekilde artmış serum virüsidal aktiviteleri yalnız G geni ve G geni ile DNA aşılarını eksprese eden miR-155 ile immünize edilmiş gruplarda, klasik komplemen yolunu ve ardından viral inaktivasyonu aktive edebilen G proteinine karşı artan antikorları göstermişlerdir. Pisi balığında DNA aşıları hakkında mevcut bilgi yeterli olmadığı için, DNA aşılarının, bu balığın kültürü yapılan çiftliklerinde daha pratik kullanımını sağlamak için DNA aşılarının koruyucu etkinliği konusunda daha çeşitli araştırmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır.

Embregets vd.(2019) yaptıkları araştırmada, öncelikle yakın zamanda, SVCV glikoproteini (SVCV-G) kodlayan bir DNA plazmidinin intramüsküler enjeksiyonuna dayanarak sazan için başarılı bir aşı olduğunu bildirmişlerdir. Bunun, kas içi (i.m.) aşılama yolunun SVCV'ye karşı koruyucu tepkileri tetiklemek için uygun olduğunu ve SVCV G-proteininin uygun bir aşı antijeni olduğunu göstermişlerdir. Ancak, DNA aşılarının genel başarısına rağmen, özellikle balık rabdovirüslerine karşı, pratik uygulamaları hala tüketicilerin kabul kaygıları kadar yasalar ile de sınırlandırıldığını belirtmişlerdir. Ayrıca, plazmid uygulamasının

intramüsküler yolu, büyük ölçüde intraperitoneal veya daldırma aşılamalarına dayanan mevcut aşılama rejimlerinin çoğu ile kolayca kombine edilemeyeceğini açıklamışlardır. Bu nedenle, bu çalışmada aşı antijeni olarak SVCV-G proteinini kullanarak DNA tabanlı bir intramüsküler enjekte edilebilir aşıya alternatifleri değerlendirmişlerdir. Bu amaçla, iki paralel yaklaşımı test etmişlerdir: ilki, DNA ve protein antijenlerinin oral yoldan verilmesi için bir aljinat kapsülleme yönteminin optimizasyonuna; ikincisi ise, böcek hücrelerinde transmembran SVCV-G proteininin bakulovirüs rekombinant ekspresyonuna dayanmaktadır, oral ve enjeksiyon yoluyla tam hücre altı ünite aşısı olarak uygulamışlardır. Ek olarak, oral DNA aşısı durumunda, mukoza adjuvanları *E. coli* lenfotoksin alt birimi B'nin (LTB) potansiyel faydalarını da araştırmışlardır. Çeşitli aşı tipleri, dozları, rejimleri ve uygulama yollarının kullanılmasına rağmen, referans intramüsküler DNA aşılarıyla elde edilen tam korumanın aksine, hiçbir koruma gözleyememişlerdir. Bu çalışmada kullanılan ve çeşitli koşullar altında gözlemlenen sınırlı koruma, konağın doğası, patojenin yapısı, aşı türü ve kapsülleme yönteminin, SVCV'ye karşı gelecekteki aşılama stratejilerinde bir tahmin sağlamak için detaylı olarak tartışılacağını belirtmişlerdir.

Sepulveda vd. (2019) çalışmalarında, DNA aşılarını sırasıyla gökkuşağı alabalığı ve CMV promotöründen interferon ile indüklenebilir Mx promotörü ile karşılaştırmışlardır. Çiftlik balıklarında balık rabdovirüslerinin neden olduğu hastalıklara karşı oldukça etkili DNA aşıları, bir kurucu sitomegalovirüs promotörünün (CMV) kontrolü altında viral glikoproteini kodlayan bir DNA plazmit vektöründen oluştuğunu belirtmişlerdir. Diğerlerinin yanı sıra, bu DNA aşılarının etkinliğini ve güvenliğini arttırma girişimlerinin, aşı antijenlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrolünde önemli bir rol oynayan plazmid vektörlerinin düzenleyici elemanlarına odaklandığını söylemişlerdir. Şartlara bağlı olarak, memeli hücrelerinde minimal aktiviteye sahip balıktan türetilmiş bir promotörün kullanılmasının tercih edilebileceğini ortaya koymuşlardır. CMV promoteri ile ilgili diğer bir husus, aşı antijeninin temel ifadesinin, balıktaki antijen eksprese eden hücrelerin hızlı bir şekilde yok edilmesine yol açabileceği ve böylece aşının uzun vadeli etkilerini potansiyel olarak azaltabileceğidir. Bu çalışmada, geliştirilmiş yeşil flüoresan proteinini (EGFP) kodlayan plazmid yapıları, in vitro analiz için kullanılırken, viral

hemorajik septisemi virüsünün (VHSV) glikoproteini (G) kodlayan DNA aşıları, in vivo inceleme için uygulanmıştır. İn vitro analiz, CMV promotörlü DNA aşısının hem balıklarda hem de insan hücre hatlarında EGFP ekspresyonunu yapısal olarak sürdüğünü gösterirken, Mx promotörlü DNA aşısının balık hücre hattında EGFP ekspresyonunu indüktif olarak arttırdığını göstermiştir. Koruma üzerindeki etkiyi araştırmak için Kurath ve diğ. (2006), aşılanan balıklara 2 ve 8 hafta sonra (wpv) VHSV enjekte etmişlerdir. CMV promotörlü DNA aşısı her zaman koruma sağlarken, Mx promotörünü içeren DNA aşısıyla aşılama işleminde, aşılamadan sadece 8 hafta sonra balıkları korumuştur. Bununla birlikte, patojen enjekte edilmeden bir hafta önce Poly (I:C) ile indüksiyonun ardından aşılamadan 2 hafta sonra da yüksek koruma olduğu ispatlanmıştır. Sonuç olarak, geleneksel olarak kullanılan çapraz tür-aktif CMV promotörüne kıyasla alabalık Mx promotörünün daha fazla balık koruma bağımlı aktivitesini ortaya çıkarmışlardır, ancak DNA aşıları ile uzun vadeli korumayı sağlamak için birçok iyileştirmelere ihtiyaç olacağını belirtmişlerdir.

Han vd.(2019), daha önceki çalışmalarında rekombinant mayanın *Carassius auratus*'ta spesifik immün yanıtları indükleyebileceğini ve akuakültürde oral DNA aşıları için potansiyel bir taşıyıcı görevi görebileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmalarında, hareketli aeromonad septisemisinden (MAS) koruma sağlaması beklenen, *Aeromonas hydrophila* bakterilerine karşı etkili bir maya bazlı oral DNA aşısı geliştirmişlerdir. İlk önce, iki aday antijen geni, ompG ve omp48, *Aeromonas hydrophila* genom DNA'sından klonlamışlardır. Daha sonra, nispi maya-ökaryot karşılıklı vektörleri oluşturmuşlar ve ökaryotlardaki ekspresyonları doğrulamışlardır. Daha sonra israil sazanlarına, ompG veya omp48 rekombinant maya oral yoldan uygulanmış ve bağırsak mukozasındaki genlerin ekspresyonu, immünohistokimya (IHC) ile doğrulamışlardır. Spesifik immün yanıtlarını ayrıca Western blot ve enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) ile tespit etmişlerdir. ELISA sonuçları, OVA-ompG grubunda OVA-spesifik antikor üretiminin, OVA-ompG grubunun, OVA-omp48'den belirgin şekilde daha güçlü bir immün tepkisi ortaya çıkardığını göstermiş, OVA-ompG grubu, açıkça OVA-omp48'den daha güçlü bir immün yanıt ortaya çıkarmıştır. Son olarak, *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonuna karşı yapılan challenge testinde, OVA-ompG maya aşısının ağızdan uygulanmasından sonra balık

ölüm oranlarında azalma olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, çalışmaları ile oral maya bazlı kültür balıkçılığı aşılarının daha da geliştirilmesi için bir çerçeve sağlamışlardır.

Embregts vd.(2019) çalışmalarında, daha az enjeksiyon gerektiren ORF25 bazlı bir DNA aşılama protokolünü optimize etmeye ve enfeksiyonun doğal yoluna daha çok benzeyen bir türüne karşı koruma sağlamayı amaçlamışlardır. Koi Herpes Virüsünün (KHV veya Cyprinid Herpesvirus 3, CyHV-3), yaygın olan sazan üretimini ve ayrıca çok değerli süs koi balığını etkileyen en tehdit edici patojenlerden biri olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bugüne kadar dünya çapında kullanım için etkili bir ticari aşının mevcut olmadığını vurgulamışlardır. Önceki bir çalışmada, ORF25 bazlı bir DNA aşısı ile üç intramüsküler enjeksiyonun, nötrleştirici antikorların üretilmesine yol açtığını ve KHV ile intraperitoneal bağışıklığa karşı önemli bir koruma sağladığını bildirmişlerdir. Bu amaçla çalışmalarında, ORF25 pcDNA3'te çözünür bir protein veya tam uzunlukta bir transmembran GFP-füzyon proteini olarak klonlamışlardır. ORF25 bazlı DNA aşılarını farklı dozlarda, farklı aşılama yollarıyla (örneğin kas içi enjeksiyon ve oral gavaj) ve challenge yöntemlerini (banyo ve birlikte yaşama) kullanarak çoklu aşılama denemelerinde test etmişlerdir. Ayrıca, intramüsküler enjekte edilen DNA aşısına lokal ve sistemik cevapları histolojik ve RT-qPCR ile analiz etmişlerdir. Balığa, iki DNA aşısından herhangi birinden üç enjeksiyon yaptıklarında güçlü bir koruma gözlemlenmiştir. Bununla birlikte bu koruma, her iki challenge testinden sonra da gözlemlenmiştir. Ayrıca, balığa sadece bir enjeksiyon yapıldığında veya plazmidin oral yolla alınması durumunda koruma yetersiz kalmıştır. Enfeksiyonun doğal yolunu en iyi yansıtan challenge modelini ve KHV'ye karşı gelecekteki DNA aşılama stratejilerine ilave antijenleri dahil etme olasılığının da tartışılacağını vurgulamışlardır.

Yu vd.(2019), Singapur orfoz iridovirüs (SGIV) ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. SGIV'nin, güney Çin'deki ciddi ekonomik kayıplara neden olan ana virus olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, bu viral hastalığı kontrol etmenin etkili bir yolunun olmadığını açıklamışlardır. Bu çalışmada, viral membran proteinini kodlayan SGIV ORF19R (SGIV-19R), pcDNA3.1-HA içine inşa edilmiş ve daha sonra orfoz *Epinephelus coioides*'teki immün koruyucu etkileri değerlendirmek için

kullanılmıştır. Hücre altı lokalizasyon, sitoplazmada dağıtılan SGIV-19R'nin ve ortak lokalizasyon analizinin, endoplazmik retikulum (ER) ile kısmen lokalize olmuş proteini gösterdiğini ortaya koymuşlardır. RT-PCR ve Western blot analizleri ile aşı plazmitlerinin orfoz kas dokularındaki ekspresyonunu doğrulanmıştır. Ayrıca, tümör nekroz faktörü alfa (TNF-a), interlökin-1 beta (IL-1), miksovirüs direnci 1 (Mx1) ve immünoglobulin M (IgM) genlerinin transkripsiyon seviyeleri aşılanmış grupların dalak, karaciğer ve böbreklerinde belirgin şekilde yukarı doğru ivme göstermiştir. SGIV challenge testleri, yüzde hayatta kalma oranının (RPS) balıklarda, 45μg pcDNA3.1-19R DNA dozunda %49.9, 90μg pcDNA3.1-19R kullanırken %75.0 RPS olduğunu göstermiştir. Bu arada, pcDNA3.1-19R ile aşılama, SGIV challenge testinden sonra hayatta kalan orfozların dalağındaki düşük bir viral yük ile kanıtlanan virüs replikasyonunu önemli ölçüde azalttığını tespit etmişleridir. Bu sonuçlar ile birlikte, pcDNA3.1-19R'nin, orfozlarda koruyucu bağışıklığı uyarabileceğini ve SGIV hastalığını kontrol etmek için potansiyel bir aşı adayı olabileceğini göstermişlerdir.

Citarasu vd.(2019) çalışmalarında, *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus (MrNV), Dev Tatlı Su Karidesi'nde beyaz kuyruk hastalığına (WTD) neden olabileceğini ve bunun kuluçkahaneler ile çiftliklerde büyük ekonomik kayıplara yol açtığını vurgulamışlardır. Bu çalışmada, MrNV-CP-RNA-2'nin (1146 bp) kapsid protein genini, MrNV-CP-RNA-2-pVAX1'i oluşturmak için bir pSAX1 DNA aşı vektörüne klonlamışlardır. MrNV-CP genini içeren bakteriyel transformant, balıkların pellet yemleri üzerine kaplanmış ve 40 gün boyunca juvenil M. rosenbergii'ye verilmiştir. Aşı verilmesinden sonra, *M. rosenbergii* grubunu, sırasıyla aşılamadan 20 ve 40 gün sonra virülent MrNV ile enfekte etmişler ve hayatta kalma sürelerini izlemişlerdir. Aşılanmamış *M. rosenbergii*, 5 gün içerisinde tamamen ölürken (%100), MrNV-CP-RNA-2- pVAX1 ile tedavi edilen gruplar, sırasıyla 20 ve 40 dpv' de %60 ve %80'lik bir hayatta kalma oranına sahip oldukları gözlemlenmiştir ($P \leq 0.001$). MrNV enfeksiyonu seviyesini incelemek için, farklı dpv'de çift aşamalı PCR yapmışlardır. Sonuçlar 20 dpv grubunda enfeksiyonun %65'e düştüğünü ve 40 dpv grubunda ise kontrol diyetiyle beslenen karideslerden enfeksiyonun%69'a düştüğünü ortaya koymuştur ($P < 0.001$). Kontrol ve aşılanmış karidesler için pıhtılaşma zamanı, toplam hemosit sayımı (THC) ve oksihemosiyanin seviyeleri gibi hematolojik

parametreleri incelemişlerdir. Aşılama, pıhtılaşma süresinin azalmasına, THC ve oksihemosiyanin seviyelerinin aşılanmamış gruba kıyasla anlamlı düzeyde ($p<0.001$) artmasına yardımcı olmuştur. Profenol oksidaz (ProPO), süperoksit anyon ve intra-agar lizozim aktivitesi gibi immünolojik parametreleri de uygulamışlar ve sonuçları aşılanmamış gruplarla karşılaştırdıklarında sırasıyla proPO, süperoksit anyon ve lizozim aktivitelerinin 20 ve 40 dpv gruplarında anlamlı şekilde arttığını ($P\leq0.05$) ortaya koymuşlardır. Aşılama denemelerine dayanarak, DNA aşısının MrNV-CP-RNA-2-pVAX1'i MrNV tehdidine karşı sağkalımı etkili bir şekilde arttırmış olduğunu, viral yükü azaltmaya ve karidesleri MrNV enfeksiyonundan korumak için bağışıklık sistemini güçlendirmeye yardımcı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu aşı yapısının, *M. rosenbergii*'yi MrNV enfeksiyonundan korumak için oldukça faydalı olduğunu belirlemişlerdir.

Chen vd. (2018) çalışmalarında, ot sazanı reovirus II'nin (GCRV II), ot sazanı *Cyenopharyngodon idellus*'ta yüksek mortalite ile ciddi hemorajik hastalığa neden olduğunu belirtmişler ve DNA aşılamasının balık virüslerine karşı koruma sağlamada çok etkili bir yöntem olduğu ortaya koymuşlardır. Chen vd. (2018)yaptıkları çalışmada, ot sazanını GCRV II'nin 6 (pC-S6; kodlayan VP4) ya da 10 (pC-S10; NS38'i kodlayan NSC) bölümünden oluşan bir DNA aşısı ile aşılamışlardır ve bu iki aşı tarafından uyarılan bağışıklık tepkilerini karşılaştırmalı olarak analiz etmişlerdir. pC-S6 ve pC-S10'un nispi yüzde hayatta kalma (RPS) açısından koruyucu etkinliği sırasıyla% 59.9 ve% 23.1 olarak bulunmuştur. Bununla, pC-S6 ve pC-S10 DNA aşılarının, bağışıklık koruyucu etkideki değişikliklerle de olsa, ot sazanının GCRV'ye karşı hayatta kalma oranını arttırabileceğini göstermişlerdir. İmmünolojik analizler göstermiştir ki; ilk olarak, hem aşılama sonrası (pv), hem pC-S6 hem de pC-S10, interferon (IFN-1), Mx1, IL-1 ve TNF-α ekspresyonunu artırmıştır. Bununla birlikte, CD4 ve CD8α, pC-S6 da artmış, fakat pC-S10 da artmamıştır. İkinci olarak, aşılanmamış ve pC-S10 aşılanmış balıkları karşılaştırmışlar, CD4, CD8α ve GATA3 gibi T hücresi tepkisi ile ilgili genlerin, yükleme sonrası (pc) 48 saat geçtiğinde pC-S6 ile aşılanmış balıklarda yükseldiğini belirlemişlerdir. Üçüncü olarak, pC-S6 ve pC-S10, spesifik antikor tepkisi pv'nin benzer modellerini indüklemiştir. Bununla birlikte, sadece GCRV ile enfekte olmuş hayatta kalan balıkların serumlarındaki anti-VP4 IgM'nin, bu ön denemeye kıyasla, PC'yi önemli ölçüde arttırdığını ortaya

koymuşlardır. Birlikte ele alındığında bu sonuçların, pC-S6'nın hem doğal (IFN-1 ve Mx1 indüksiyon) hem de adaptif (T hücresi ve spesifik antikor yanıtı) immünite pv'yi desteklediğini göstermişler ve bir hafıza durumunun uyarılmasının, pC-S10 sadece tip I IFN ile ilişkili cevap pv'yi ve düşük enflamatuar yanıt pc'sini uyarırken virüsle daha sonra karşılaşıldığında bağışıklık yanıtını derhal başlattığını göstermişlerdir.

Wang vd.(2017) yaptıkları çalışmanın temel amacı, *Vibrio harveyi* ZJ0603'ün glutatyon peroksidaz (GPx) DNA aşısını oluşturmak ve *V. harveyi* ile muamele edilmiş turuncu benekli orfoz (*Epinephelus coioides*) üzerinde aşı adayı olarak bağışıklık koruyucu etkinliğini araştırmaktı. ZJ0603 GPx geninin klonlanması üzerine dayanan, pcDNA-GPx olarak adlandırılan bir DNA aşısı, GPx genini pcDNA3.1 (+) plazmidine eklemek suretiyle yapılmıştır. Turuncu benekli orfozlara, intramüsküler olarak enjeksiyonla pcDNA-GPx plazmidi ile bağışıklık kazandırmışlardır. Patojenik *V. harveyi* enfeksiyonuna karşı DNA aşısıyla aşıladıkları balıkların hayatta kalma yüzdesi (RPS) %77,5'tir. DNA aşısının ifadesi turuncu benekli orfoz dokularında PCR ve RT-PCR ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, pcDNA-GPx'in aşılamadan 7 ve 28 gün sonra ön böbreğinde, karaciğerde, dalakta, solungaçta ve enjekte edilen kasta dağıldığını ve eksprese edildiğini göstermiştir. Aşılanmış turuncu benekli orfozlarda dolaylı ELISA yöntemi ile önemli spesifik antikor yanıtlarını da tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, DNA aşısı pcDNA-GPx'in, V. harveyi ile tedavi edilen turuncu benekli orfozlarda karşı etkili bir bağışıklık koruması gösterdiğini tespit etmişleridir. GPx'in, vibriozisin kontrolü için bir DNA aşısı olmaya aday olduğunu vurgulamışlardır.

Xu vd.(2019) çalışmalarında Dış membran proteini K (OmpK), *Vibrio anguillarum* için alt birim aşı adayı olarak işlev görebilecek immünojenik bir protein olduğunu belirtmişler ve *V. anguillarum*'un OmpK genini kodlayan bir DNA aşısı yapmış ve OmpK'yı in vitro ve in vivo olarak eksprese etmek için doğrulamışlardır. Aşı adayı olarak pcDNA3.1-OmpK (pOmpK) potansiyelini değerlendirmek için humoral ve hücresel immün yanıtlar ve koruyucu etkiler pisi balığı modelinde analiz edilmiştir. Sonuçlarda, OmpK geninin transkripsiyonunun ve translasyonunun, hem transfekte edilmiş hirame doğal embriyo (HINAE) hücrelerinde hem de enjekte edilmiş balık kaslarında meydana geldiğini göstermiş ve bu da pOmpK'nın OmpK'yı eksprese

etme işlevselliğini göstermişlerdir. POmpK ile bağışıklık kazandırılan balık, yüzey IgM pozitif (sIgM +), CD4-1 +, CD4-2 + lenfositlerinde önemli bir artış ve spesifik anti-*V.anguillarum* veya anti-rOmpK antikorlarının üretimini göstermiş, bu da aşılamadan sonra humoral ve hücresel bağışıklık tepkilerinin aktivasyonunu göstermiştir. Ayrıca, pOmpK ile aşılanmış pisi balığı için *V. anguillarum* enfeksiyonuna karşı %50.00 nispi hayatta kalma oranı (RPS) elde etmişlerdir. Sonuç olarak, bu çalışmalarında, pOmpK'nın humoral ve hücresel immün tepkileri uyarabileceğini ve bir DNA aşı adayı olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Liu vd.(2016) yaptıkları araştırmada, su ürünleri endüstrisindeki hastalıkların neden olduğu ekonomik kayıpları azaltmak için, daha etkin ve ekonomik profilaktik önlemler acilen araştırılmasını vurgulamışlar ve *Aeromonas hydrophila*'ya karşı yavru ot sazanındaki DNA aşısı uygulaması için bir dağıtım aracı olarak uygulanan yeni bir fonksiyonelleştirilmiş tek duvarlı karbon nanotüplerin (SWCNT) etkilerini incelemişlerdir. Sonuçlarında, DNA aşısı yüklü SWCNT'lerin, yavru ot sazanlarında *A. hydrophila*'ya karşı daha iyi bir koruma sağladığını göstermişlerdir. Ayrıca, DNA aşısı ile konjuge edilmiş SWCNT'ler, serbest DNA aşısına kıyasla önemli ölçüde koruyucu bağışıklık sağlamıştır. Dolayısıyla, SWCNT'lerin, immünolojik aktiviteyi arttırmak için potansiyel bir verimli DNA aşı taşıyıcısı olarak düşünülebileceğini ortaya koymuşlardır.

Rondon-Barragan vd.(2017) yaptıkları çalışmada, DNA aşılamasının, çiftlik balıklarını viral ve bakteriyel hastalıklardan korumak için etkili bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. DNA aşıları tarafından kodlanan kimerik antijenlerin, viral hastalıklara karşı direnci arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmalarında, Japon pisi balığında (*Paralichthys olivaceus*), (JfLAMP-1) 'den lizozom ile ilişkili membran proteini-1'i kodlayan geni sıralamışlar ve bunun kırmızı deniz çipura iridovirüsünden (RSIV) ana kapsül proteini (MCP) ile kaynaşan kimerik bir DNA aşısında kullanımını değerlendirmişlerdir. JfLAMP-1 cDNA, transmembran ve sitoplazmik alanlar içeren, 415 aa kodlayan 1248 bp'lik bir uzunluğa sahiptir. JfLAMP-1, çeşitli dokularda yapısal olarak ifade edilmiş ve dalakta ekspresyonu, Edwardsiella tarda'nın formalinle öldürülmüş hücrelerinin (FKC) enjeksiyonunu takiben yukarı doğru düzenlenmiştir. İmmünofloresan analiziyle, JfLAMP-1'in sitoplazmada küçük ve

büyük granüllerde ve çekirdeğe yakın gruplarda dağıldığını göstermişlerdir. JfLAMP-1'in luminal bölgesini kodlayan DNA, RSIV MCP için gen ile değiştirilmiş ve yapı, bir ekspresyon vektörüne (pCIneo) klonlanmıştır. PCLAMP-MCP ile aşılanan balık, aşılamadan sonraki 30. günde MCP genini barındıran pCIneo vektörü ile aşılanan balıktan anlamlı olarak daha yüksek antikor seviyelerine sahip olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Liu vd.(2016) yaptıkları çalışmada, *Edwardsiella tarda*'nın kültür balıklarında edwardsiellozis hastalığının sebebi olduğunu, bunun da yetiştiricilikte ağır kayıplara neden olduğunu ve şimdiye kadar *E. tarda*'ya karşı farklı aşı türlerinin denendiğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında, optimize edilmiş bir ökaryotik ekspresyon plazmidi geliştirmişler ve bir bisistronik ekspresyon sistemi kullanılarak antijenik ve adjuvan peptidi birlikte kodlayan optimize edilmiş bir DNA aşısı tasarlamışlardır. Sonuç olarak, insan T-hücresi lösemi virüsü tip 1 (CMV / R) 'den uzun terminal tekrarlı R bölgesi ile bağlanmış bir modifiye edilmiş plazmid barındıran sitomegalovirüs (CMV) promotörü ve woodchuck hepatit virüsü transkripsiyon sonrası cevap elemanı (WPRE) bileşeni, modifiye edilmemiş plazmit ile karşılaştırıldığında, artan bir antijenik gen ekspresyonu göstermiş olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, bisistronik sisteme dayanarak tasarlanmış sistem, antijenik geni ifade etme konusunda daha güçlü bir yetenek sergilemiş ve RPS, antijenik geni kodlayan plazmid ile karşılaştırıldığında %87.3 başarı sağlamıştır. Son olarak, immünolojik analizlerde DNA aşısının hem doğal hem de adaptif immün yanıtları indüklediğini göstermişlerdir. Bu sonuçların, antijenik ve adjuvan proteinlerin birlikte kodlanmasının, gelecekte kültür balıkçılığında DNA aşıları geliştirmek için etkili bir strateji olabileceğini düşündürdüğünü vurgulamışlardır.

Zhang vd. (2012) çalışmalarında iridovirüslerin, ikosahedral kapsid ile birlikte çift iplikli büyük DNA virüsleriolduğunu ve Iridoviridae familyasının, biri Megalocytivirüs olmak üzere beş cins içerdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Megalocytivirüs'ün, son yıllarda çok çeşitli deniz ve tatlı su balıkları için önemli bir patojen olarak ortaya çıktığını vurgulamışlar ve Çin'deki çiftlik balıklarını etkileyen Megalocytivirüse karşı etkili genetik aşılar geliştirmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla, Japon pisi balığı (*Paralichthys olivaceus*) ve kalkan (*Scophthalmus maximus*) dahil

olmak üzere geniş konak yelpazesine sahip bir megalocytivirüs olan Çin'den yedi genli rock çipura iridovirüs (RBIV-C1) izolatını temel alan yedi DNA aşısı yapmışlardır. Bu aşıların koruyucu potansiyellerini bir kalkan modelinde incelemişlerdir. Sonuçlar, intramüsküler enjeksiyon yoluyla aşılama sonrasında aşı plazmitlerinin dalak, böbrek, kas ve karaciğerde dağıldığını ve aşı genlerinin transkripsiyonunun ve aşı proteinlerinin üretiminin bu dokularda tespit edildiğini göstermiştir. Ölümcül dozda bir RBIV-C1 ile mücadelenin ardından, yedi DNA aşısından dördü ile aşılanan balıkların, kontrol balıklarına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek hayatta kalma seviyeleri gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bu dört koruyucu DNA aşısından, 86kalıntı viral proteini eksprese eden bir plazmid olan pCN86, en yüksek korumayı indüklemiştir. İmmünolojik analizlerle, pCN86'nın, ön böbrek makrofajlarının solunum patlamasını aşılamadan 14, 21 ve 28. günlerde uyarabildiğini göstermiş, doğuştan gelen ve adaptif immünitede yer alan immün ilgili genlerin ekspresyonunu düzenlediğini ortaya koymuş ve enfeksiyondan önce RBIV-C1 ile inkübe edildiğinde, kalkan balığında böbrek ve dalaktaki viral yükü, virüs enfeksiyonunu takiben önemli ölçüde azalttığı tespit etmişlerdir. Birlikte ele alındığında bu sonuçların, pCN86'nın akvakültürde megalocytivirus ile ilişkili hastalıkların kontrolünde kullanılabilecek etkili bir DNA aşısı olduğunu göstermişlerdir.

Huang vd.(2017) yaptıkları çalışmada, DNA aşılarının hayvanlarda mikrobiyal enfeksiyonlara karşı yaygın şekilde kullanıldığını ve DNA aşılarının immünojenikliğini arttırmak için moleküler adjuvanların kullanımının son yıllarda giderek daha fazla çalışıldığını vurgulamışlardır. MyD88’in, sinyalleme dizilerini harekete geçirmek ve enflamatuar mediatörler üretmek için bağdaştırıcı moleküllerden biri olduğunu ve memelilerde kanıtlanmış immünolojik rolü ve adjuvan potansiyelinin, balık türlerinde nadiren rapor edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmada, plazmid pcMyD88 düzenlenmiş ve MyD88'in moleküler adjuvan olarak kapasitesi, turuncu benekli orfozda Vibrio alginolyticus enfeksiyonuna karşı AcfA'yı kodlayan bir DNA aşısı ile birlikte enjekte edilerek araştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, DNA aşısı pcacfA veya moleküler adjuvan pcMyD88'in enjekte edilen kastan böbrek ve dalaklara nakledilmesi ve daha sonra koruma için konağın bağışıklık sistemini uyarması için en az 7 gün gerekli olduğunu göstermişlerdir.

PcMyD88'in DNA aşısı pcacfA ile birlikte enjeksiyonunun, belirgin spesifik antikor seviyelerini ve MHCIα, MHCIIα, CD4, CD8α, IL-1 ve TNFα dahil bağışıklık ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerini arttırabildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, pcMyD88, pcacfA'nın V. alginolyticus enfeksiyonuna karşı immün korumasını arttırmış, PCMyD88 + pcacfA grubunda, aşılamadan 10 hafta sonra yapılan testlerde sadece pcacfA'ya kıyasla (%73.3) anlamlı şekilde ,%83.3 daha yüksek RPS gözlemlenmiştir. Bununla beraber bu sonuçlarla açıkça MyD88'in turuncu benekli orfozda DNA aşısı pcacfA için etkili bir adjuvan olduğunu göstermişlerdir.

Ma vd.(2017) araştırmalarında, *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*)'nin, dünyadaki tilapia endüstrisindeki artan ekonomik kayıplar nedeniyle son on yılda daha fazla dikkat çeken önemli bir balık patojeni olduğunu bildirmişlerdir. Balıklarda *S. agalactiae*'nin mevcut etkili aşılarının açıkça dezavantajlara sahip olduğunu, bağışıklık koruyucu antijenlerin ve ambalaj malzemelerinin seçilmesinin kuşkusuz yeni oral aşıların geliştirilmesine katkıda bulunacağını belirtmişlerdir. Çalışmalarında, yüzey immünojenik protein (sip), *S. agalactiae* serovar I'den, katyonik kitosan ve geri dönüşümlü ve biyo-uyumlu PLGA ile DNA aşı formunda immünojenik protein olarak bir genom seçmişlerdir. Katyonik-PLGA'daki pcSip plazmidi, immünize edilmiş tilapiyanın dokularında başarıyla eksprese edilmiş ve immünojeniklik, tilapia bağışıklık modelinde değerlendirilmiştir. Dalak ve böbrek dokularında IL-1β, TNF-α, CC1, CC2 sitokin düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, bağışıklık kazandırılmış tilapia, öldürücü derecede yüksek derecede virülan serovar I ve *S. agalactiae* dozu ile mücadeleye karşı farklı koruma seviyeleri sağlamıştır. Elde edilen sonuçlarla, katyonik-PLGA'daki pcSip plazmidinin, yüksek seviyede antikorlar oluşturduğunu ve *S. agalactiae* enfeksiyonuna karşı korumayı uyardığını, etkili oral aşı adayları olabileceğini göstermişlerdir.

Chen vd.(2015) çalışmalarında, orfoz larvalarında kitlesel mortalite nedeni olan sinir nekrozu virüsüne (NNV) karşı bir DNA aşısı pcMGNNV2'nin gelişimini rapor etmişlerdir. Ek olarak, bir Toll-like reseptör 9 agonisti olan CpG oligodeoksinükleotidinin (ODN) DNA aşısı üzerindeki modülatör etkisini değerlendirmişlerdir. Tek başına DNA aşısı, NNV'ye özgü antikorların üretilmesini

sağlamış ve bu, aşının adaptif humoral yanıtı tetikleyebildiğini göstermiştir. Ayrıca aşılamadan sonraki 7. günde dalakta TLR9, Mx ve IL-1β 'in belirgin bir şekilde indüksiyonunu gözlemişler, bunun da aşının TLR9 sinyalini tetikleyebileceğini destekleyeceğini rapor etmişlerdir. CpG ODN'nin yüksek dozda dahil edilmesi, NNV-spesifik antikorların seviyesini önemli ölçüde etkilememiş, ancak 7. günde Mx ve IL-1β ekspresyonunu orta derecede arttırarak doğuştan gelen yanıtı modüle etme kabiliyetini göstermiştir. NNV ile mücadeleden sonra, aşının tek başına aşılamadan sonra hem 1. hem de 2. haftada enfekte larvalarda hayatta kalma oranını arttırdığını ortaya koymuşlardır. CpG ODN'nin kombinasyonu ayrıca 1. haftada hayatta kalma oranını arttırmış ancak 2. haftada arttırmamıştır. İlginç bir şekilde, 2. haftada ODN, T-bet (bir Th1 marker) ve GATA-3'ün (bir Th2 marker) downregülasyonu ile gösterilen bir Th1 benzeri yanıt uyandırmıştır. Bu nedenle sonuçlarda, CpG ODN ile arttırılmış Thl yanıtının, pcMGNNV2 aşısının koruma etkinliğini arttırmadığını göstermişlerdir. En iyi bildikleri şeyin bunun orfozda NNV'ye karşı başarılı bir DNA aşısının ilk raporu olduğunu belirtmişlerdir.

Lazarte vd.(2017) çalışmalarında, DNA aşılarının immünojenikliğini arttırmak için moleküler adjuvanların kullanımı son yıllarda birçok kez incelendiğini ve Glikoprotein (G) bazlı DNA aşılarının, Salmonidlerde Rhabdovirüs'e (özellikle bulaşıcı hematopoetik nekroz virüsü, IHNV) karşı enfeksiyonla mücadelede etkili olduğun kanıtlandığını bildirmişlerdir. DDX41'in, bir tip I IFN doğuştan gelen immün yanıtı uyararak antiviral ve enflamatuar tepkileri tetiklediği bilinen bir helikaz olduğunu vurgulamışlardır. Bu çalışmada ise pisi balığında (*Paralicthys olivaceus*) G bazlı DNA aşıları hakkında daha fazla bilgi edinmek için, moleküler bir adjuvan DDX41 ekleyerek daha verimli bir G bazlı DNA aşısı geliştirmeye çalışmışlardır. VHSV glikoproteininin (G-protein) ve DDX41'in sırasıyla EF-1 α ve CMV promoterleri tarafından uyarıldığı bir DNA aşısı tasarlamışlardır. Pisi balıkları, sadece G-bazlı DNA aşısını (pEF-G), sadece moleküler adjuvanı (pEF-D) veya aşı-adjuvan yapısını (pEF-GD) kodlayan 1 ug plazmit ile intramüsküler olarak immünize etmişlerdir.15. ve 30. günlerde iki farklı zaman noktasında balık, periton içine VHSV (100 µL; 1 x 106 TCID50 / mL) ile enfekte edilmiştir. Analizlerinde, plazmid yapılarının, hem böbrek hem de dalak numunelerinde aşılamadan sonraki 3. günde IFN-1 ve bununla ilişkili genlerin ekspresyonunu artırdığını gösterdiğini ortaya

koymuşlardır. Spesifik olarak pEF-GD, pEF-G ve pEF-D ile tedavi edilen gruptan istatistiksel olarak daha yüksek bağışıklık yanıt genleri ekspresyonu göstermiştir ($p < 0.05$ / $p < 0.001$). VHSV tehdidinden sonra, pEF-GD ile muamele edilen balık grubu, pEF-G ile muamele edilen gruptan daha yüksek hayatta kalma oranı göstermiştir, ancak 15 dpv uygulanan grupta fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamış, ancak 30 dpv uygulanan grupta fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bununla birlikte, bu sonuçlarla açıkça DDX41'in, pisi balığında G-bazlı DNA aşısı için etkili bir yardımcı olduğunu ve bu bulguların sonraki çalışmalarda su ürünleri endüstrisi için daha etkili DNA aşılarının geliştirilmesini kolaylaştırabileceğini göstermişlerdir.

Hao vd. (2017) yaptıkları çalışmada, ot sazanı reovirüsünün (GCRV) en patojenik aquareovirüslerden biri olduğunu ve ot sazasında (*Ctenopharyngodon idella*) öldürücü hemorajik septisemiye neden olabileceğini rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, GCRV enfeksiyonunun yönetiminin hala oldukça zor olduğunu ve bu nedenle, enfeksiyonunun kontrolü için etkili araçlar bulmak gerektiğini belirtmişlerdir. Ölü bakterinin (BG, canlı olmayan bakteri) DNA iletimi için taşıyıcı olarak kullanılmasının veterinerlik ve insan aşıları çalışmalarında büyük dikkat çekmiştiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, balıklarda ölü bakteri bazlı DNA aşılarının intramüsküler olarak verilmesi ile ilgili bir raporun bulunmadığını vurgulamışlardır. Çalışmalarında, büyük bir kapsid protein geni (vp7) olan ot sazanı reovirüsünün kodlanmış DNA aşısı veren *E. coli* DH5α ölü bakterisine (DH5α-BG) dayalı yeni bir aşı, vp7 DNA aşısının ot sazanında GCRV'ye karşı etkinliğini arttırmak için geliştirilmiştir. Ot sazanı farklı tedavilerle intramüsküler olarak enjekte edilmiştir; i) çıplak pcDNA-vp7 (sırasıyla 1, 2.5 ve 5 μg plazmidini içeren) ii) DH5α-BG / pcDNA-vp7 (sırasıyla 1, 2.5 ve 5 μg plazmid içeren) ve iii) çıplak pcDNA, DH5α-BG veya phosphate buffered saline (PBS). Ot sazanın bağışıklık tepkileri ve hastalık direnci farklı gruplarda değerlendirilmiş ve sonuçlar, antikor seviyeleri, serum total antioksidan kapasite (T-AOC), süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, asit fosfataz (ACP) aktivitesi ve alkalin fosfataz (AKP) aktivitesi ve immün-ilişkili genlerin DH5α-BG / pcDNA-vp7 aşısı ile aşılanan balıklarda önemli ölçüde arttığını göstermiştir (DNA dozu 2.5 ila 5 μg arasında değişmektedir). Ek olarak, DH5α-BG / pcDNA-vp7 aşısı ile aşılanmış balıklarda nispi yüzde sağkalımın

önemli ölçüde arttığını ve DH5α-BG / pcDNA-vp7 grubunda, nispi hayatta kalma yüzdesinin, enfeksiyondan 14 gün sonra en yüksek DNA dozunda (5 ug) çıplak pcDNA-vp7'ye (%42.22) göre %90'a ulaştığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, pcDNA-vp7 plazmidinin seviyesinin DH5α-BG / pcDNA-vp7 gruplarında, 21 gün sonra kas ve böbrek dokularındaki çıplak pcDNA-vp7 gruplarına göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Genel olarak, bu sonuçlarla DH5α ölü bakteri bazlı DNA aşısının, su canlılarında GCRV enfeksiyonuna karşı savaşmak için umut verici bir aşı olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür.

Sun vd.(2012) çalışmalarında, *Streptococcus iniae*'nin hem deniz hem de tatlı su balık türlerini içeren geniş bir konakçı yelpazesine sahip önemli bir balık patojeni olduğunu vurgulamışlar *S. iniae*'ye karşı etkili aşılar geliştirmek amacıyla, streptolisin S dizisinin bileşenleri olan sagF, G ve I'ye dayanan üç monovalent DNA aşısı, yani pSagF, pSagG ve pSagI yapmışlardır. Bu aşıların bağışıklık koruyucu potansiyellerini Japon pisi balığı modelinde (*Paralichthys olivaceus*) incelenmişlerdir. Sonuçlarda, intramüsküler uygulamadan sonra aşı plazmitlerinin, aşı kodlayan transgenlerin eksprese edildiği dalak, böbrek ve karaciğere taşındığını göstermişlerdir. İmmunokolloidal altın elektron mikroskopisi, aşı plazmidlerinin her biri ile aşılanmış balıklarda aşı proteini üretimini tespit etmiştir. Ölümcül dozda *S. iniae* tehdidinin ardından, pSagF-, pSagG- ve pSagI ile aşılanmış balıklar sırasıyla %78, %65 ve %76 nispi hayatta kalma oranları (RPS) yüzdesini göstermişlerdir. Farklı monovalent aşı kombinasyonlarından oluşan çok değerlikli aşıların daha iyi korumalar sağlayıp sağlamadığını incelemek için pisi balığını, FG (pSagF ile pSagG), FI (pSagF ile pSagG) veya FGI (pSagF ile pSagG ve pSagG) ile aşılamışlardır. Daha sonraki çalışmada, iki değerli ve üç değerlikli aşılarla aşılanmış balıkların RPS oranlarının, monovalent aşılar ile aşılanan balıklara göre sırasıyla %4 ila %17 ve %13 ila %26 arasında olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, görünüşe göre sekans analizi ile açıklandığı gibi, bu serotiplerde yüksek oranda korunmuş SagF, SagG ve SagI homologlarının varlığı nedeniyle, FGI'ın hem serotip I hem de serotip II S. iniae'ye karşı güçlü bir çapraz koruma gösterdiğini belirtmişlerdir. İmmünolojik analizle, tüm aşıların şunlara tesir ettiğini göstermişlerdir; i) Spesifik serum antikor üretimi, ii) gelişmiş kompleman aracılı bakterisidal aktivite ve iii) geniş bir immün gen yelpazesinin anlamlı indüksiyonu. Bununla birlikte, gen ekspresyonu ve FGI

tarafından uyarılan serum bakterisidal aktivite seviyelerinin genel olarak monovalent aşıların uyardıklarından daha etkili olduğu belirtilmiştir. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlarla, sagF, G ve I bazlı DNA aşılarının, özellikle çok değerlikli aşılar olarak formüle edildiklerinde, *S. iniae* enfeksiyonuna karşı oldukça etkili olduğunu göstermişlerdir.

Zhang vd.(2017) araştırmalarında, sazan bahar viremisi'nin (SVCV), balık yetiştiriciliğinde oldukça bulaşıcı ve patojenik olduğunu ve kültür balıkçılığında büyük ekonomik kayıplara neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sazan yetiştiriciliği endüstrisi için istenen en acil önlemin, etkili ve ekonomik koruyucu önlemler olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, aday bir DNA aşı taşıyıcısı olarak tek duvarlı karbon nanotüpleri (SWCNTs) banyo (1, 5, 10, 20, 40 mg L − 1) veya enjeksiyon (1, 4, 8, 12, 20 μg) ile sazan yavrularında uygulamışlardır ve immünoprotektif etkiyi tetikleyen farklı immün tedavileri analiz etmişlerdir. Sonuçlarda, pEGFP-G tedavi gruplarına kıyasla SWCNTs-pEGFP-G tedavi gruplarında banyo uygulaması veya kas içi enjeksiyon yoluyla kas, dalak ve böbrek dokularında yüksek G transkripsiyon ve ekspresyon seviyelerinin tespit edilebildiğini göstermişlerdir. Bu arada, komplemen aktivitesi, süperoksit dismutaz aktivitesi, alkalin fosfataz aktivitesi, bağışıklık ile ilgili genler (özellikle TNF-a) ve antikor seviyelerinin, SWCNT'lerle birleştirilen DNA aşısıyla aşılanan balıklarda önemli ölçüde arttığını ortaya koymuşlardır. Nispi yüzde sağkalım (RPS), SWCNTs-pEGFP-G aşısı ile yıkanmış balıklarda önemli ölçüde artmış ve RPS, SWCNTs-pEGFP-G grubunda enfeksiyondan 22 gün sonra en yüksek aşı dozunda (40 mg L-1) çıplak pEGFP-G'ye (%40.0) göre %57.5' e ulaşmıştır. Banyo immünizasyon grubundaki balığın, 40 mg L−1 konsantrasyonda, 12 μg dozunda enjeksiyon grubunda benzer RPS' e ulaşabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada, amonyum işlevli SWCNT'lerin DNA aşısı için ümit verici bir taşıyıcı olduğunu ve balık yetiştiriciliğinde banyo uygulaması yaklaşımıyla büyük ölçekli işletmelerde yavru balıkları aşılamak için kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Yan vd.(2015) çalışmalarında, DNA aşılarının oral yoldan verilmesinin balıklar için umut verici bir aşılama yöntemi olduğunu belirtmişler ve rekombinant mayanın, bazı türlere in vivo olarak antijen proteinleri ve DNA'lar vermek için güvenli bir taşıyıcı

olduğu kanıtlandığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, rekombinant mayanın, balıklara aşılama için fonksiyonel DNA'ları vermek için kullanılıp kullanılamayacağının halen bilinmemekte olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmalarında, japon balıklarına (*Carassius auratus*), CMV-EGFP ekspresyon kasetini barındıran rekombinant *Saccharomyces cerevisiae*'i oral olarak uygulamışlardır. İlk aşılamadan sonraki 5. günde, floresan mikroskobu altında arka bağırsak'taki EGFP ifadesi tespit etmişlerdir. İletilen genin spesifik immün yanıtları uyarıp uyarmayacağını daha fazla incelemek için, model antijen ovalbümin (OVA) immünojen olarak kullanmışlar ve oral uygulamaları, gen dağıtımı olarak pCMV-OVA memeli gen ekspresyon kaseti veya protein dağıtımı olarak pADH1-OVA maya gen ekspresyon kaseti içeren rekombinant *S. cerevisiae* ile gerçekleştirmişlerdir. Her uygulama, üç farklı dozda yapılmış ve OVA'ya özgü serum antikorunu, bütün deney gruplarında western blot ve enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) ile tespit etmişlerdir. ELISA tahlili, düşük dozlu pCMV-OVA grubunun (pCMV-OVA-L) ve orta dozda pADH1-OVA grubunun (pADH1-OVA-M), diğer iki doza göre nispeten daha güçlü antikor tepkisini tetiklediğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca, pCMV-OVA-L grubu tarafından tetiklenen antikor seviyesini, aynı serum seyreltilerinde pADH1-OVA-M grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. Tüm sonuçlarla, rekombinant mayanın oral DNA aşıları için potansiyel bir taşıyıcı olarak kullanılabileceğini ve kültür balıkçılığındaki bulaşıcı hastalıkları kontrol etmek için daha pratik stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olacağını ortaya koymuşlardır.

Choi vd.(2012) yaptıkları çalışmalarının amacı, pisi balığı (*Paralichthys olivaceus*) 'nda DNA aşıları için daha güçlü bir promotör bulmak ve oksotrofik *Edwardsiella tarda* mutantının (*Δalr Δasd E. tarda*) pisi balığında VHSV'ye karşı DNA aşısı için bir dağıtım aracı olarak kullanılabilirliğini değerlendirmekti. Vektörleri *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) hücrelerine transfekte ettiklerinde veya pisi balığı kasının içine enjekte ettiklerinde, pirinç balığı (*Oryzias dancena*) β-aktin promotörünü sitomegalovirüs (CMV) promotöründen açıkça daha güçlü olarak bulmuşlardır. Pirinç balığı β-aktin promotörünün, pisi balığı içindeki DNA aşıları için CMV promotöründen daha uygun bir promotör olacağını ileri sürmüşlerdir. Pirinç balığı β-aktin promotörü tarafından tahrik edilen viral hemorajik septisemi virüsü (VHSV)

DNA aşısı vektörünü barındıran *Δalr Δasd E. tarda* ile aşılanan pisi balığının, serum nötralizasyon titresinde belirgin olarak daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. CMV promotörü tarafından tahrik edilen VHSV DNA aşı vektörünü taşıyan balıklarının, bakteri ile aşılanmış balıklardan VHSV ile mücadeleye karşı daha yüksek hayatta kalma oranları gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlarla pirinç balığı β-aktin promotörlü DNA aşı vektörlerini barındıran oksotrofik *E. tarda* mutantının, pisi balığı içindeki bulaşıcı hastalıkların profilaktikleri için potansiyel bir sistem olacağını göstermişlerdir.

Ballesteros vd.(2014) yaptıkları çalışmada, oral uygulama yönteminin gökkuşağı alabalığındaki etkinliğini değerlendirmek için yem içine bulaşıcı pankreas nekroz virüsünün (IPNV) VP2 genini temel alan bir DNA aşısı dahil etmişlerdir. Suda çözünmüş yeme liyofilize aljinat-plazmid kompleksleri ilave etmiş ve karışımı tekrar liyofilize etmişlerdir. Arka arkaya 3 gün boyunca boş plazmid veya ticari pellet yem ile beslenen gökkuşağı alabalıklarını, aşı peletleriyle beslenenler ile karşılaştırmışlardır. VP2 gen ekspresyonu, 15 günlük süre boyunca pcDNA-VP2 kaplı yem (böbrek, dalak, bağırsak ve solungaç) alan gökkuşağı alabalığındaki farklı organların dokularında tespit etmişlerdir. Bu pcDNA-VP2 aşısı açıkça IFN-1, IFN-γ, Mx-1, IL8, IL12, IgM ve IgT ekspresyonunu düzenleyen bir doğal ve spesifik immün tepkiye neden olmuştur.Ballesteros vd.(2014) En az 90 gün boyunca tespit edilebilir seviyelerde anti-IPNV nötrleştirici antikorlar üreten aşılanmış alabalıkta, %78 – %85.9 nispi sağkalım oranıyla güçlü koruma kaydetmişlerdir. IPNV replikasyonu aşılanmış balıkta 45 gün pi'de önemli ölçüde aşağı regüle edilmiş olarak bulunduğu belirtilmiştir.

Zhu vd.(2015) araştırmalarında, tek duvarlı karbon nanotüplerin (SWCNT'ler) DNA iletimi için taşıyıcı olarak kullanılmasının hücre araştırmalarında büyük ilgi gördüğünü, balıkların DNA aşılamasının, dayanıklı transgen ekspresyonu sağladığını, ancak kovalent olmayan konjugasyon yoluyla hazırlanan SWCNT-DNA aşısı elektrostatik komplekslerinin intramüsküler uygulaması hakkında hiçbir rapor olmadığını belirtmişlerdir. Bunun için çalışmalarında, ot sazanını intramüsküler olarak çıplak pcDNA-vp7, SWCNTs-pcDNA-vp7, boş plazmid vektör veya fosfat olarak büyük bir kapsid protein geni (vp7) ot sazanı reovirüsünü içeren bir plazmid

vektör ile veya tamponlu tuzlu su (PBS) ile enjekte etmişlerdir. İntramüsküler uygulamadan sonra, farklı immün işlemlerin transgen ekspresyonunu indükleme kabiliyetini analiz etmişlerdir. Sonuçlarında, SWCNTs-pcDNA-vp7 tedavi gruplarında intramüsküler enjeksiyonun 28 gün kas içi enjeksiyonunda vp7 geninin daha yüksek transkripsiyon ve ekspresyon seviyelerinin tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Ayrıca, serum solunum patlaması aktivitesi, kompleman aktivitesi, lizozim aktivitesi, süperoksit dismutaz aktivitesi, immün ile ilgili genler, antikor seviyeleri ve nispi yüzde sağkalımın, SWCNTs-pcDNA-vp7 aşısı ile aşılanmış balıklarda önemli ölçüde arttığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmadaki verilerle, SWCNT'lerin plazmid DNA aşısı için ümit verici taşıyıcılar olduğunu ve intramüsküler yaklaşımla balıkları aşılamak için kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Sun vd.(2012) çalışmalarında, *Streptococcus iniae* ve *Vibrio anguillarum*'un neden olduğu Streptococcosis ve vibriozisin, dünyadaki balık kültürü endüstrilerini etkilediğini ve önceki çalışmalar *S. iniae* antijeni Sia10 ve *V. anguillarum* dış membran proteini OmpU'nun DNA aşıları olarak kullanıldığında sırasıyla kalkanda (*Scophthalmus maximus*) ve Asya levreklerinde (*Lates calcarifer*) korunmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Buna dayanarak, *S. iniae* ve *V. anguillarum*'a karşı etkili aşılar geliştirmek için, Sia10 ve OmpU'ya dayanan üç DNA aşısı yapmışlar ve hem streptokok hem de vibriozisten muzdarip olduğu bilinen Çin'de bulunan pisi balığı (*Paralichthys olivaceus*) modelinde bağışıklık etkilerini incelemişlerdir. Sun vd.(2012) çalışmalarında oluşturdukları üç DNA aşısından, pIDSia10 ve pIDOmpU sırasıyla Sia10 ve OmpU'yu ifade ederken, pSiVa1, tek bir bististronik mRNA transkriptinden çevrilmiş iki ayrı protein olarak Sia10 ve OmpU'yu ifade etmiştir. Aşılama sonrası 7. ve 28. günlerde aşı plazmitlerini ve aşı kodlayan genlerin ekspresyonunu aşılanan balığın kasında, dalağında, böbreğinde ve karaciğerinde tespit etmişlerdir. İmmunokolloidal altın elektron mikroskopisi ile sırasıyla Sİİ10 ve OmpU proteinlerinin pIDSia10- ve pIDOmpU ile aşılanmış balıklarda üretimi algılanmışken, Sia10 ve OmpU proteinleri pSiVa1 aşılanmış balıklarda tespit edilmiştir. Aşılamadan bir ve iki ay sonra, pIDSia10 ve pSiVa1 ile aşılanan balıklar, öldürücü *S. iniae* tehdidini takiben nispi hayatta kalma (RPS) oranlarını (%80 -%87) olarak göstermişlerdir. Benzer koruma oranlarının, öldürücü *V. anguillarum* tehdidinin ardından pIDOmpU ve pSiVa1 ile aşılanmış balıklarda da tespit edildiğini

bildirmişlerdir. İmmünolojik analizler ile tüm aşıların, kompleman aracılı bakterisidal aktiviteyi arttıran spesifik serum antikor üretimini tetiklediğini ve pSiVa1'in geniş bir immün ilgili gen spektrumunun ekspresyonunu zamana bağlı bir şekilde modüle ettiğini göstermişlerdir.

Heras vd.(2010) araştırmalarında, DNA aşılarının ve enfeksiyöz pankreas nekrozu virüsüne (IPNV) karşı oral DNA bazlı immünoterapinin somon balıklarında çok az çalışıldığını bildirmişler ve bununla beraber kapsid VP2 geni yerleştirilmiş bir vektörü, oral uygulamadan sonra yaşanan agresif gastrointestinal koşullardan kaçınmak için aljinat mikro kürelerinde kapsüllemişlerdir. Aljinat mikrosferleri, aşılanmış alabalıkların farklı organlarında erken eksprese edilen ve en az 60 gün boyunca devam eden VP2'yi kodlayan pDNA'yı korumak için etkili olduğu belirtilmiştir. Aşının, aşılamadan 7 ve 15 gün sonra, boş plazmid ile aşılanmış balığa göre IFN ekspresyonunu 10 kattan daha fazla arttırarak doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini artırdığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, IFN'nin neden olduğu antiviral Mx proteininin maksimum ekspresyonu aşılamadan 15 gün sonra kaydedilmiş ve nötralize edici antikorlar ayrıca aşılamadan 21 gün sonra yükselmiş olsalar da 15 gün sonra tespit etmişlerdir. Heras vd.(2010)balıkların aşı verilmesinden 15 ve 30 gün sonra enfekte edildiklerinde %80 nispi sağkalım gösterdiğini yani korunmanın aşılanmış balıklarda yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Enfekte edildikten 45 gün sonra hayatta kalan aşılanmış balıkta kontrol grubuna göre çok düşük viral yük tespit etmişlerdir. Böylece bu çalışmada, kapsülleme tekniğinin IPNV-DNA aşısı iletimi için potansiyelini ve IPNV-VP2 geninin gelecekteki plazmid yapıları için alaka düzeyini göstermişlerdir.

Penaranda vd.(2011) çalışmalarında, enfeksiyöz hematopoetik nekroz virüsünün (IHNV), salmonid türlerinde önemli mortaliteye neden olan bir balık rabdovirüsü olduğunu ve Kuzey Amerika'da IHNV'nin, U, M ve L olarak adlandırılan üç ana genogrupuna sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca IHNV'nin M ve U genogruplarının konak özgüllüğünün hem doğada hem de deneysel mücadelelerde, M izolatları gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) daha yaygın ve daha virülan oldukları bildirilmiştir. U genogruplarinin ise, pasifik somonda (*Oncorhynchus nerka*) daha yaygın ve virülan olma özelliğini belirtmişlerdir.

Gökkuşağı alabalığındaki M (pM) veya U (pU) virüs glikoprotein genlerini içeren DNA aşılarının etkinliğini araştırmışlardır. Aşılamadan sonraki 7. gündeki virüsle mücadelede (erken antiviral cevap), hem pM hem de pU'nun, M veya U IHNV'ye karşı oldukça koruyucu olduğunu bulmuşlardır. Aşılamadan sonraki 28. gündeki (spesifik antiviral tepki) tepkilerde, hem pM hem de pU'nun, M IHNV'ye karşı koruyucu olduğunu, fakat homolog pM aşısının, iki deneyden birinde pU'dan önemli ölçüde daha koruyucu olduğunu tespit etmişlerdir. Bu aşamada hem pM hem de pU'nun, U IHNV tehdidine karşı nispeten yüksek koruma sağladını belirtmişlerdir. Koruma korelasyonları ayrıca, interferon ile uyarılan gen Mx-1'in ekspresyonu ve pM veya pU DNA aşılamasından sonra nötrleştirici antikorların (NAb) üretimini değerlendirilerek araştırmışlardır. Aşıdan 4 ve 7 gün sonra, konakçı doğal immün tepkisinin bir göstergesi olarak ölçütükleri Mx-1 gen ekspresyonunu, bazı durumlarda pM aşılamasından sonra anlamlı derecede daha yüksek bulmuşlardır. Nötrleştirici antikor, iki aşıya cevap olarak üretilmiş, fakat antikor titreleri, koruma ile tutarlı bir korelasyon göstermemiştir. Sonuçlarında, gökkuşağı alabalığının doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtların, U ve M genogrupu IHNV'yi ayırt etme kabiliyetine sahip olduğunu göstermişlerdir, fakat genel olarak pM ve pU aşılarının, hem homolog hem de çapraz genogroup mücadelelerine karşı koruyucu olduklarını bildirmişlerdir.

Kumar vd. (2008) araştırmalarında, son yıllarda balık yetiştiriciliğinde DNA aşılarının kullanılma ihtimaline odaklanmışlardır. DNA'nın balığa intramüsküler enjeksiyonu için başarılı bir rejim geliştirildiğini ve bu DNA'yı balığa vermek için yeni yöntemler araştırıldığını belirtmişler ve kitosanın polikasyonel bir gen taşıyıcı olarak oral uygulama için potansiyelinin 1990'lı yıllardan beri araştırıldığına dikkat çekmişlerdir. Bu bilgiler ışığında, kitosan nanopartikülleri enkapsülasyonu kullanarak DNA aşısının *Vibrio anguillarum*'a karşı oral yoldan potansiyel etkinliğini incelemişlerdir. Çalışmalarında *V. anguillarum'*un porin geni, bir ökaryotik ifade vektörü olan pcDNA 3.1 kullanılarak DNA aşısını oluşturmak için kullanılmış ve yapı, pVAOMP38 olarak adlandırılmıştır. Yapılan plazmidin verilmesi için kitosan nanoparçacıklarını kullanmışlardır. Porin geninin in vitro ve in vivo ekspresyonunu, deniz levreği böbrek hücre hattında (SISK) ve balıkta sırasıyla floresan mikroskopisi ile gözlemişlerdir. Kitosan kapsüllenmiş DNA aşı yapısının

sitotoksisitesini, MTT tahlili ile analiz etmişler ve pVAOMP38 / kitosanın sitotoksisitesinin oldukça düşük olduğunu bulmuşlardır. Genin farklı dokularda dağılımını, kitosanda kapsüllenmiş DNA (pVAOMP38) ile beslenen balıklarda immünohistokimya kullanarak incelemişlerdir. Sonuçlar, DNA aşısının, kitosan nanoparçacıklarıyla beslenerek kolayca balığa verilebileceğini göstermiştir. Oral aşılamadan sonra, Asya deniz levreğine kas içi enjeksiyon yoluyla *Vibrio anguillarum* uygulamışlardır. Nispi hayatta kalma oranını (RPS) %46 olarak kaydetmişlerdir. Sonuç olarak, kitosan-DNA (pVAOMP38) kompleksi ile oral olarak aşılanan Asya deniz levreği (*Lates calcarifer*) 'nin deneysel *V. anguillarum* enfeksiyonuna karşı orta derecede koruma gösterdiğini göstermişlerdir.

Li vd.(2019) araştırmalarında, Enfeksiyöz hematopoetik nekroz virüsünün (IHNV), salmonid su ürünleri endüstrisinde ciddi hastalıklara ve ekonomik kayıplara yol açtığını vurgulamışlardır ve gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) için IHNV enfeksiyonuna karşı etkili bir aşı geliştirmeyi amaçlamışlardır. Daldırma yolu ile tatbik edilen, IHNV glikoprotein (G) bölgelerini içeren bir canlı vektör aşısının, gökkuşağı alabalıklarında bağışıklık tepkilerini tetiklediğini ortaya koymuşlardır. Daldırma yolunun kullanılması, intramüsküler enjeksiyon aşılamadan daha verimli mukozal bağışıklık yaratmıştır. IHNV G gen ekspresyonunu aşılamadan 3, 7 ve 15 gün sonra (dpv) gökkuşağı alabalığı dalaklarında tespit etmişlerdir. G geninin ekspresyonunun 3 ila 15 dpv arasında sürekli azaldığını tespit etmişlerdir. Ek olarak, TLR-3, TLR-7 ve TLR-8 ekspresyonu aşılamadan sonra yukarı doğru düzenlenmiş ve en yüksek IFN-1, Mx-1, Mx-3, Vig-1 ve Vig-2 ekspresyon seviyelerini 3 dpv'de gözlemlemişlerdir. Adaptif immün yanıtın dört işaretinin (CD4, CD8, IgM ve IgT) yavaş yavaş arttığını ortaya koymuşlardır. Deney balığına IHNV ile daldırma işlemi uygulandıklarında, aşılanan balıklarda ve aşılanmamış (boş-plazmid aşılanmış) balıklarda kümülatif yüzde ölüm oranlarında önemli farklılıklar gözlemişlerdir. Nispi hayatta kalma oranı aşılanmış grupta ve boş plazmid grubunda sırasıyla %92 ve %6 olarak bulunmuştur. Aşılanan balıkta, aşılanmamış balıktan farklı olarak, 7 dpv'den sonra, serum antikor seviyelerinin kademeli olarak arttığını tespit etmişlerdir. Sonuçlarında, canlı vektör aşısının uygulanmasından sonra balıkların bağışıklık tepkilerinde ve IHNV ile enfeksiyona dirençte önemli bir artış olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle, bu canlı vektör aşısının gökkuşağı alabalıklarını

IHNV'ye karşı korumak için kullanılabilecek umut verici bir aşı olduğunu ortaya koymuşlardır.

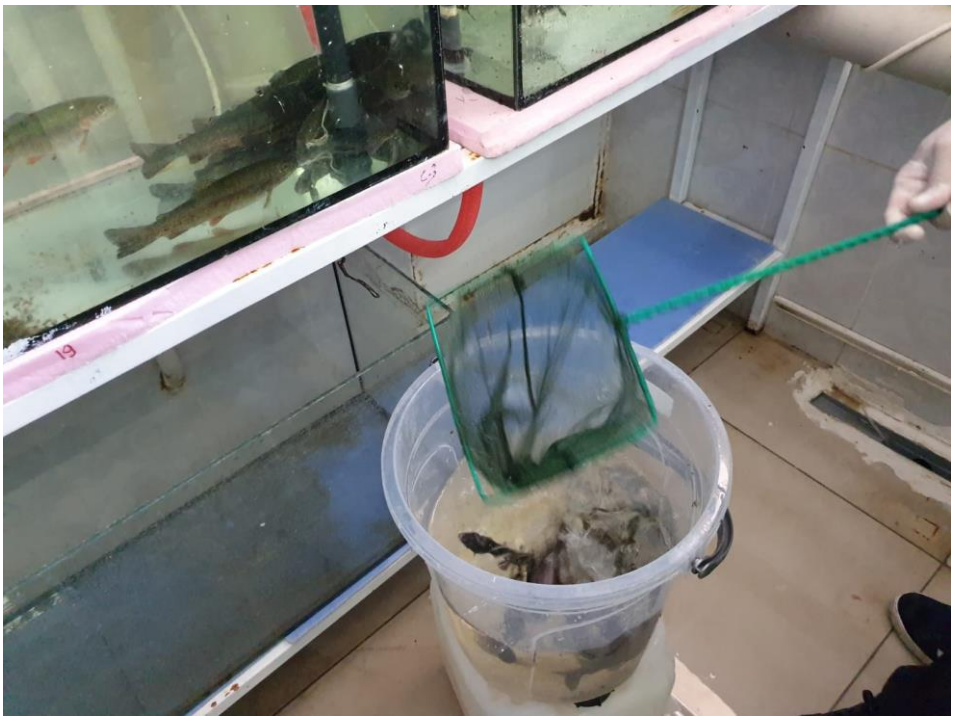
Skinner vd. (2010) araştırmalarında, bir DNA aşısının aynı anda birçok değerlikli, yağ ile adjuvanlanmış aşı ile enjekte edilmesinin ardından rutin metabolik hızda (RMR) önemli bir artış olduğunu göstermişlerdir. RMR'deki artışı geçici olarak bulmuşlar ve hem spesifik olmayan hem de spesifik immün yanıtların artan aktivitesi ile ilişkili olarak değerlendirmişlerdir. Gökkuşağı alabalığını (*Oncorhynchusmykiss*), bir DNA aşısı (DV), ticari olarak temin edilebilir birçok değerli, yağ ile adjuvanlanmış aşı (AV) veya kombinasyon halinde iki aşı ile enjekte etmişlerdir. RMR ve anahtar immün parametreleri (serum lizozim aktivitesi, serum nötralizasyon antikor titreleri) için 203, 305 ve 406 gün (gg) aşı sonrası enjeksiyondan (pvi) örnekleme yapmışlardır. Hem DV hem de AV'yi alan balığın RMR'sini, kontrol, AV ve DV gruplarını içeren diğer tüm tedavi gruplarındaki balıklara kıyasla, 203 d / pvi'de anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. Artan RMR, yüksek seviyelerde serum lizozim aktivitesine ve daha önce virüse özgü nötrleştirici antikorların serokonversiyonuna karşılık gelmiştir. Büyüme performansının RMR'deki geçici artıştan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için spesifik büyüme hızı (SGR), günlük ağırlık artışı yüzdesi (WG) ve yem dönüşüm oranını (FCR) 798, 1204 ve 1610 dd pvi'de belirlemişlerdir. Her üç aşı grubundaki balıklar, SGR ve WG'de 798 ve 1610 dd pvi'de kontrol grubuna kıyasla anlamlı artışlar gösterse de, deney sonunda balıkların toplam ağırlığında önemli farklılıklar bulamamışlardır. Özetle, bu çalışmada eşzamanlı bir DV ve AV enjeksiyonunun, gökkuşağı alabalığının RMR'sini geçici olarak arttırdığını ve bağışıklık tepkisinin meydana gelme şeklini değiştirdiğini, ancak balığın genel büyüme performansını etkilemediğini göstermişlerdir.

3. YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Balık Materyali

Deneyde, 2019 yılında Germeçtepe İç Su ve Deniz Balıkları Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretimi yapılan ve ortalama ağırlıkları 55,02±1,02 golan toplam 360 adet gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır. Balıklar Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Araştırma Birimi'nde yer alan kapalı devre sisteme transfer edilmiştir. Bu kapalı devre sistemde su sıcaklığı 16 °C 'de sabit tutulmuştur ve balıklar 2 haftalık adaptasyon süreci sonrasında aşılama denemesi başlatılmıştır.Çalışmada her biri 100 L olan 9 adet akvaryum kullanılmıştır.



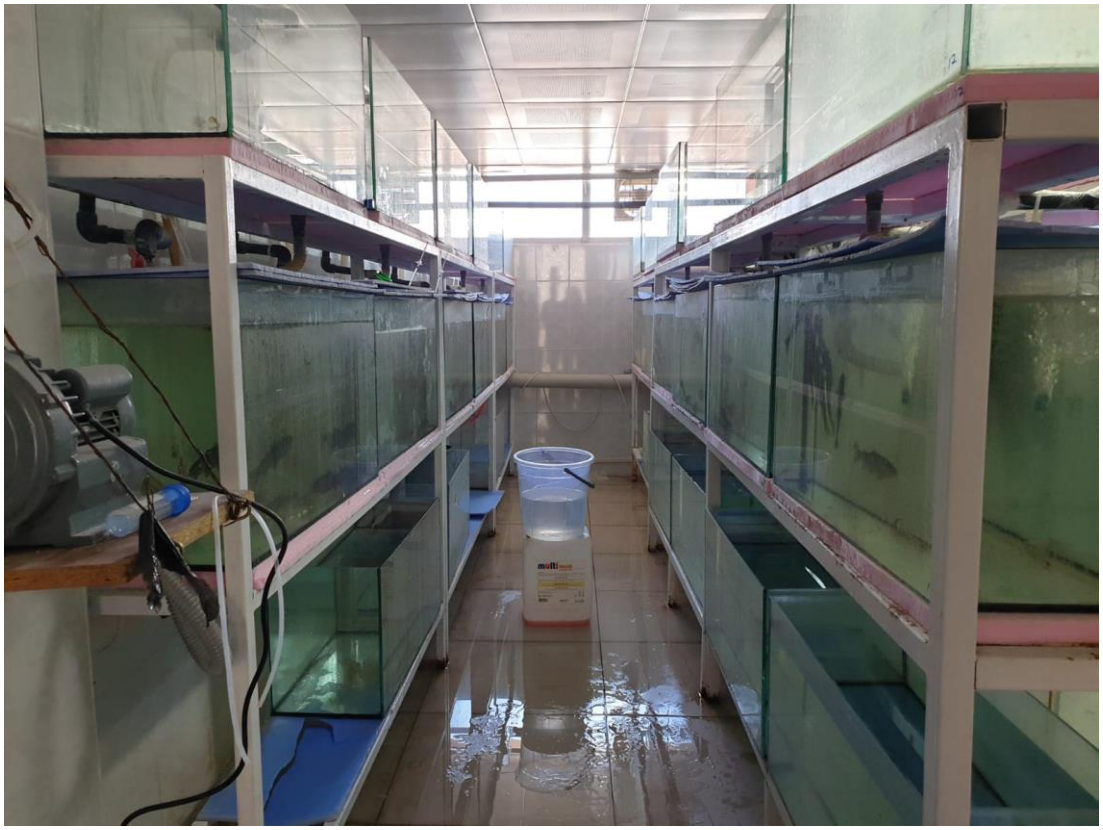
Fotoğraf 3.1. Balıklara anestezi uygulaması



Fotoğraf3.2. Anestezi uygulanmış gökkuşağı alabalıkları

3.1.2. Deneme Yeri

Deneme, Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Araştırma Birimi'nde toplam 30 günde tamamlanmıştır. Çalışmanın 7 ve 30. günlerinde balıklardan doku ve kan örnekleri alınarakbağışıklık yanıtlar belirlenmiştir. Çalışma sonunda balıklar *R. salmoninarum* ile kontrol testlerine tabi tutulmuştur.



Fotoğraf 3.3.Gruplara ayrılmış balıklar ve deneme ortamı

3.2. Yöntem

3.2.1. *Renibacterium salmoninarum* Kültürü

R. salmoninarum kültürü için kullanılan KDM2 sıvı besi yeri Evelyn (1977)'in tarifi modifiye edilerek hazırlanmıştır. Bunun için, toplam hacim 25 ml olacak şekilde: 0,25 g pepton (MERCK, Almanya), 0,0125 g doğal maya ekstraktı (Alfasol, Türkiye) ve 0,025 g L-sistein hidroklorür monohidrat (SRL, Hindistan) hassas terazide tartılmış ve 50 ml'lik falcon tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 20 ml distile su eklenmiş ve vorteks vasıtası ile çözündürülmüştür. Elde edilen karışımın pH'ı NaOH ilavesi ile 6.5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika bekletilerek steril hale getirilen karışımın 45 °C'ye kadar soğuması beklenmiş, son olarak 5 ml fetal sığır serum (Sigma Aldrich, ABD) ilave edilip ters yüz edilerek karıştırılmıştır.

Bakteriler, hazırlanan KDM2 sıvı besiyerine otomatik mikropipet yardımıyla ekilmiştir. Bunun için -80 ℃'de 6:1 besi yeri-gliserol içerisinde muhafaza edilen *R. salmoninarum* oda sıcaklığına getirilerek çözündürülmüştür. KDM2 besi yeri ihtiva eden her bir tüpe *R. salmoninarum* kültüründen 5 µl çekilerek aktarılmış ve pipet ucu falcon tüpünün içerisine bırakılmıştır. Ekim gerçekleştirilen falcon tüpleri 16±0.5 ℃'de 21 gün süreyle 80 rpm'de çalkalanarak inkübasyona (Miprolab, Türkiye) tabi tutulmuştur (Şekil 3.4.).



Fotoğraf 3.4.*R. salmoninarum* kültüründe kullanılan soğutmalı çalkalamalı inkübatör

3.2.2. *Renibacterium salmoninarum* Genomik DNA İzolasyonu

R. salmoninarum'un genomik DNA izolasyonu, DNA saflaştırma kiti (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5.). Bunun için bakteri kültürleri 10 dk süreyle 5000 g'de santrifüj edilmiş, 15±2 mg bakteri hücresi 1.5

ml'lik eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 200 µl TE tamponu eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir. Elde edilen süspansiyondan DNA izolasyonu için üretici firma talimatları izlenmiştir. Bu amaçla kısaca: 200 µl örnek üzerine 400 µl liziz solüsyonu ilave edilmiş ve 65 ℃'de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Akabinde hemen 600 µl kloroform eklenerek 3-5 kez ters yüz edilip karıştırılmıştır. Daha sonra numuneler 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Kit içerisinde sağlanan 10X'lik konsantre çöktürme solüsyonuna 720 µl steril distile su eklenerek çöktürme karışımı elde edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 800 ml taze hazırlanmış çöktürme solüsyonu eklenmiştir. Yine birkaç kere ters yüz edilerek 1-2 dk karıştırılması sağlanmış ve 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant tamamen çıkarılmış ve kalan pelet üzerine 100 µl NaCl solüsyonu eklenerek düşük hızda nazikçe vortekslenmiştir. Pelet tamamen çözündükten sonra üzerine 300 µl soğuk etanol ilave edilmiş ve -20 ℃'de 10 dk boyunca DNA'in çökmesi beklenmiştir. 10 Dakikanın sonunda numuneler 10.00 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve etanol ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kalan pelet %70'lik soğuk etanol ile bir kez yıkandıktan sonra 100 µl steril distile su ilave edilerek DNA'ler nazikçe vortekslenip çözündürülmüştür. Elde edilen DNA'lerin saflık ve konsantrasyon değerleri multiskan go spektrofotometre cihazı aracılığıyla ölçülmüştür (Thermo Scientific, ABD)

3.2.3. MSA1 (1695bp) , İzolasyonu ve Klonlanması

Çalışmada kullanılan MSA1 geni https://www.ncbi.nlm.nih.gov adresinde yer alan ve tam genomda yer alan CP000910.1 111225 – 112901 *Renibacterium salmoninarum* ATCC 33209 kaydından elde edilmiştir. İlgili genin dizilimi Tablo 3.1'de verildiği gibidir.

Tablo. 3.1. *Renibacterium salmoninarumMSA1 geni* sekansı

TTGAAGCTTTTAGTTAAAGGTAATATCTATTTTTCCGCTAAGGTCATTAGATAGT
TTCCAAGCTCCGGAGGAGTGCTCAAAAACACCGAAACTCGTCTTACCCTCACCA
TTCCACTGACCAGTTACCGCAACATCCCCAGCATTACCAAAGACATGGGTTGAG
GCAACAGTCTGGGCATCGTAACTAATCAAAATACTATTCTCACGATGTAACCCA
ACCTGGGTTTTTGCAGTCCCGATCCAGTTCCCAGTAATTGGGGCATCAGTAGAAT
TTCCGAATATGAAATGATAGGAAACAGGCGGATTGGCAGTGGTTAGATCTGATG
TAATATACCACTCTAATCCATTAGCAGTAGACCGTGTCACACCAATCGATGTTTT
ACCTTTACCATCCCAGTCACCTGTGACAGGAGTATCACCGGGATTACCAAAAGC
AACGATCGCTGTTACTTTACCAATAGAAGTTCCAGCATTCGATAGATACCATTGG
CCGCCTCTCTCAACGCCAATACCAAATCGACCTTTACCATCCCAGTCACCTGTGA
CAGGAGTATCACCGGGATTACCAAAAGCAACTGAAACGGAACCAGCATTTGGCT
TTTGCAGTACCCATTGGCCGTCCTTGAACCATCCACCATACGTGTTGTTGTCGCC
AGACCACCATTTACCAGTAACCGGAGTTGCTCCATCTGGTGCATGGATATCTGG
GTGTTGGTCACTACCCACGTATTCAAATTTGTCAGTTGCTGTTGCGGAACCGTTA
GGTGTAGAGACTTTAACCTCTACCGGGCCAGCGGCATCTACTGCTGGTGTTTTTA
CAGTCAACGAGTTGCCATCCTGCGCGATGTGAATTTCCGTTGCCTCGTTGTCTCC
GAAGGTAACTCTCGATACGTCGAATAGGTTGCCGCCATTCACCTTCACCACAGT
ACCGCCGTCACGAGGCCCAGTCTTAGGCTCGAGAGTTGCTGCTGTCGGGGCGCT
TCCGAAGTAGTGGAAACTCTCGTACGTTACCGTCTCCCCACCGGGGTTAGTGACT
GTAACCTTTACCGGGCCAGCGGCATCTACTGCTGGTGTTTTTACAGTCAACGAGT
TACCATCCTGAGCGACGGCAATGTCCGTTCCCGGTTTGTCTCCAAAGGAGACTTG
CGATGCGCCGAATAGGTTGCTGCCATCCACCTTCACCACAGTACCGCCGCCAAG
AGGACCCGCCGGAGGCTGAAGTCCGGATGCAACAGGTTTATTTGCCGGGCCACA
TCCCATTGGGGATGGCGCATTATCGTTACACCCGAAACCTACGTTTAGAGTCGTC
CCCCAGACTTTCAGTTCCTTGGCAGGACCATCTTTGTTATAAACAAAGGAGCTTC
CTTTTTGCTCATTTCCAAAAACCGCGTTTACTACGGGAACAACAAGATCTCCGTC
TTCGAAGCCCTTTTTACCTAAATCACCAGAACTATAAGAGCCACCAGCTGCAACT
GGTCCTCCTGCGGCGCTGGAGGTCCCGTCAGGCCTTAACTCGTGAAAGAAAGCA
GAATAACCACCCTGTTGAAAAATGTTAACACTGCTGAAGCCTTGTACTGTTGAA
GTGGAAGAATTCCCTTCACCTTGCGAAGCTTGCGCAAGAGGAGCCACCCCAAAA
AAAGTGACTGCAGTGACTGCAGTCAGCGCTAAAATTTTTTTTATTTTCATGGATC
CATT

3.2.3.1.PZR kurulumu (MSA1)

Bu aşamada primerlerin bağlanma sıcaklıklarına göre PZR yapılmıştır. Bu işlem için 'NEB Q5-High Polymerase with Standart Q5 Buffer M0491S' ve enzimi kullanılmıştır. Örnek sayısı ile aşağıdaki miktarlar çarpılarak karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımdan her bir tüpe eşit miktarda dağıtım yapıldıktan sonra üzerine DNA eklenmiştir. PCR şartları Thermal cycle'da ayarlanarak PZR kurulmuştur.

Tablo 3.2.*PZR prosedürü*

DNA	4 µl
5X Q5 Buffer	5 µl
10 mM dNTPs	0.5 µl
MSA1 Ileri Primer (10 uM)	1 µl
MSA1 Geri Primer (10uM)	1 µl
***Q5* Polymerase**	0,25 µl
Steril double distile su	13.25 µl
	25 µl

Tablo 3.3. *PZR termal döngüsü*

AŞAMA	**SICAKLIK**	**ZAMAN**
Denatürasyon	98 °C	2 dakika
40 Döngü (Bağlanma)	98°C 54°C 72°C	30 saniye 30 saniye 1.5 dakika
Uzama	72°C	10 dakika
Sonsuz	4°C	

3.2.3.2.MAS-1 geni primer dizileri

Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. MAS-1 geni primer dizileri

Gen	DİZİLİM (5'→3')
MSA1 İleri	**TTAGTTAAAGGTAATATCTATTTTTCCG**
MSA1 Geri	**ATGAAAATAAAAAAAATTTTAGCGCT**

Tablo 3.5. PZR Kurulumu

PZR	**25 µl reaksiyon X 4 = 100 µl**
DNA	4 µl
5X Q5 Buffer	5 µl
10 mM dNTPs	0.5 µl
MSA1 İleri Primer (10 uM)	1 µl
MSA1 Geri Primer (10uM)	1 µl
***Q5* Polymerase**	0,25 µl
Steril double distile su	13.25 µl

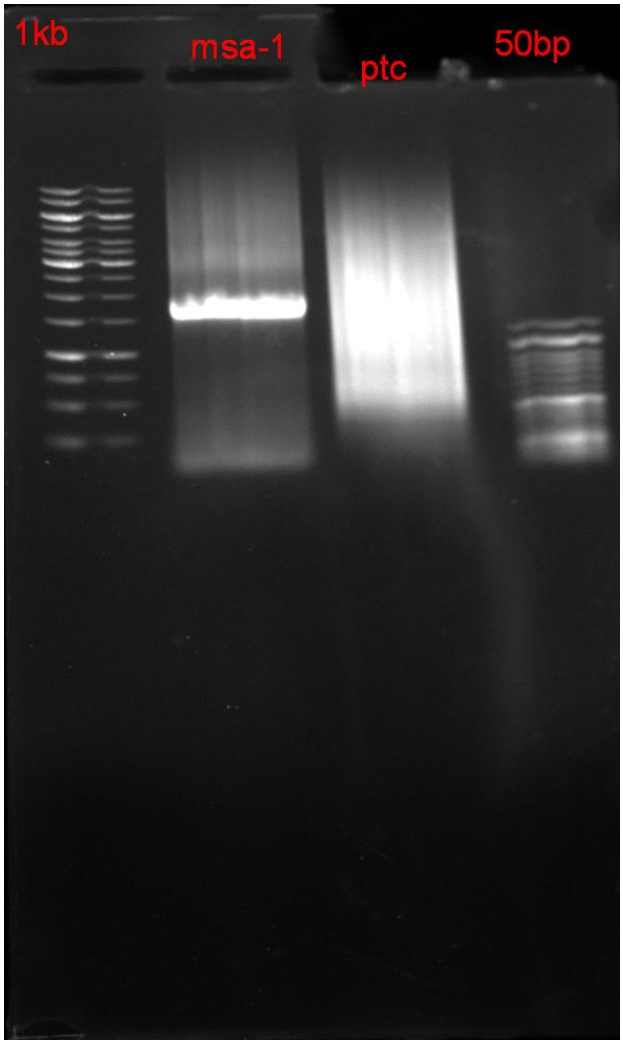
Tablo 3.6. *PZR termal döngüsü*

AŞAMA	**SICAKLIK**	**ZAMAN**
Denatürasyon	98 °C	**2 dakika**
40 Cycles (Bağlanma)	98°C 54°C 72°C	**30 saniye** **30 saniye** **1.5 dakika**
Uzama	72°C	**10 dakika**
Sonsuz	4°C	

Reaksiyon sonunda PZR ürünü %0,7'lik jele yüklenerek geri kazanılmıştır. Bu işlemMacherey-Nagel marka Gel Extraction kiti protokolüne göre yapılmıştır (Şekil 3.6.).

	PCR Temizleme	Jel Ekstraksiyonu	DNA Temizleme (SDS ile)	Tek İplikçikli DNA Temizleme
1 PZR, DNA, DNA İplikçik Yıkama ve Bağlamda Ortamının Hazırlanması				
				
	200 µL NTI/ 100 µL **PZR**	200 µL NTI/ 100 mg **jel**	500 µL NTB/ 100 µL **örnek**	200 µL NTC/ 100 µL **örnek**
		50 °C 5–10 **dk**		
2 **DNA Bağlama**			11,000 x *g* 30 s	
3 **Silika Membranın Yıkanması**			700 µL NT3 11,000 x *g* 30 s **2. Yıkama** 700 µL NT3 11,000 x *g* 30 s	
4 **Silika Membranın Kurutulması**			11,000 x *g* 1 min	
5 **DNA Yıkaması**			15–30 µL NE RT **1 dk** 11,000 x *g* **1 dk**	

Şekil 3.1. PZR ürünü jel saflaştırma prosedürü



Fotoğraf 3.5. MSA1 geni

3.2.3.3.Ligasyon (pGET 2.1/blunt vektör ile)

Ligasyon işlemi için Thermo Fisher Scientific pJET 2.1/blunt vektör kiti kullanılmıştırve (URL-1, 1995) linkinde bulunan ligasyon protokolü uygulanmıştır.

3.2.3.4.Transformasyon

Ligasyon ürünü ve M15 compotent cell ile transformasyon işlemi yapılmıştır.

10 µl ligasyon ürünü + 90 µl M15 Compotent hücre ependorf tüpe alınır. Sonrasında sırasıyla

1. 30 dakika buzda bekletilir

2. 42 °C de heat shock ta 45 saniye inkübe edilir.

3. hemen buza alınarak 2 dakika bekletilir.

4. İçerisine 100 µl C-Medıum besiyeri eklenir

5. 37 °C de çalkalamalı etüvde 45 dakika inkübasyona bırakılır.

6. İnkübasyon sonunda AMP içeren LB Agar plağına X-GAL ve IPTG eklenir, sonrasında üzerine transformasyon ürünü ekilir.

7. Bakteri ekilen plak 37 °C de etüvde bir gece inkübe edilir.

Plaktan seçilen beyaz kolonilerden M13 koloni PCR kurulur.

3.2.3.5.pJET Koloni PZR

10 X Taq Buffer	1 µl
dNTP	0.2 µl
pJET Forward	0.2 µl
pJET Reverse	0.2 µl
Taq DNA Polimeraz	0.05 µl

ddH2O 6.35 µl

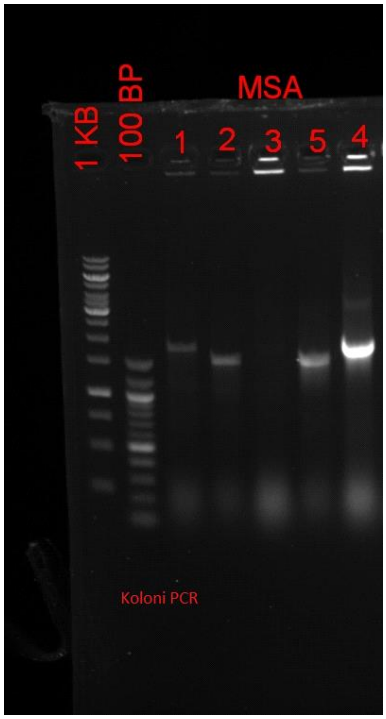
DNA 2 µl

10 µl

DNA beyaz koloniler seçilerek 2 µl DEPC ile muamele edilmiş double distile suyla sulandırılmıştır.

MSA1 #1, MSA1 #2,MSA1 #3 ve MSA1 #4 kolonilerinin jel görüntüsünde 1600 bp civarı bant görülmüştür.

MSA1 #1 ve MSA1 #4 kolonileri amp li 500 ml LB Broth sıvı besiyerine ekimi yapılarak GeneALL Plazmid Midi Prep kit ile izolasyonları yapılmıştır. M13 R primeri ile sekansı kurularak MSA1#4 geninin yerinin doğruluğu tespit edilmiştir.(URL-1)



Fotoğraf 3.6.Elektroforez jelde yürütülen MSA geni bantları

Sekanslamaiçin sekans PCR ı kurulur. Bunun için aşağıda belirtilen cihaz kullanılır

Model No: Bio-RAD T100 Thermal Cycler

Serial No: 621BR07961

Sekans PCR:

Cycle sequencing PCR mix: (1 örnek başına alınan miktardır)
BigDye 0.5 µl
5X Sequencing buffer 2 µl
DEPC treated water unto 10 µl
Primer 1 µl
DNA 2 µl

Tablo 3.7.PZR termal döngüsü

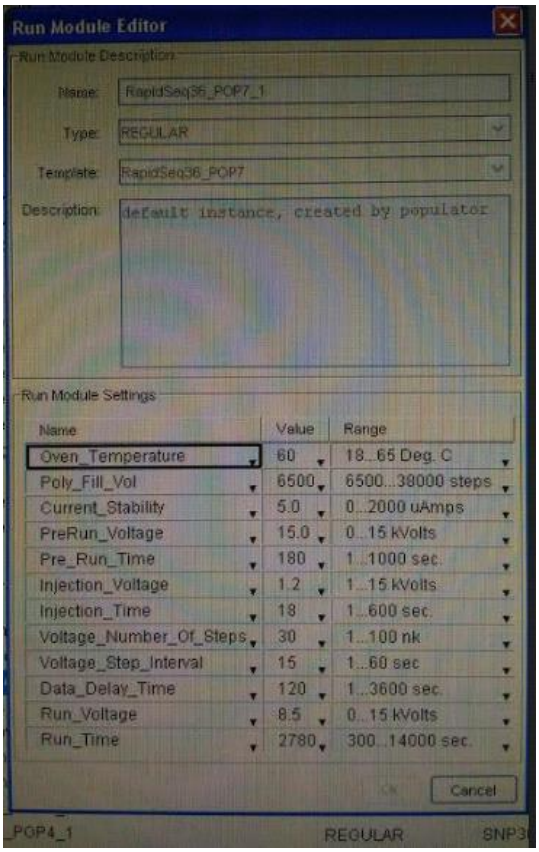
AŞAMA	**SICAKLIK**	**ZAMAN**
Denatürasyon	96°C	1 min
25 Cycles (Bağlanma)	96C 50°C 60°C	10 sec 25 sec 4 min
Sonsuz	4°C	∞

Yukarıdaki malzeme miktarları örnek sayısı ile çarpılarak ependorf tüp içerisine alınarak mix hazırlanır. (Buz üzerinde çalışılır.) Hazırlanan mix örnek sayısı kadar 0,2 µl lik PCR tüpüne 8'er µl alınarak dağıtılır. Üzerlerine saflaştırılan PCR ürününden (DNA) 2 şer µl alınıp pipetaj yapılarak eklenir. Daha sonra örnekler sekans programında Thermal Cycler' a yerleştirilir.

3.2.3.6.Sekans PCR örneğinin saflaştırılması

ZR-96 DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research Corp.) Pürifiye edilmiştir. Pürifiye sekans ürünlerinin kapiller elektroforez işlemi ise, ABI 3130 (Applied Biosystems Inc.) kapiller elektroforez cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Sekans Cihazı Markası: Sekans Cihaz Markası: , ABI 3130 (Applied Biosystems Inc.) kapiller elektroforez cihazı kullanılarak yapılmıştır.



Fotoğraf 3.7. SnapGene sekanslama programı görüntüsü

Sekanslama yaptığımız örnek SnapGene programında sekansı açılır.

3.2.4. P22, İzolasyonu ve Klonlanması

Çalışmada kullanılan P22geni https://www.ncbi.nlm.nih.gov adresinde yer alan ve tam genomda yer alan CP000910.1 2966462-2967028*Renibacterium*

*salmoninarum*ATCC 33209 kaydından elde edilmiştir. İlgili genin dizilimi Tablo 3.8.'de verildiği gibidir.

Tablo 3.8.*P22 gen dizilimi*

GTCAAGCTTCTAATAGATCTTAATATTAAACCATTCCCGGAAGAGTGTGCCTTTA
AACTCGTAATGTGCAGTTTTTCCATTTTTGCAGTAAGTAACTACGGAGGGCAGAT
TTGTAGTGTTCCAGCCATTTCCGTCCACTTGTCGGTAATCGTAAGAGGCATAATC
CATGATCTCTGGAATCCACTGCTTCTGTTTTGTAGAAGAGGAGTACATCGCGGTA
TAGCCCGCCTGATTCATCAATAAACTTGAAGGCGGGTAGCTACTGTTGTTAGAGT
AAGGCCTAATATATGCAGTGAGTTTCTCCGATATTTTTAGCCCTAACTCCCCCAA
ATCATAGAGATTGCTTGCTTGGTTGAGCGTAAAGGTTATATTTTCGCGTATAAGC
CTCCCACCGTTAGTGAATGGGTAGTTATCTACCACAAAGTCAGAAGTGTTCTCCC
AGGCATAATTATTATATTGAACATATTCTGCACACTCACCATAGCCACCTACGGA
ATTCTCAGCTGAAGCTGGGGCGGCTAAGCCAAGCGCTGAAAAAGATACCAGTGC
GACCAGGGAGACTAATCTTTTAATCAAGGATCCTTAGTCAAGCTTCTAATAGATC
TTAATATTAAACCATTCCCGGAAGAGTGTGCCTTTAAACTCGTAATGTGCAGTTT
TTCCATTTTTGCAGTAAGTAACTACGGAGGGCAGATTTGTAGTGTTCCAGCCATT
TCCGTCCACTTGTCGGTAATCGTAAGAGGCATAATCCATGATCTCTGGAATCCAC
TGCTTCTGTTTTGTAGAAGAGGAGTACATCGCGGTATAGCCCGCCTGATTCATCA
ATAAACTTGAAGGCGGGTAGCTACTGTTGTTAGAGTAAGGCCTAATATATGCAG
TGAGTTTCTCCGATATTTTTAGCCCTAACTCCCCCAAATCATAGAGATTGCTTGC
TTGGTTGAGCGTAAAGGTTATATTTTCGCGTATAAGCCTCCCACCGTTAGTGAAT
GGGTAGTTATCTACCACAAAGTCAGAAGTGTTCTCCCAGGCATAATTATTATATT
GAACATATTCTGCACACTCACCATAGCCACCTACGGAATTCTCAGCTGAAGCTG
GGGCGGCTAAGCCAAGCGCTGAAAAAGATACCAGTGCGACCAGGGAGACTAAT
CTTTTAATCAAGGATCCTTA

3.2.4.1. PZR kurulumu (P22)

Bu aşamada primerlerin bağlanma sıcaklıklarına göre PZR yapılmıştır. Bu işlem için NEB Q5-High Polymerase with Standart Q5 Buffer M0491S ve enzimi kullanılır. Örnek sayısı ile aşağıdaki miktarlar çarpılarak mix hazırlanır. Hazırlanan mixden her bir tüpe eşit miktarda dağıtım yapılır ve üzerine DNA eklenir. PCR şartları Thermal cycle da ayarlanarak PZR kurulur.

Tablo 3.9.*PZR prosedürü*

DNA	4 µl
5X Q5 Buffer	5 µl
10 mM dNTPs	0.5 µl
P22 Ileri Primer (10 uM)	1 µl
P22 Geri Primer (10uM)	1 µl
***Q5* Polymerase**	0,25 µl
Steril double distile su	13.25 µl

Tablo 3.10. *PZR termal döngüsü*

AŞAMA	**SICAKLIK**	**ZAMAN**
Denatürasyon	98 °C	2 dakika
40 Cycles (Bağlanma)	98°C 54°C 72°C	30 saniye 30 saniye 1.5 dakika
Uzama	72°C	10 dakika
Sonsuz	4°C	

3.2.4.2.P22 geni primer dizileri:

Tablo 3.11. *P22 geni primer dizileri*

Gen	DİZİLİM (5'→3')
P22 İleri	**CTAATAGATCTTAATATTAAACCATTCCC**
P22 Geri	**TTGATTAAAAGATTAGTCTCCCTG**

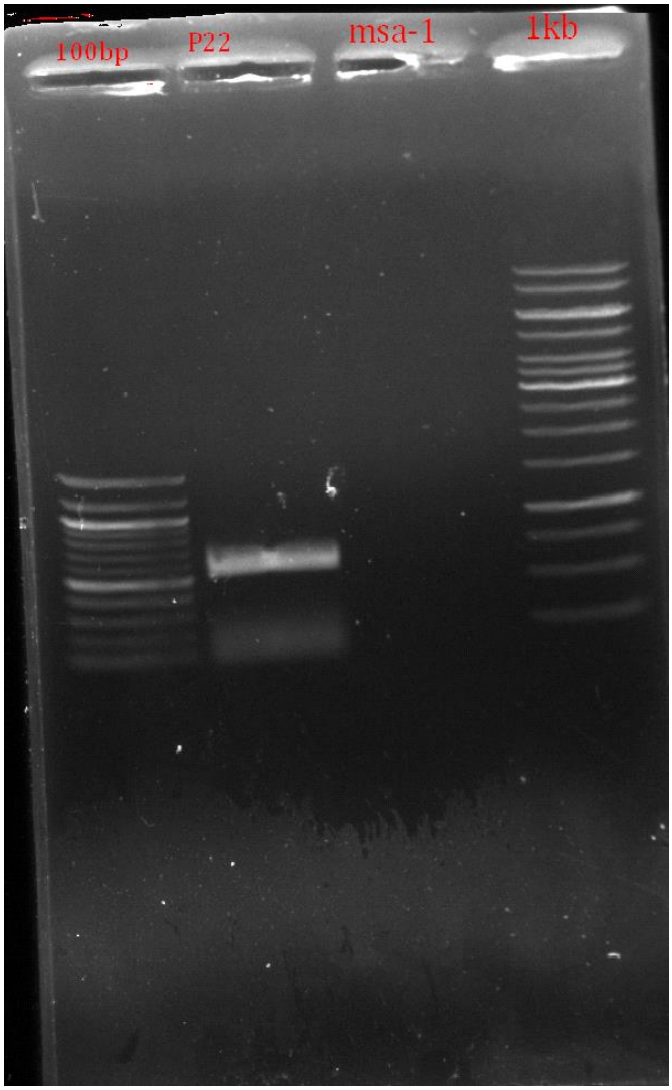
Tablo 3.12.*PZR Kurulumu*

PZR	**25 µl reaksiyon X 4 = 100 µl**
DNA	4 µl
5X Q5 Buffer	5 µl
10 mM dNTPs	0.5 µl
P22 İleri Primer (10 uM)	1 µl
P22 Geri Primer (10uM)	1 µl
***Q5* Polymerase**	0,25 µl
Steril double distile su	13.25 µl

Tablo 3.13.*PZR termal döngüsü*

AŞAMA	**SICAKLIK**	**ZAMAN**
Denatürasyon	98 °C	**2 dakika**
40 Cycles (Bağlanma)	98°C 54°C 72°C	**30 saniye** **30 saniye** **1.5 dakika**
Uzama	72°C	**10 dakika**
Sonsuz	4°C	

Reaksiyon sonunda PZR ürünü %0.7 lik jele yüklenerek geri kazanıldı. Bu işlem Macherey-Nagel marka Gel Extractıon kiti protokolüne göre yapılmıştır.



Fotoğraf 3.8. P-22 bant oluşumu

3.2.4.3.P22 A- tailing

A-Tailing protokol

Tablo 3.14.*P22 A- tailing protokolü*

Saf DNA parçası	7.0 µl
10x Tag Buffer Mg-Free	1 µl
$MgCl_2$	1 µl
dATP	0.2 µl
Tag DNA Polimeraz	1 µl
	10.2 µl

72°C de 25 dakika inkübasyona bırakılmıştır ve sonrasında hemen buza konmuştur.

3.2.4.4. Ligasyon (pGEM-T easy vektör ile)

Ligasyon işlemi için Promega T-Cloning Easy Vektör kiti kullanılmıştır ve linkte bulunan ligasyon protokolü uygulanmıştır.(URL-2)

3.2.4.5. Transformasyon

Ligasyon ürünü ve M15 compotent cell ile transformasyon işlemi yapılmıştır.

10 µl ligasyon ürünü + 90 µl M15 Compotent hücre ependorf tüpe alınır. Sonrasında sırasıyla

1. 30 dakika buzda bekletilir

2. 42 °C de heat shock ta 45 saniye inkübe edilir.

3. hemen buza alınarak 2 dakika bekletilir.

4. İçerisine 100 µl C-Medıum besiyeri eklenir

5. 37 °C de çalkalamalı etüvde 45 dakika inkübasyona bırakılır.

6. İnkübasyon sonunda AMP içeren LB Agar plağına X-GAL ve IPTG eklenir, sonrasında üzerine transformasyon ürünü ekilir.

7. Bakteri ekilen plak 37 °C de etüvde bir gece inkübe edilir.

Plaktan seçilen beyaz kolonilerden M13 koloni PCR kurulur.

3.2.4.6. M13 Koloni PZR

10 X Taq Buffer	1 µl
dNTP	0.2 µl
M13 Forward	0.2 µl
M13 Reverse	0.2 µl
Taq DNA Polimeraz	0.05 µl

ddH2O 6.35 µl

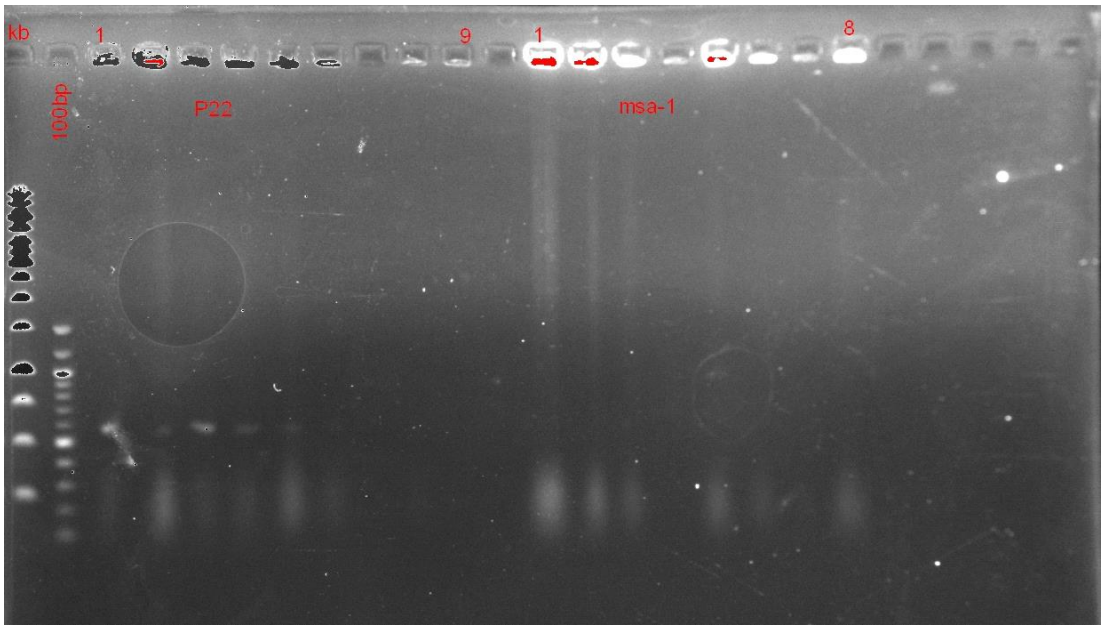
DNA 2 µl

10 µl

DNA beyaz koloniler seçilerek 2 µl depc ile sulandırılmıştır.

P22#1, P22#2, P22#3, P22#4 kolonilerinin jel görüntüsünde 700 bp civarı bant görülmüştür.

P22#1 ve P22#3 kolonileri amp li 500 ml LB Broth sıvı besiyerine ekimi yapılarak GeneALL Plazmid Midi Prep kit ile izolasyonları yapılmıştır. M13 R primeri ile sekansı kurularak genin doğruluğu tespit edilmiştir.(URL-3)



Fotoğraf 3.9.P 22 ve MSA bant dizilimleri

Sekanslamaiçin sekans PCR ı kurulur. Bunun için aşağıda belirtilen cihaz kullanılır

Model No: Bio-RAD T100 Thermal Cycler

Serial No: 621BR07961

Sekans PCR:

Cycle sequencing PCR mix: (1 örnek başına alınan miktardır)
BigDye 0.5 µl

5X Sequencing buffer 2 µl

DEPC treated water unto 10 µl

Primer 1 µl

DNA 2 µl

Tablo 3.15. *PZR döngüsü*

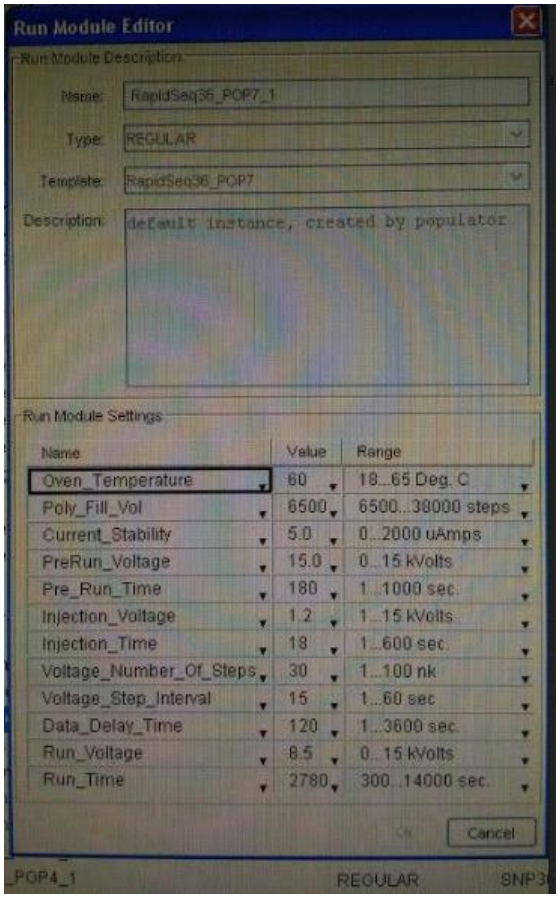
AŞAMA	**SICAKLIK**	**ZAMAN**
Denatürasyon	96°C	1 min
25 Cycles (Bağlanma)	96C 50°C 60°C	10 sec 25 sec 4 min
Sonsuz	4°C	∞

Yukarıdaki malzeme miktarları örnek sayısı ile çarpılarak ependorf tüp içerisine alınarak mix hazırlanır. (Buz üzerinde çalışılır.) Hazırlanan mix örnek sayısı kadar 0,2 µl lik PCR tüpüne 8'er µl alınarak dağıtılır. Üzerlerine saflaştırılan PCR ürününden (DNA) 2 şer µl alınıp pipetaj yapılarak eklenir. Daha sonra örnekler sekans programında Thermal Cycler' a yerleştirilir.

3.2.4.7. Sekans PCR örneğinin saflaştırılması

ZR-96 DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research Corp.) Pürifiye edilmiştir. Pürifiye sekans ürünlerinin kapiller elektroforez işlemi ise, ABI 3130 (Applied Biosystems Inc.) kapiller elektroforez cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Sekans Cihazı Markası: Sekans Cihaz Markası: ABI 3130 (Applied Biosystems Inc.) kapiller elektroforez cihazı kullanılarak yapılmıştır.



Fotoğraf 3.10. SnapGene programı ekran görüntüsü

Sekanslama yaptığımız örnek SnapGene programında sekansı açılır.

3.2.5. İmmunolojik Analizler

3.2.5.1. Bağışıklık ile ilgili gen sunumlarının RT-PCR ile belirlenmesi

3.2.5.1.1. Total RNA izolasyonu

Çalışmada toplanan böbrek örneklerinden Total RNA örnekleri BIOLINE kit (ISOLATE II RNA Mini Kit) kullanılarak üretici firma protokollerine göre yapılmıştır. Kısaca, yaklaşık 30 mg kas, böbrek, dalak ve bağırsak örnekleri RNA izolasyonu için alınmıştır. Örnekler 600 µl Trizol içerisinde homojenizatör kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen örneklerden üretici protokolüne göre santrifüj adımları uygulanarak Total RNA elde edilmiştir. Elde edilen RNA'nın saflığı ve kalitesi Multiscan GO (Thermo Scientific, USA) kullanılarak tespit edilmiştir. Miktarı belirlenen örnekler 15 ng/µl olacak şekilde seyreltilerek cDNA hazırlamada kullanılmıştır. Örnekler kullanılmadıkları esnada -80°C'de saklanmıştır.

3.2.5.1.2. cDNA sentezi

Seyreltilen RNAlar genomic DNA'nın uzaklaştırılması için 1 U DNase I (BIOLINE) ile muamele edilmiştir. İzole edilen Total RNAlar'dan BIOLINE kit (SensiFAST TM cDNA Synthesis Kit) kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Bu işlemde 1µg seyreltimiş ve genomil DNA'sı uzaklaştırılan RNA, 15 pmol/µL oligo dT primer, 4 µL 5x TransAmp Buffer, 1 µL of Reverse Transcriptase, oligo dT primer ve 20 µL nükleaz içeremeyen su eklenerek reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Reaksiyon karışımıthermal cycler (ThermoFischer Scientific) içerisinde 25 °C'de 10 dakika tavlama, 42 °C'de 15 dakika ters transkripsiyon ve 85 °C'de 5 dakika inaktivasyon aşamalarından geçirilerek cDNA sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA'nın saflığı ve kalitesi Multiscan GO (Thermo Scientific, USA) kullanılarak tespit edilmiştir. Miktarı belirlenen örnekler 20 ng/µl olacak şekilde seyreltilerek gen sunumlarının belirlenmesinde kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5.1.3.Quantitave RT-PCR

cDNA sentezinden sonra, qRT-PCR analizi Rotor-Gene qPCR belirleme sistemi (Qiagen, Germany) vasıtasıyla SensiFAST SYBR No-ROX Kit PCR kit (BIOLINE, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Genlere özel spesifik primerler kullanılmıştır (Tablo 3.16).

Tablo 3.16. *Çalışmada kullanılan primerler*

Genler	Primer Sekansları	Baz Çifti	Referanslar
β-Actin	F5′ ATGGAAGGTGAAATCGCC 3′ R5′ TGCCAGATCTTCTCCATG 3′	186	J. Sigh, T. Lindenstrom, K. Buchmann, 2004
IL-1β	F5′ ACCGAGTTCAAGGACAAGGA 3′ R5′ CATTCATCAGGACCCAGCAC 3′	181	E. Awad, W.J. Mitchell, B. Austin,2011
IL-6	F5′ ACTCCCCTCTGTCACACACC 3′ R5′ GGCAGACAGGTCCTCCACTA 3′	91	J.K. Chettri, M.K. Raida, L. Holten-Andersen, P.W. Kania, K. Buchmann,2011
IL-8	F5′ ACAGACAGAGAAGGAAGGAAAG3′ R5′ TGCTCATCTTGGGGTTACAGA 3′	162	E. Awad, W.J. Mitchell, B. Austin,2011
IL-10	F5′ CGACTTTAAATCTCCCATCGAC 3′ R5′ GCATTGGACGATCTCTTTCTTC 3′	70	K. Komatsu, S. Tsutsui, K. Hino, K. Araki, Y. Yoshiura, A. Yamamoto, O. Nakamura, T. Watanabe,2009
IL-12 Beta	F5′ GAACCCAGACGACGATGATT 3′ R5′ GTTCAAACTCCAACCCTCCA 3′	190	K. Komatsu, S. Tsutsui, K. Hino, K. Araki, Y. Yoshiura, A. Yamamoto, O. Nakamura, T. Watanabe,2009

Tablo 3.16. Devamı

TGF- β	F5′AGATAAATCGGAGAGTTGCTGTG 3′ R5′ CCTGCTCCACCTTGTGTTGT 3′	275	E. Awad, W.J. Mitchell, B. Austin,2011
TNFα	F5′ CAAGAGTTTGAACCTTGTTCAA 3′ R5′ GCTGCTGCCGCACATAGAC 3′	181	A. Panigrahi, V. Kiron, S. Satoh, I. Hirono, T. Kobayashi, H. Sugita, J. Puangkaew, T. Aoki,2007
COX-2	F5′ GGGCTTTGACATCCTCAACA 3′ R5′ CATCGGACAAGAACCCTTGA 3′	73	J.K. Chettri, M.K. Raida, L. Holten-Andersen, P.W. Kania, K. Buchmann,2011
IgM	F5′ AGTTCCACAGCGTCCATCTG 3′ R5′ TACTGGGCCATGCATCTCTG 3′	399	J. Sigh, T. Lindenstrom, K. Buchmann,2004
iNOS	F5′ CGAATGGAGCTATCGTCAGACC 3′ R5′ GGAACGTTGTGGTCATAATACC3′	234	J. Sigh, T. Lindenstrom, K. Buchmann,2004
MHC II	F5′ ATGTCGATGCCAATTGCCTTCTA3′ R5′ TGTCTTGTCCAGTATGGCGCT 3′	336	J. Sigh, T. Lindenstrom, K. Buchmann,2004

qRT-PCR karışımı 12.5 µL of 2× SYBR Green Master Mix, 0.1 µg of şablon DNA, 0.4 µM spesifik genlerin ileri ve geri primerleri (IL-1β, IL-8, IL-10, IL-12, TGF-β, TNF-α, COX2, IgM, iNOS, MHC2 ve referans olarak β-aktin) ve 20 µL nükleaz içermeyen su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. qRT-PCR adımları sırasıyla: 95 °C'de 5 saniye denaturasyon sonrasında tavlama ve uzatma safhalarını içeren 60 °C'de 10

saniye tutulmuş ve bu işlem 45 döngü olarak yapılmıştır. Bunun akabinde örnekler 95 °C denatüre edilmiş ve 65 °C'de tutulmuştur. Floresan sinyaller 530 nm dalga boyunda 60 °C'den 95 °C'ye her 1 saniyede 0.5 °C değişimde eritme eğri analizini uygulamak için ölçülmüştür qRT-PCR her örnekleme aşamasında her akvaryumdan alınan 3 örneğin her birinden 3 tekerrür olacak şekilde okumaları yapılmıştır. ΔC_Tve $\Delta\Delta C_T$ değerleri aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.

ΔC_T = $C_T$hedef gen - $C_T$referans gen

$\Delta\Delta C_T$ = ΔC_TUygulama yapılmış örnek - ΔC_Tkontrol örneği

Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001) .

3.2.5.2. Oksidatif radikal üretimi

Oksidatif radikal üretimi (ORÜ) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Siwicki ve Anderson, 1993). Kısaca, balıklardan alınan kan örneklerinden 0,1 ml örnek % 0,2 ORS içeren 0,1 ml solüsyon ile karıştırılmıştır ve karışım 25 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Karışım içerisinden 50 µl süspansiyon alınmış ve bunun üzerine 1,0 ml N,N-dimethil formamid eklenmiş ve karışım 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra bu karışım ayrı bir tüp içerisine alınmış ve 540 nm optik yoğunlukta N,N-dimethil formamid kör örneğine karşı okunmuştur. Sonuçlar 4 ile çarpılarak tespit edilmiştir.

3.2.5.3. Lizozim aktivitesi (LYS)

Plazmadaki lizozim aktivitesi Ellis (1990)'in türbidimetrik yöntemi değiştirilerek belirlenmiştir. Buna göre 100 µl *Micrococcus lysodeikticus* süspansiyonu (0,02 g *Micrococcus lysodeikticus* bakteri hücresi, Sigma-Aldrich, 100 ml fosfat tamponlu tuz



Fotoğraf 3.11. Balıklara *R. salmoninarum* enjeksiyonu

çözeltisi içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır) 10 µl balık plazmasıyla 2 tekerrürlü olacak şekilde karıştırılmıştır. 530 nm'deki absorbans değerlerinde meydana gelen değişimler 0 ve 4. dakikalarda ölçülmüştür.

3.2.5.4. Myeloperoksidaz (MPO)aktivitesi

Myeloperoksidaz aktivitesi Sahoo vd., (2005)'nın yönteminde ufak değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre numunelerden 10'ar µl serum alınarak

kuyucuklara 2 tekerrürlü olarak aktarılmıştır. Ca^{+2} veya Mg^{+2} içermeyen Hank'in Denge Tuz Çözeltisi (HBSS)'nden 125 µl kuyucuklara eklenmiştir. Ardından 35 µl TMB substrat solüsyonu (1 tablet 3,3 ', 5,5'-Tetrametilbenzidin Dihidroklorür, Sigma-Aldrich, 10 ml 0.05 M fosfat-sitrat tamponu içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır) ve 35 µl 5 mM taze hidrojen peroksit (Sigma-Aldrich) ilave edilmiştir. Absorbans değerlerindeki değişimler 0 ve 4.5'inci dakikalarda 450 nm'de kaydedilmiştir. MPO aktivitesi IU/ml olarak verilmiştir. IU: 0.5 ml'lik reaksiyon karışımındaki aborbans değerininin dakikada 0.001 artması için gereken enzim miktarı olarak tanımlanır (ΔA 450 / min / ml).

3.2.6. Kontrol Testi

Çalışmada ilkolarak balıkalrın *R. salmoninarum* patojenine karşı LD_{50} dozları belirlendi. Daha sonra çalışmanın 30. gününde balıklar belirlenen doz ile enfekte edildi ve 30 gün boyunca balıkların yaşama oranları kaydedildi.

3.2.7. Deneyin Kurgulanması



Fotoğraf 3.12. Bakteri verilmiş balıklar

Balıkların yaşama oranları hususundaki değişimlerin önem arz ettiği bu çalışmada ilk olarak, çalışmada kullanılacak olan balıklar iki hafta boyunca aynı tip yemle beslenerek adaptasyon sürecine alınmış ve çalışma başlamadan önce ölen balıklar deneme ortamından uzaklaştırılmıştır ve yerine aynı gramajda yenileri eklenmiştir. Balıklar çalışmada kullanılan 9 adet 100 L'lik akvaryuma 40 adet stoklanmıştır. DNA klonu oluşturulan MSA1 ve P22 genleri balıklar 150ng/µl/balık olacak şekilde balıklara intraperitonel olarak vurulmuştur. Çalışmanın 7 ve 30. günlerinde balıklardan kan ve doku örnekleri alınarakbağışıklıkparametrelerinde meydan gelen değişimler incelenmiş ve buna ek olarak 30. gün sonunda balıklara*R. salmoninarum*patojeni ile kontrol testleri yapılmıştır. Yaşam oranları süregelen 30 gün boyunca tespit edilmiştir.



Fotoğraf 3.13. Balıkların yaşatıldığı oratamda kapalı devre sistem

3.2.8. İstatistiksel Analizler

Deneyde elde edilen bütün verilerin ortalama ve standart sapma (±SE) değerleri Microsoft Office Excel programı yardımıyla hesaplamıştır. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 22 paket programı kullanılmıştır. Veriler ANOVA testine tabi tutulduktan sonra gruplar arasındaki farklılıklar %95 güven aralığı içeresinde Fisher LSD testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışma verilerine göre çalışmanın 7 ve 30. gününde elde edilen immünolojik yanıtlar aşağıda özetlenmiştir. Ayrıca çalışmanın 30. günü uygulanan ve daha sonrasında 30 gün boyunca takip edilen kontrol testi sonuçları da değerlendirilmiştir.

4.1. İmmunolojik Yanıtlar

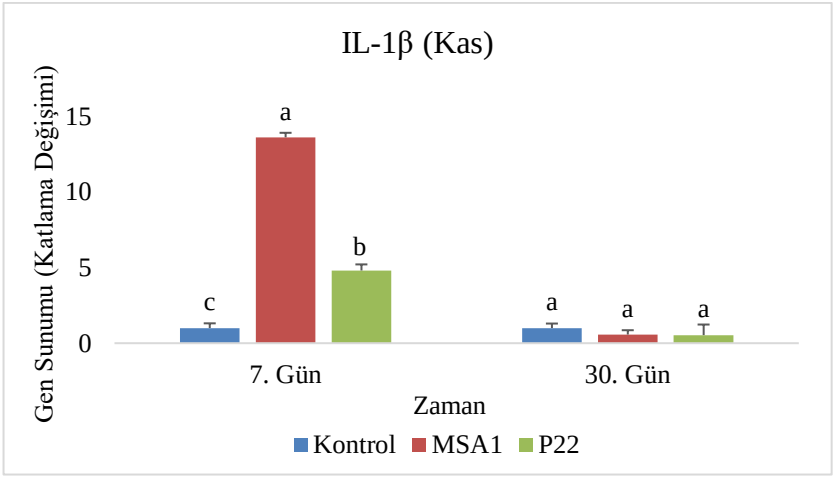
4.1.1. Gen sunumları

Çalışma sonunda elde edilen veriler ışığında balıkların gen sunumlarında meydana gelen değişimler aşağıda açıklanmıştır.

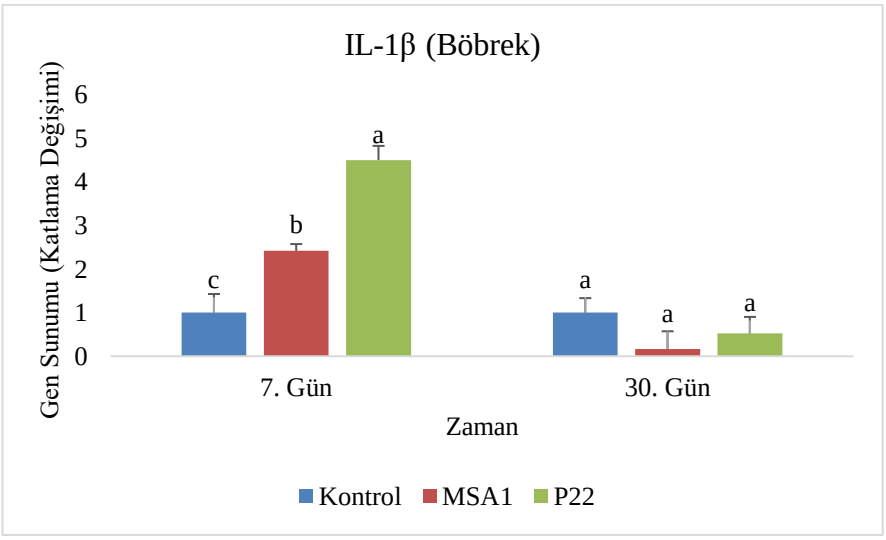
4.1.1.1. IL-1β

Çalışma sonunda balıkların farklı organlarında elde edilen IL-1βgen sunumları Grafik 4.1., 4.2 ve 4.3'te verildiği gibidir. Çalışma sonuçlarına göre, 7. günde MSA1 ve P22 uygulanan grupların kas dokularında IL-1β gen sunumnlarının kontrol gruplarına göre öenmi derecede arttığı gözlenmiştir ($P<0,05$). Bundan farklı olarak çalışmanın 30.gün verileri değerlendirildiğinde tüm deneme gruplarınn kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği ve farklılık oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Grafik 4.2'de böbrekte IL-1β gen ifadeleri özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre yine çalışmanın 7. Gününde MSA1 ve P22 uygulanan gruplarda gen sunumları önemli derecede artış gösterirken bundan farklı olarak 30. gün gruplar arasında bir değişim gözlenmemiştir. Çalışmanın 7. gününde en yüksek IL-1β gen sunumu P22 uygulanan grupta gözlemlenmiştir ($P<0,05$).

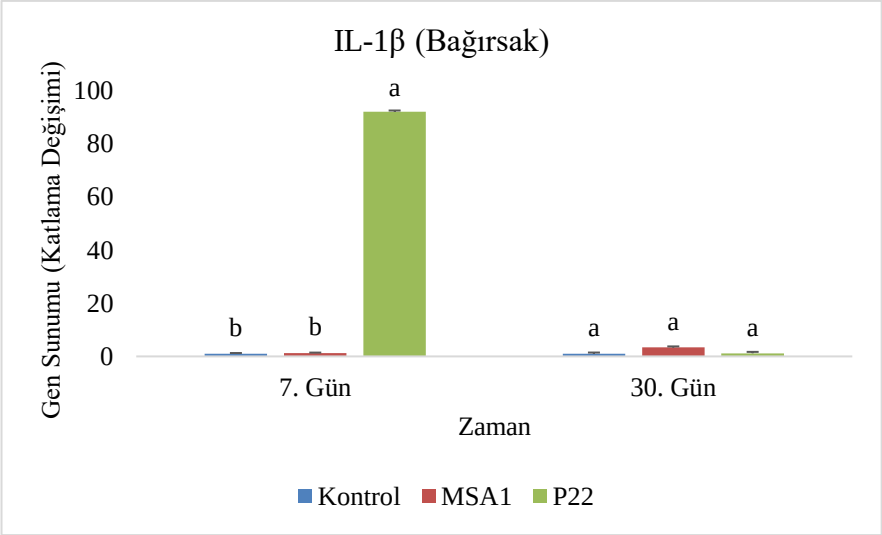


Grafik 4.1. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-1β gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.



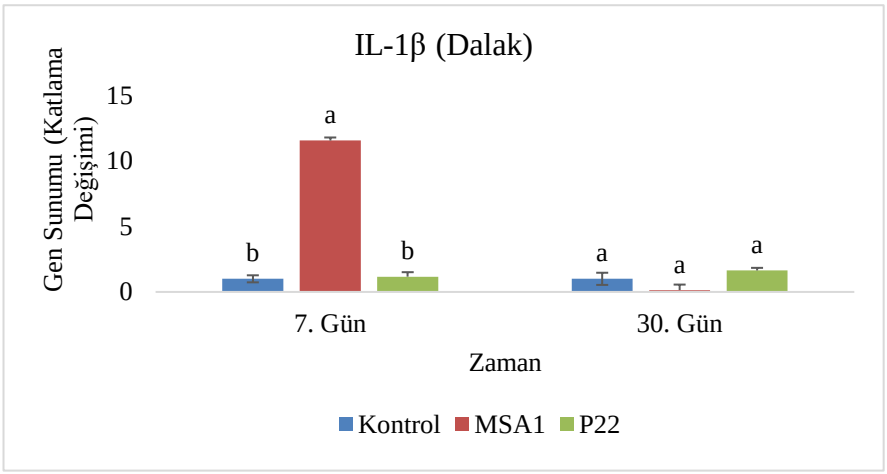
Grafik 4.2. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-1β gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

IL-1β gen sunumları bağırsak dokuları üzerinde değerlendirildiğinde (Grafik 4.3) MSA1 geni ile kontrol grubu arasında bir farklılık gözlenmezken, bundan farklı olarak P22 uygulanan gruplardan IL-1β gen sunumlarında çok öenmli bir artış kaydedilmiştir ($P<0,05$).



Grafik 4.3. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-1β gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

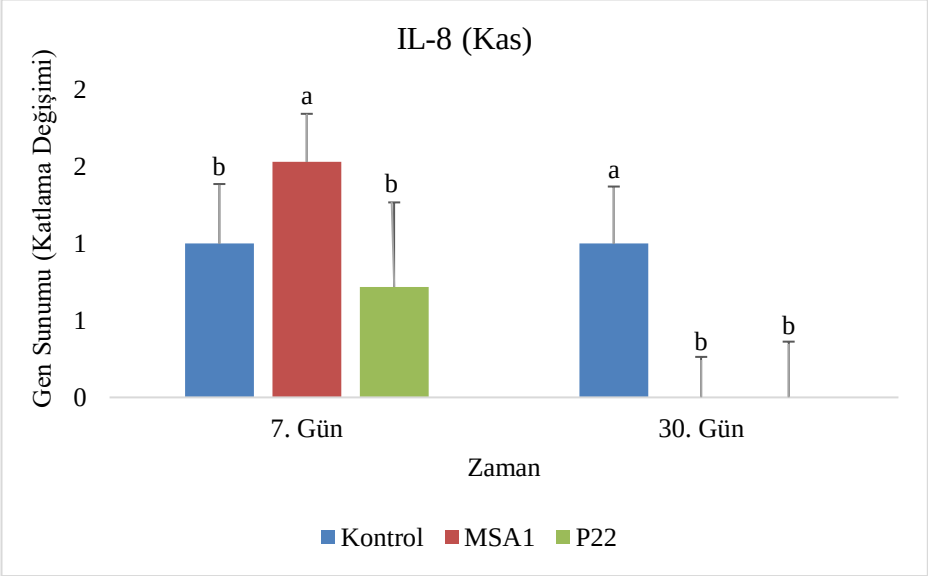
IL-1β gen sunumunun dalaktaki sonuçlarına bakıldığında MSA1 uygulanan grupta 7. gün söz konusu genin diğer gruplara ve günlere göre önemli derecede ifade olduğu tespit edilmiştir (Grafik 4.4). Diğer gen sunumlarına benzer oarak çalışmanın 30.Gününde gruplar arasında değikenlik gözlenmemiştir.



Grafik 4.4. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-1β gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

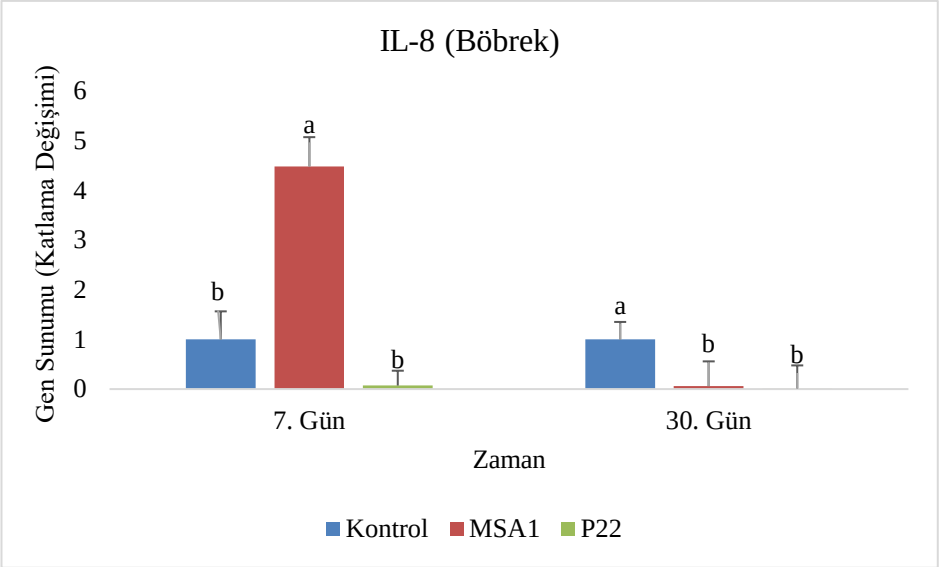
4.1.1.2.IL-8

Çalışma sonuçlarına göre IL-8 gen sunumlarında meydana gelen değişimler Grafik 4.5, 4.6,4.7 ve 4.8'de verilmiştir



Grafik 4.5. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-8 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

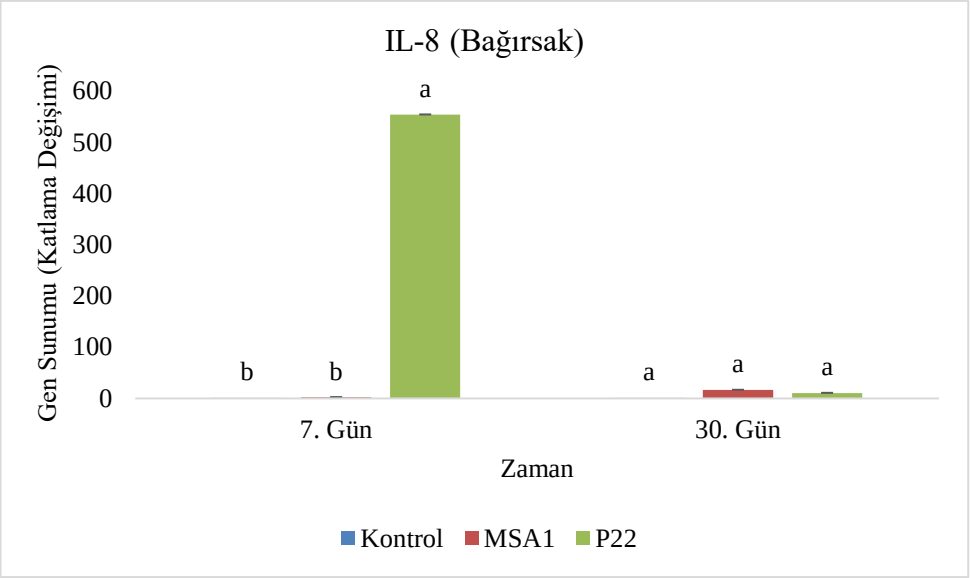
Grafik 4.5'te görüldüğü üzere kas dokularında çalışmanın 7. Gününde MSA1 uygulanan gruplarda artış gözlemlenmişken,P22 ve kontrol grubu arasında bir farklılık tespit edilememiştir. Bununla birlikte 30. günde MSA1 ve P22 uygulanan gruplarda azalma görülmektedir ($P<0,05$).



Grafik 4.6. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-8 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

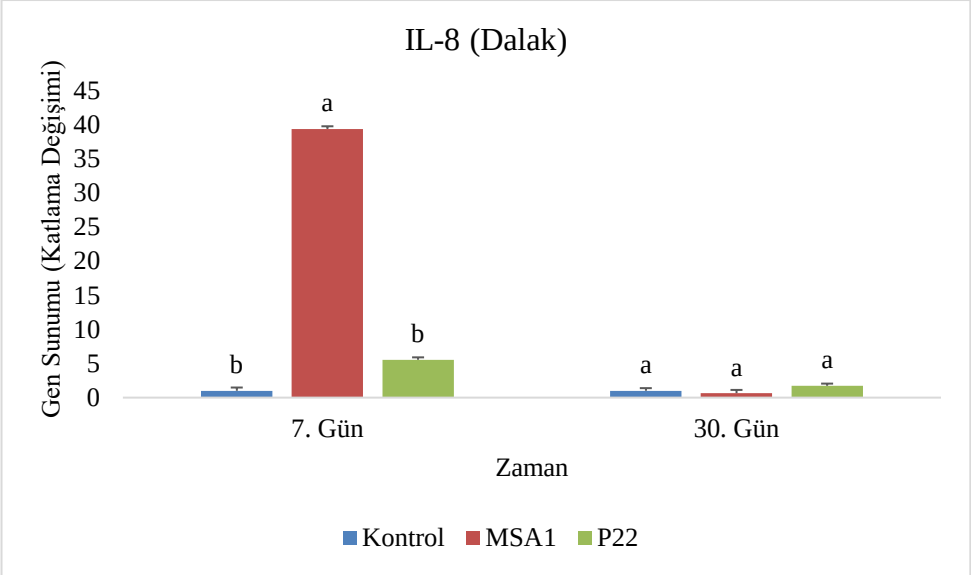
Çalışma sonuçlarına göre böbrek dokularında IL-8 gen sunumlarında meydan gelen değişimler Grafik 4.6'da verilmiştir. Kas dokuları sonuçlarına benzer şekilde, çalışmanın 7. Gününde MSA1 geni uygulana gruplarda IL_8 gen sunmlarında artış gözlenmeiş bununla birlikte P22 ve kontrol grupları arasında farklılık tespit edilememiştir ($P<0,05$). Çalışmanın 30.gününde ise tüm denem gruplarındaki IL-8 gen sunumları kontrol grubuna kıyasla azalma göstermiştir ($P<0,05$).

Bağırsak dokularına ait IL-8 gen sunumları Grafik 4.7'de verilmiştir. Buna göre MSA1 ve P22 gen sunumları değişkenlik göstermezken, P22 geni diğer gruplara göre önemli derecede artış göstermiştir ($P<0,05$). Çalışmanın 30. Gününde ise gruplar arasında herhangi bir değişim tespit edilememiştir ($P>0,05$).



Grafik 4.7. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-8 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

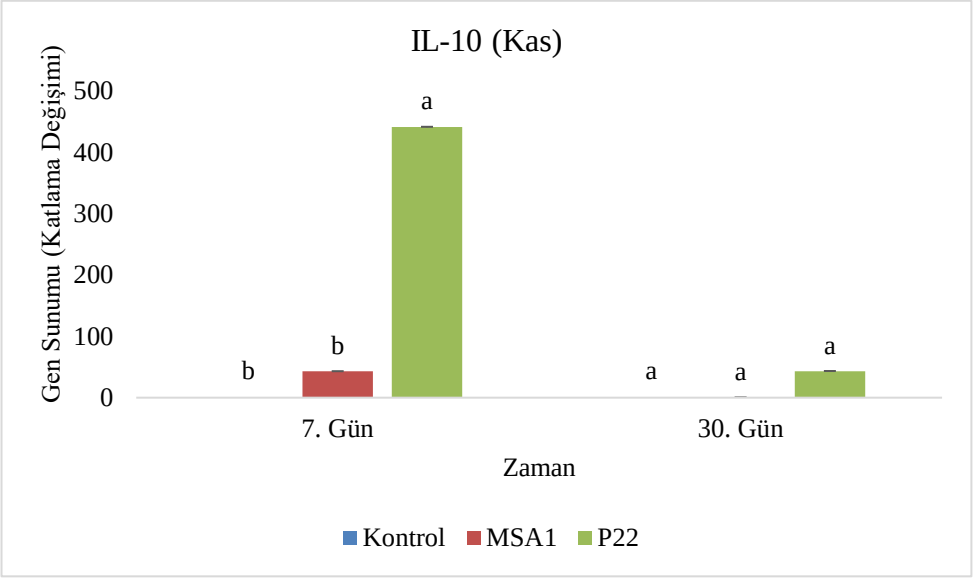
MSA1 uygulanan alabalıklarda IL-8 gen ifadesinin 7. gün dalakta önemli derecede artş göterdiği (P<0,05). Diğer gruplarda ve günlerde herhangibir değişim olmadığı görülmüştür.



Grafik 4.8. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-8 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

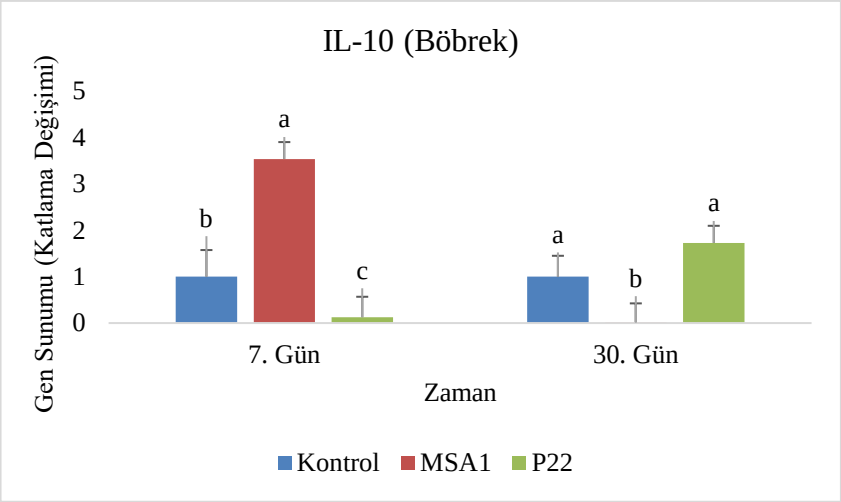
4.1.1.3. IL-10

Araştırma sonuçlarına göre P22 uygulanan gruptaki balıkların kas dokularında 7. gün IL-10 geninin diğer gruplara göre daha çok eksprese olduğu ($P<0,05$) fakat 30. gün gruplar arasında herhangi bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir (Grafik 4.9).



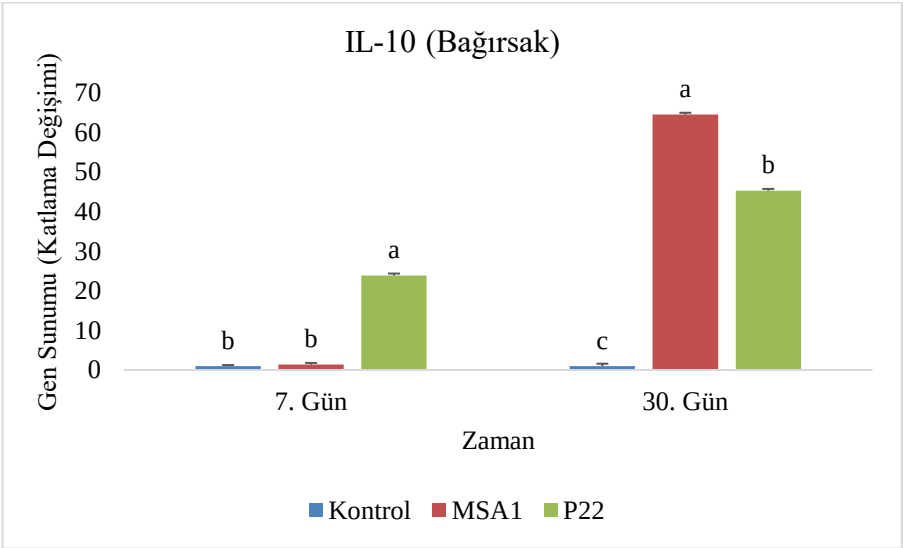
Grafik 4.9. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-10 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

IL-10 geninin böbrekteki sonuçlarına bakıldığında 7. gün en yüksek artışın MSA1 uygulanan grupta gerçekleştiği görülmüştür ($P<0,05$). 30. gündeki değişimler incelendiğinde P22 uygulanan grupta kontrol grubuna göre faklılık görülmezken, MSA1 uygulanan gruba göre artış olduğu görülmüştür ($P<0,05$) (Grafik 4.10).

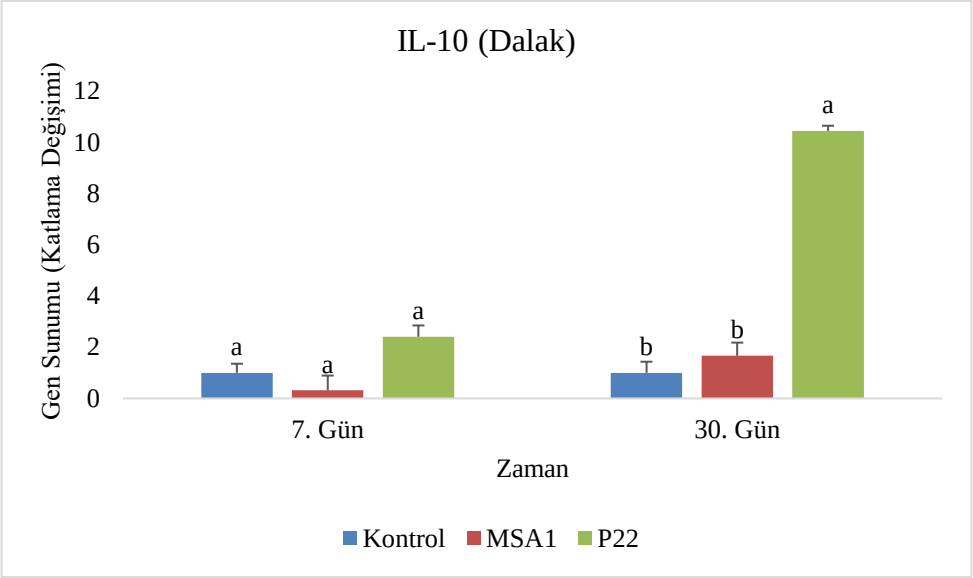


Grafik 4.10. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-10 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

IL-10 geninin bağırsaktaki değerleri kontrol ve MSA1 uygulanan gruplarda 7. günde değişim göstermezken (P>0,05), P22 uygulanan grupta ekspresyonunun artış gösterdiği tespit edilmiştir (P<0,05). 30. gündeki değerler incelendiğinde MSA1 ve P22 gruplarında IL-10 geni ekspresyonunun kontrol grubuna göre artış gösterdiği tespit edilmiştir (P<0,05) (Grafik 4.11).



Grafik 4.11. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-10 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

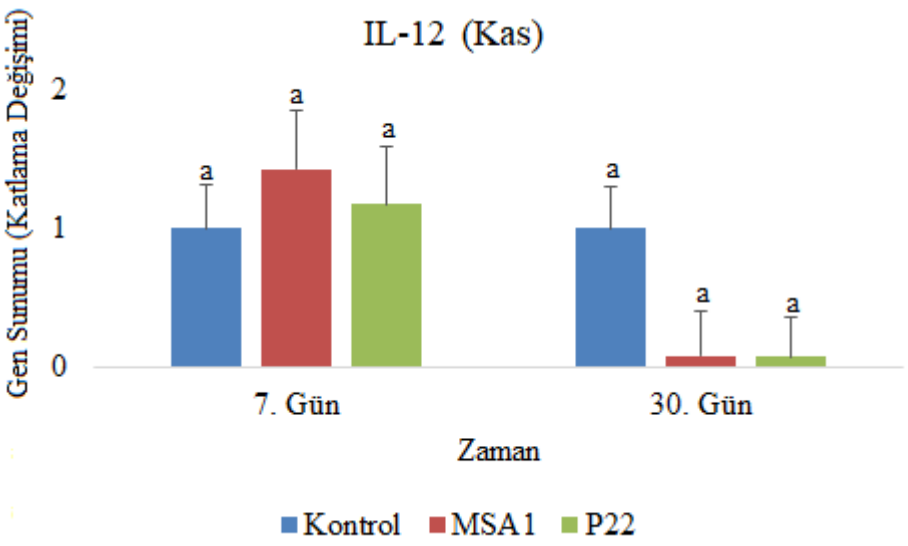


Grafik 4.12. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-10 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

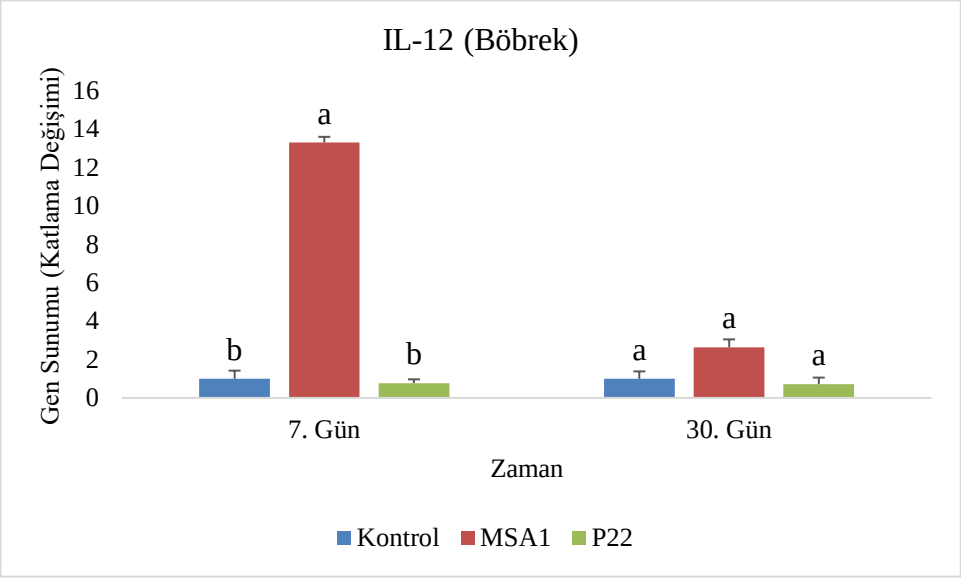
IL-10 geninin MSA1 ve P22 uygulanan gruplarda, dalak için değerleri karşılaştırıldığında sadece P22 geninin 30.gündeki değerinde artış olduğu tespit edilmiş olup ($P<0,05$), bununla birlikte 7. günde P22 grubunda her ne kadar artış görülsede bu artışın istatistiksel açıdan önem teşkil etmediği tespit edilmiştir. P22 aşısının dalakta aşamalı olarak IL-10 geninin ekspresyonunu arttırdığı sonucuna varılmıştır.

4.1.1.4. IL-12

IL-12 kastaki gen sunumu değerleri için MSA1 ve P22 gruplarında 7. ve 30. günlerde herhangibir değişim olmadığı ($P>0,05$) görülmekle birlikte (Grafik 4.13), böbrekteki katlama değişimine bakıldığında sadece 7. günde MSA1 grubunda ilgili gen değerleri için artış söz konusu olduğu görülmektedir ($P<0,05$) (Grafik 4.14).



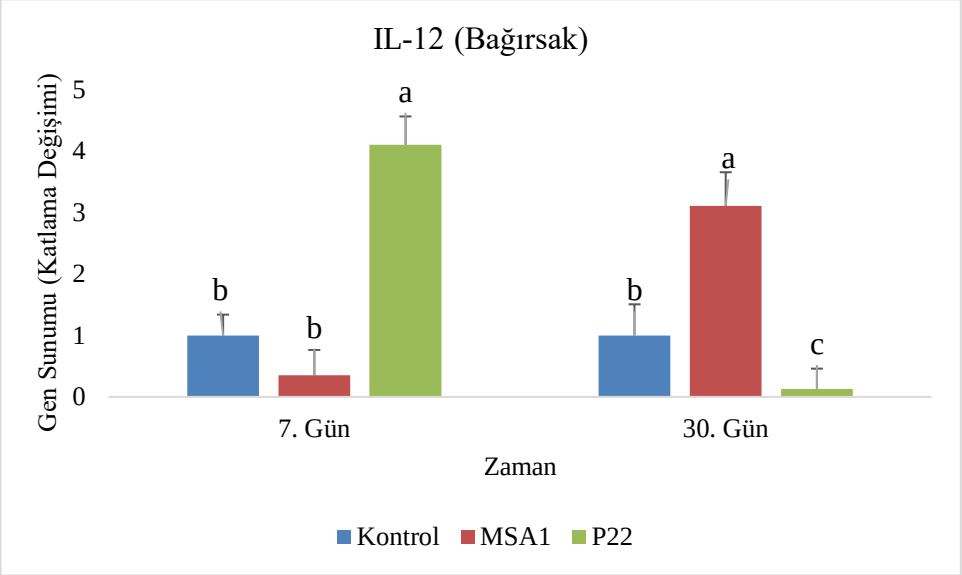
Grafik 4.13. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-12 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.



Grafik 4.14. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-12 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

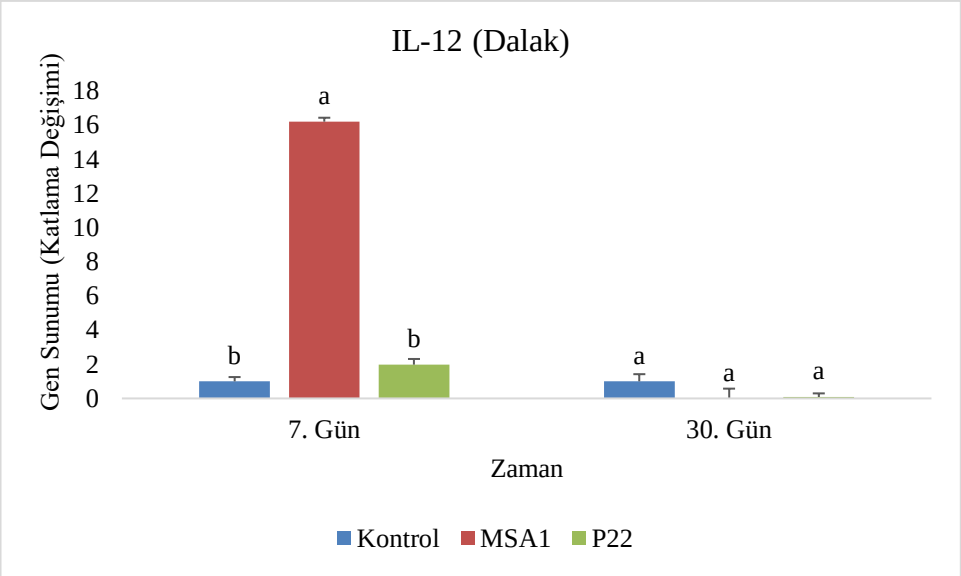
IL-12 gen sunumlarının bağırsak için sonuçlarına bakıldığında 7. gün P22 uygulanan grupta kontrol grubuna ve MSA1 grubuna göre artışı söz konusu iken ($P>0,05$), MSA1 için 30. günde diğer gruplara göre artış söz konusudur ($P<0,05$). Kontrol grubu için 7. ve 30. günler arasında istatistiksel açıdan herhangi bir farklılık görülmezken

(P>0,05), MSA1 uygulanan grubun günlere göre katlama değerinin artış gösterdiği, P22 uygulanan grubun ise katlama değerinin azaldığı görülmektedir (Grafik 4.15).



Grafik 4.15. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-12 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

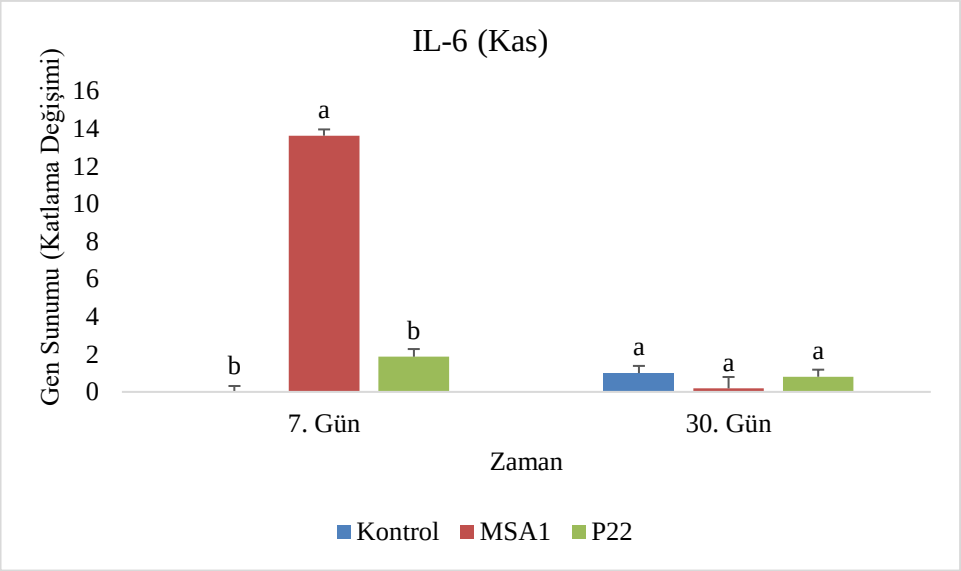
IL-12 geninin MSA1 uygulanan gruptaki dalak için sonuçlarına bakıldığına sadece 7. günde katlama değişiminin artış gösterdiği diğer gruplarda herhangibir farlılık olmadığı ve 7. güne göre de 30. günde MSA1 grubunun değerinin de azaldığı görülmüştür.



Grafik 4.16. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-12 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

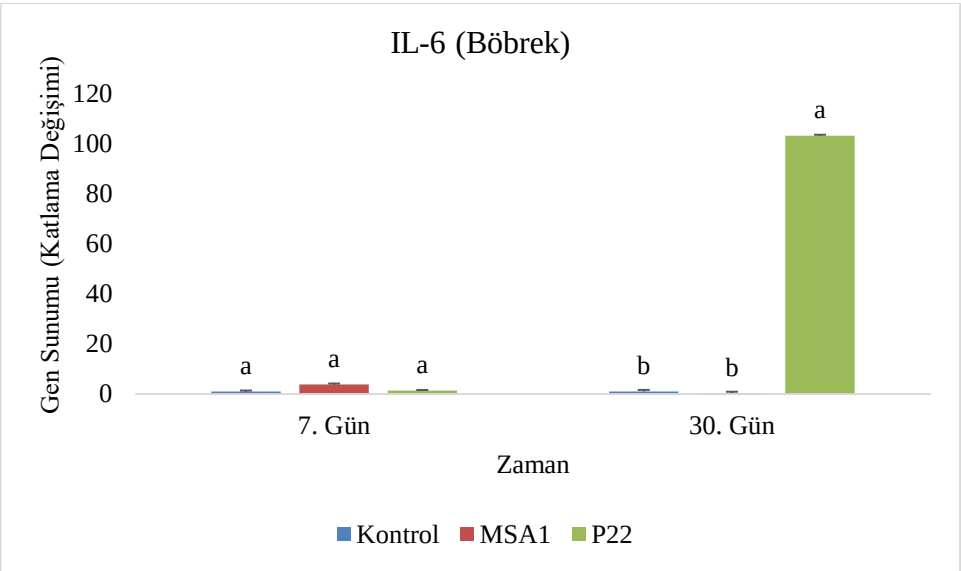
4.1.1.5. IL-6

IL-6 geninin kaslardaki katlama değişimine bakıldığında MSA1 uygulanan grupta IL-12 geninin dalakta gösterdiği sonuca benzer sonuçlar elde edilmiş olup, buna göre 7. gün IL-6 geninin MSA1 uygulanan grupta artış gösterdiği 30. günde ise gen sunumunun katlama değişiminin azaldığı görülmektedir (Grafik 4.17).



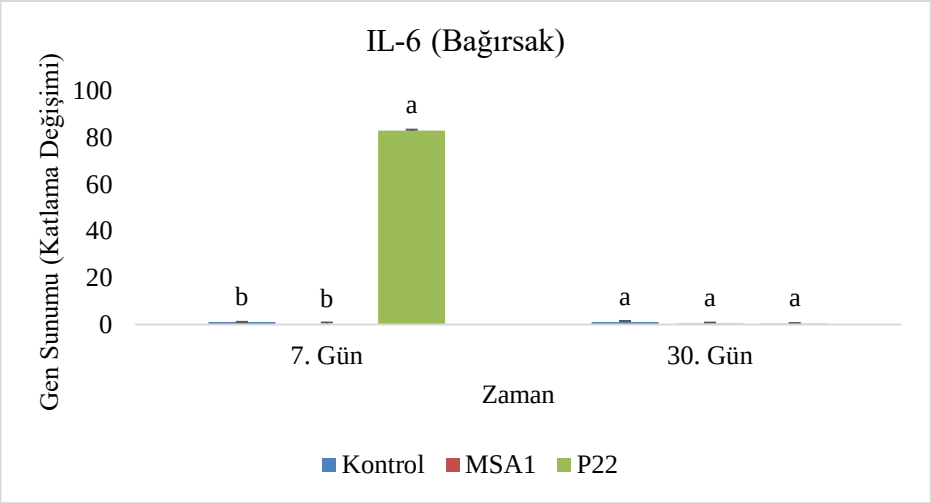
Grafik 4.17. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-6 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

IL-6 geninin böbrekteki ve dalaktaki katlama değişimine bakıldığında sadece P22 uygulanan grupta 30. günde artış görüldüğü diğer gruplarınilgili değerlerinde bir farklılık olmadığı (Grafik 4.18; 4.20) tespit edilmiştir.

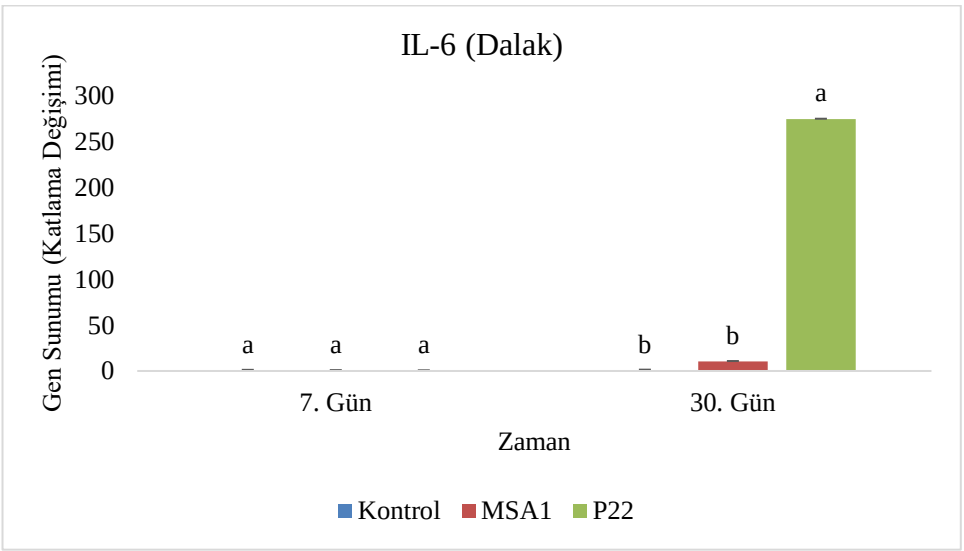


Grafik 4.18. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-6 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

MSA ve P22 uygulanan gruplarda IL-6 değerlerinin bağırsaktaki değişimlerine bakıldığında sadece P22 uygulanan grupta 7. günde artış görülmekte olup, (P<0,05)diğer gruplar arasında herhangi bir farklılık olmadığı ve 30. günde yine gruplar arasında herhangi bir değişim olmadığı tespit edilmiştir (P>0,05) (Grafik 4.19).



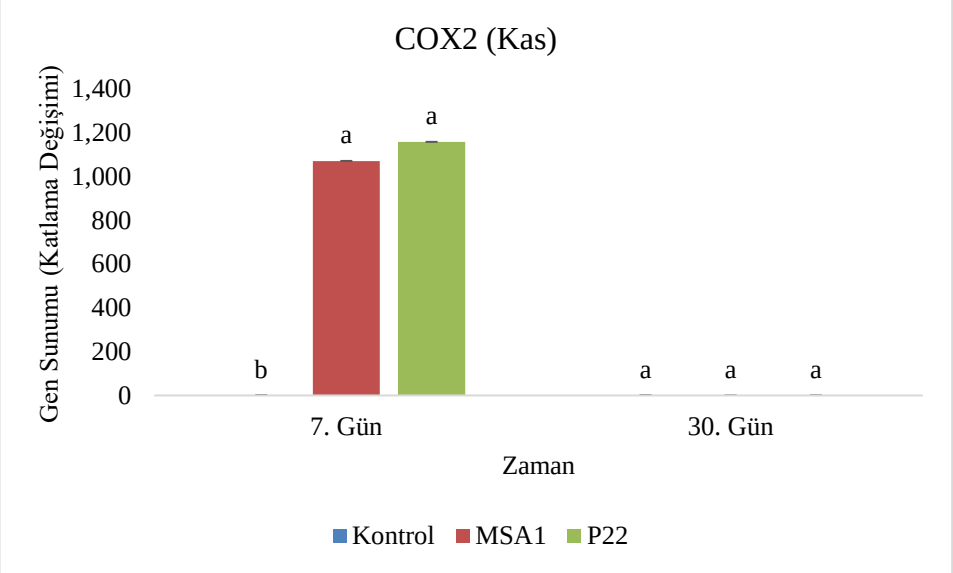
Grafik 4.19. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-6 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.



Grafik 4.20. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IL-6 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

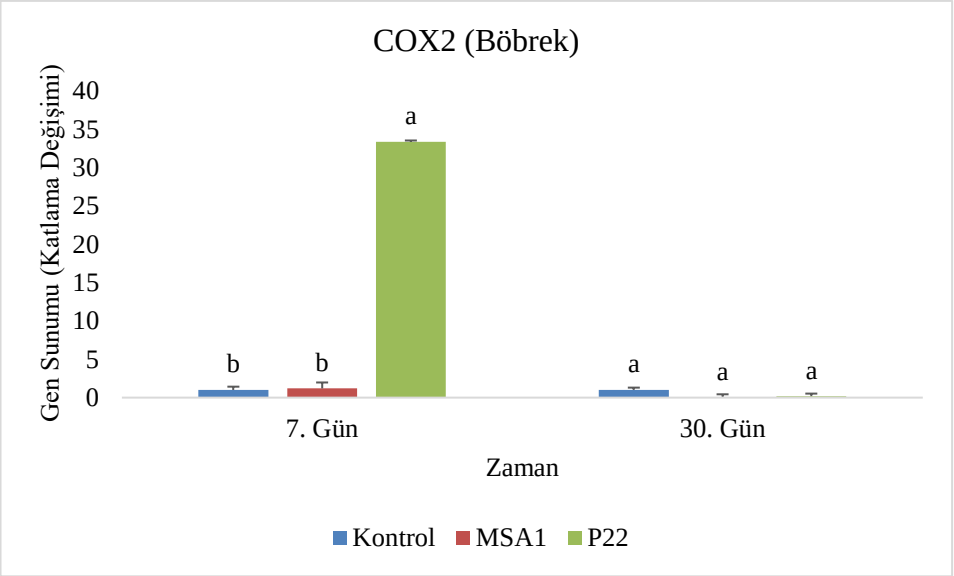
4.1.1.6. COX 2

Gökkuşağı alabalıklarında Cox-2 için araştırma bulgularına göre kastaki Cox-2 gen sunumu katlanma değişimlerinin 7. günde MSA1 ve P22 uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre önemli derecede artış gösterdiği (P<0,05), 30. günde ise bu değerlerin düşüş gösterdiği ve gruplar arasında herhangibir farklılık olmadığı görülmüştür (P>0,05) (Grafik 4.21).

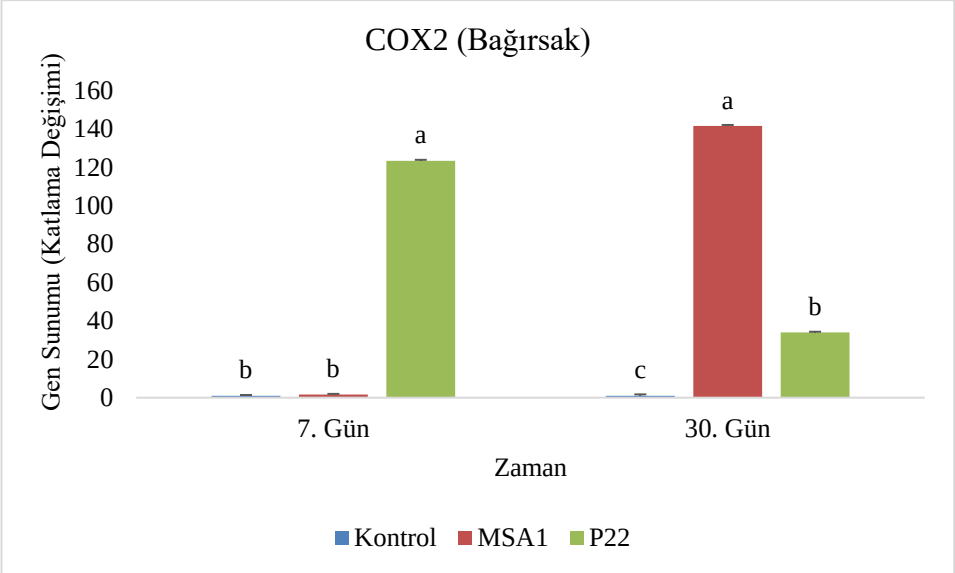


Grafik 4.21. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda COX-2 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

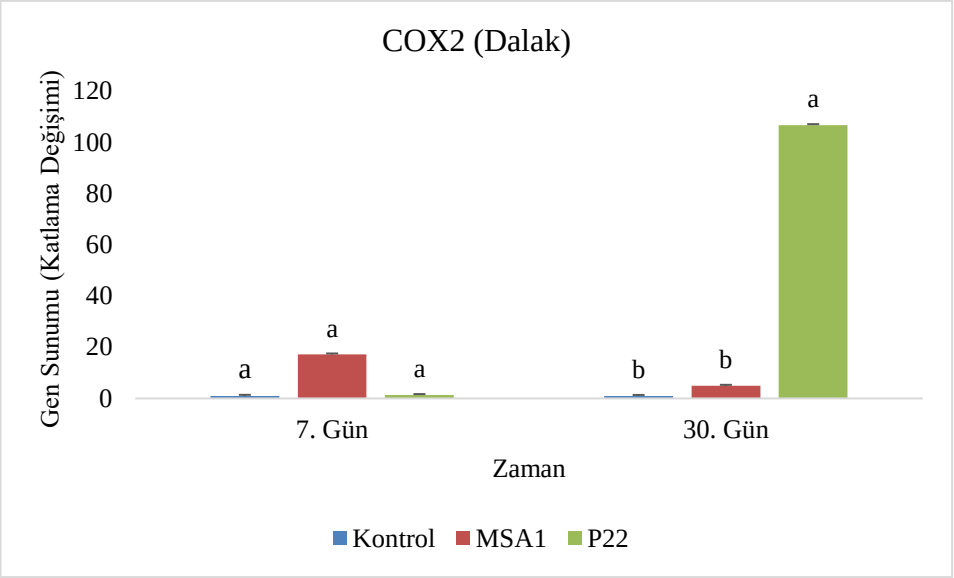
Cox-2 geninin böbrekte ve bağırsaktaki değişimleri sonuçlarına göre 7. günde hem böbrekte hemde bağırsakta P22 uygulanan grupta önemli bir artış gerçekleşmiş olup (P<0,05) (Grafik 4.22), 30. günde ise sadece bağırsakta MSA1 ve P22 uygulanan gruplarda kontrole göre farklılık meydana gelmiştir (P<0,05) (Grafik 4.23).



Grafik 4.22. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda COX-2 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.



Grafik 4.23. MSA1 ve P22 uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda COX-2 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

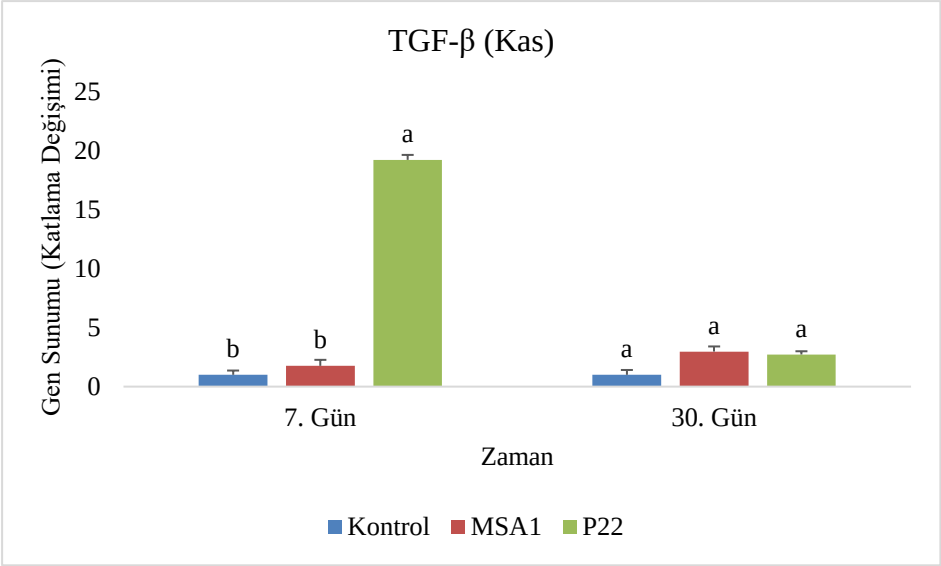


Grafik 4.24. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda COX-2 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

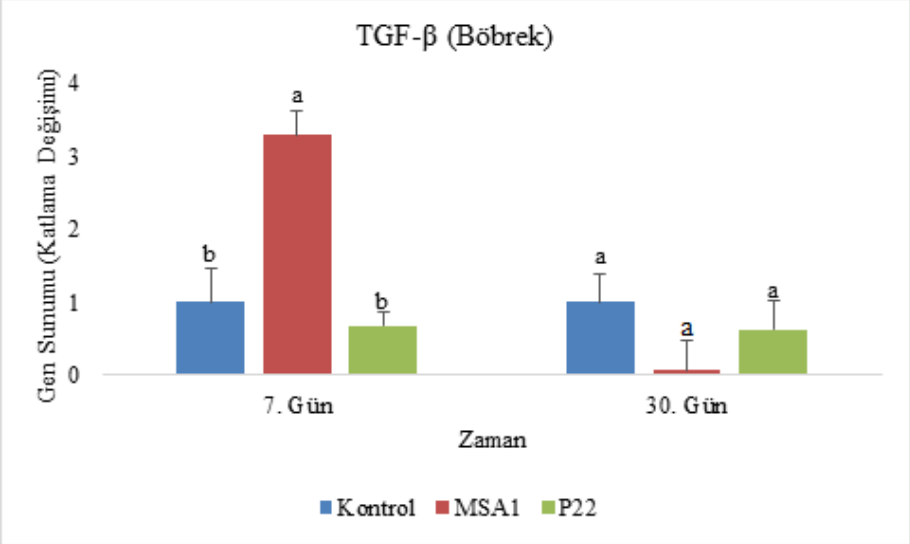
Dalaktaki Cox-2 geninin dalaktaki değişim seviylerine bakıldığında IL-6 da meydana gelen sonuçlara benzer şekilde değişim meydana gelmiş olup 30. günde P22 uygulanan grupta diğer tüm gruplara göre önemli derecede artış meydana gelmiştir ($P<0,05$) (Grafik 4.24).

4.1.1.7. TGF-β

Bu çalışmada TGF-β geninin P22 uygulanan grubunda 7. günde kastaki gen sunumları artış gösterirken; böbrekte MSA1 için yine 7. günde diğer gruplara göre artış meydana gelmiştir ($P<0,05$). Hem kas, hem de böbrek dokularda TGF-β geninde MSA1 ve P22 uygulanan gruplarda ve kontrol grubunda herhangi bir değişim söz konusu olmamıştır ($P>0,05$) (Grafik 4.25; Grafik 4.26).

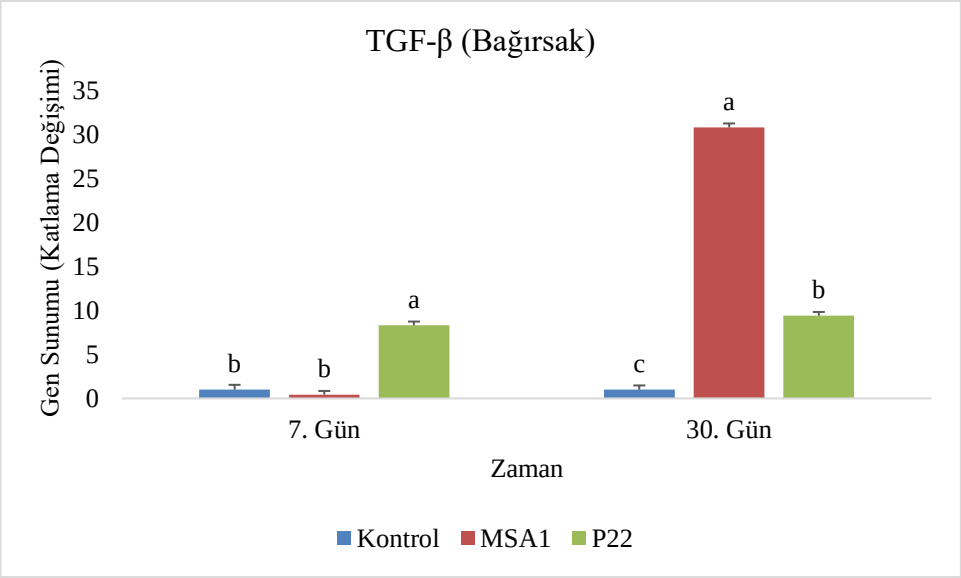


Grafik 4.25. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda TGF-β gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.



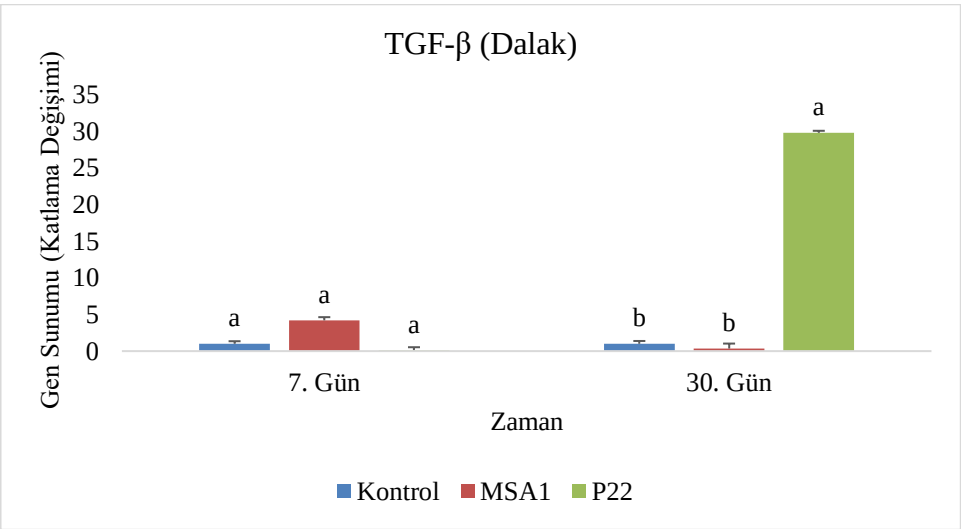
Grafik 4.26. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda TGF-β gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

TGF-β gen sunum sonuçlarının bağırsaktaki değerleri karşılaştırıldığında P22 uygulanan grupta hem 7. hemde 30. günde artış meydana gelirken ($P<0,05$), MSA1 uygulanan grupta sadece 30. günde diğer gruplara göre en yüksek katlama değişimi söz konusu olmuştur ($P<0,05$) (Grafik 4.27).



Grafik 4.27. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda TGF-β gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

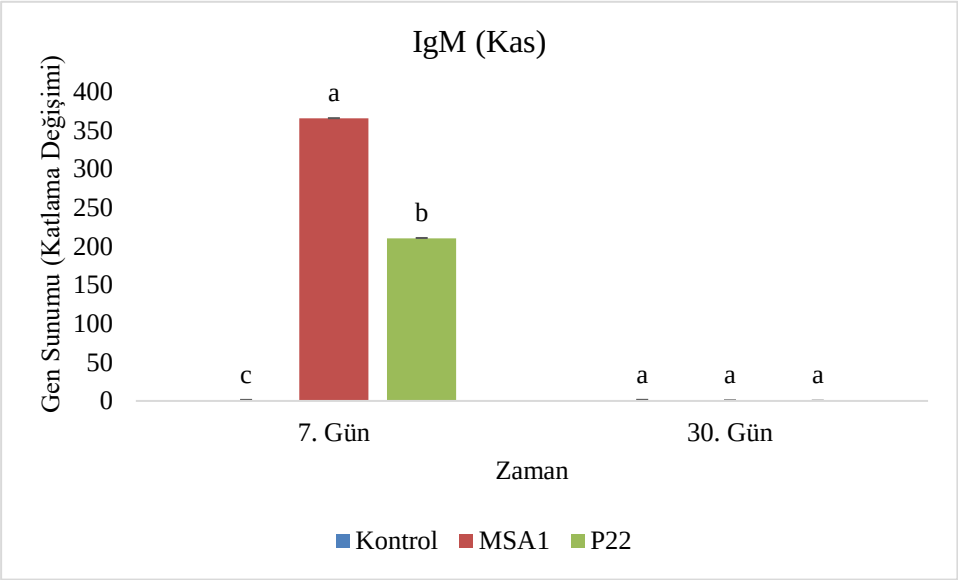
TGF-β gen sunumlarının dalaktaki katlanma değişimlerine bakıldığında, sadece P22 uygulanan grupta 30. günde diğer gruplara göre artış meydana gelmiş olup (P<0,05), bu sonucun COX2'nin dalakta gösterdiği değişime benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Grafik 4.28).



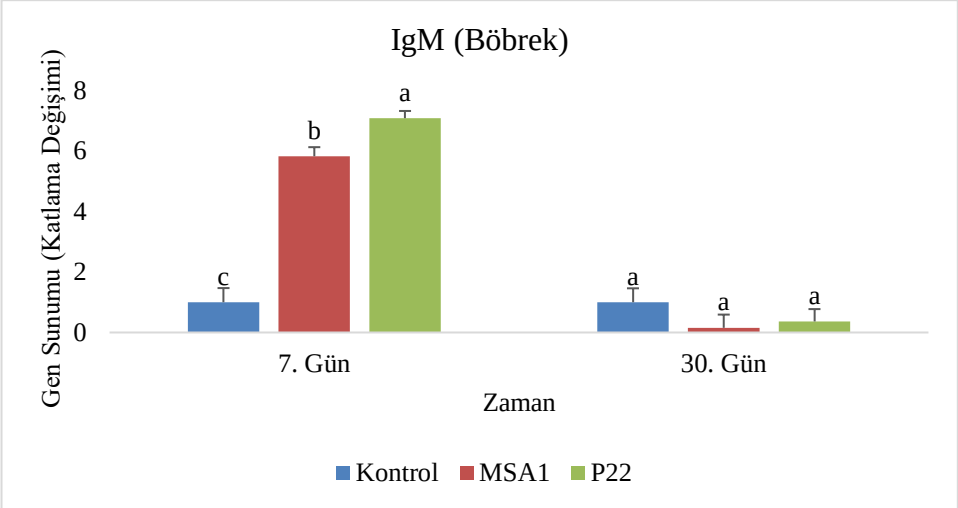
Grafik 4.28. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda TGF-β gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

4.1.1.8. IgM

Çalışma sonunda elde edilen IgM gen sunumları Grafik 4.29, 4.30, 4.31 ve 4.32'de özetlenmiştir.



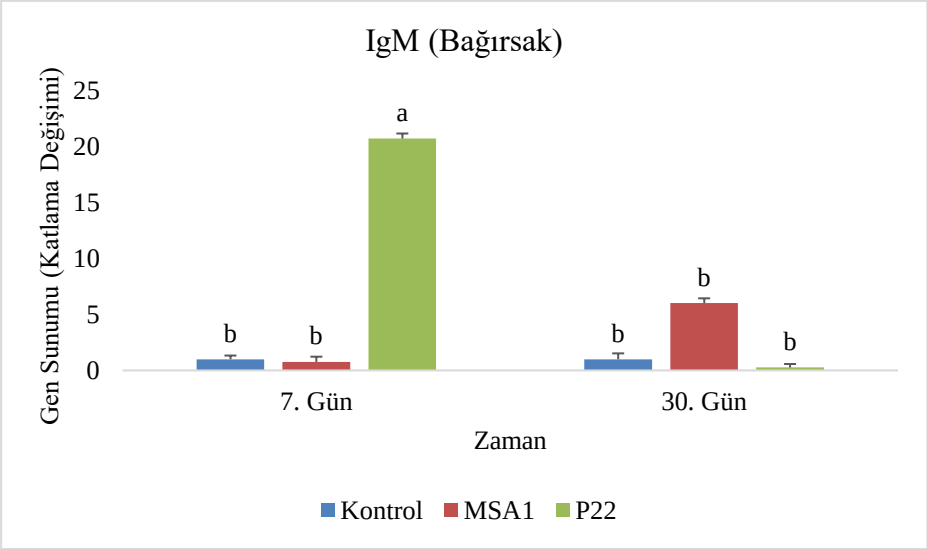
Grafik 4.29. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonundaIgM gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadelergrupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.



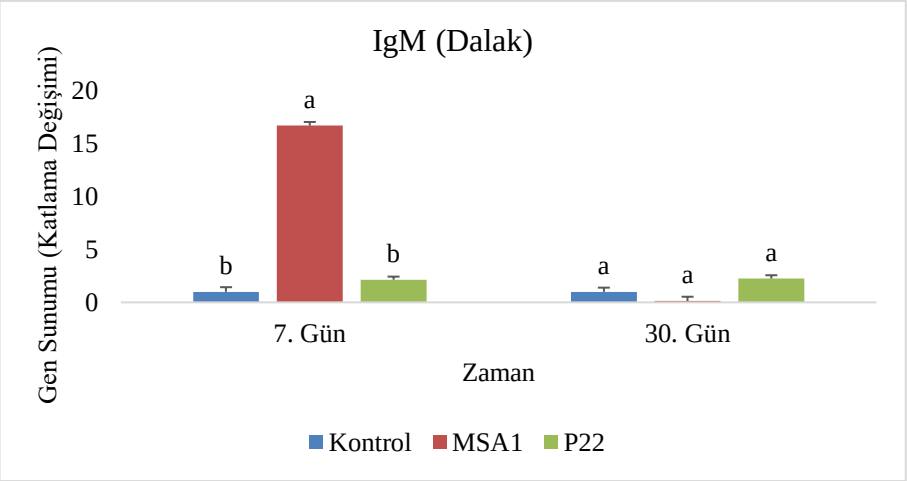
Grafik 4.30. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IgM gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Bu çalışmada kasta ve böbrekte 7. günde hem MSA1 hem de P22 uygulanan gruplarda artış gözlenmiştir, özellikle kasta her iki grup içinde yüksek katlama değişim oranı söz konusudur (P<0,05). 30. günde gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir değişim söz konusu değildir (P>0,05) (Grafik 4.29; Grafik 4.30).

IgM geninin bağırsaktaki ve dalaktaki ekspresyonu sonuçlarına bakıldığında P22 uygulanan grupta bağırsakta 7. gün katlama değişiminde artış gözlenirken, dalakta aynı zamanda yapılan örneklemelerde MSA1 grubunda artış görülmüştür (P<0,05). Söz konusu genin bağırsak ve dalaktaki 30. gün değerleri incelendiğinde gruplar arasında herhangibir farklılık görülmemiştir (P<0,05) (Grafik 4.31; Grafik 4.32).



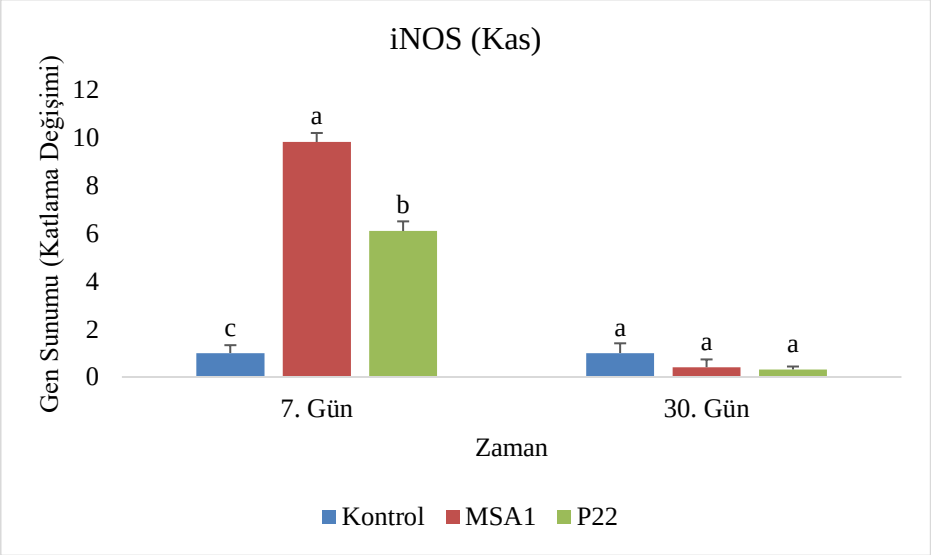
Grafik 4.31. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IgM gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.



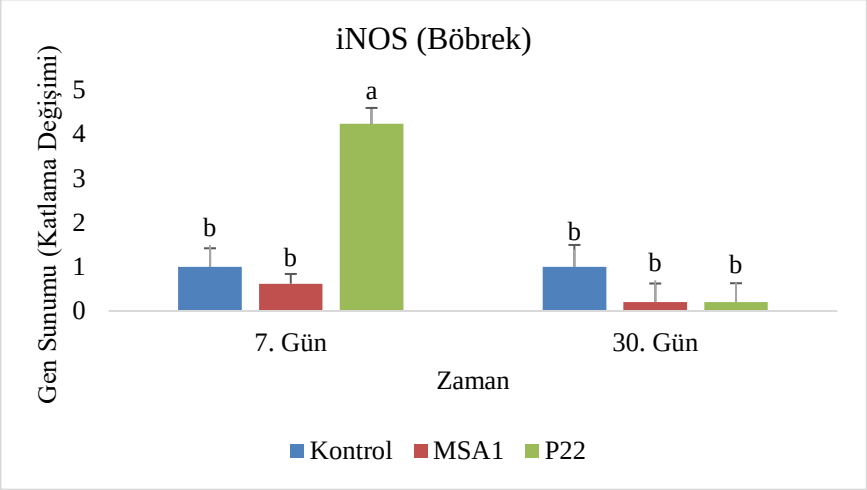
Grafik 4.32. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda IgM gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

4.1.1.9. iNOS

Araştırma sonuçlarına göre MSA1 ve P22 uygulanan gruplarda iNOS değerlerinin 7. günde kontrol grubuna göre artış gösterdiği (P<0,05), fakat 30. günde bu değerlerin azaldığı ve gruplar arasında herhangi bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir (P<0,05) (Grafik 4.33).

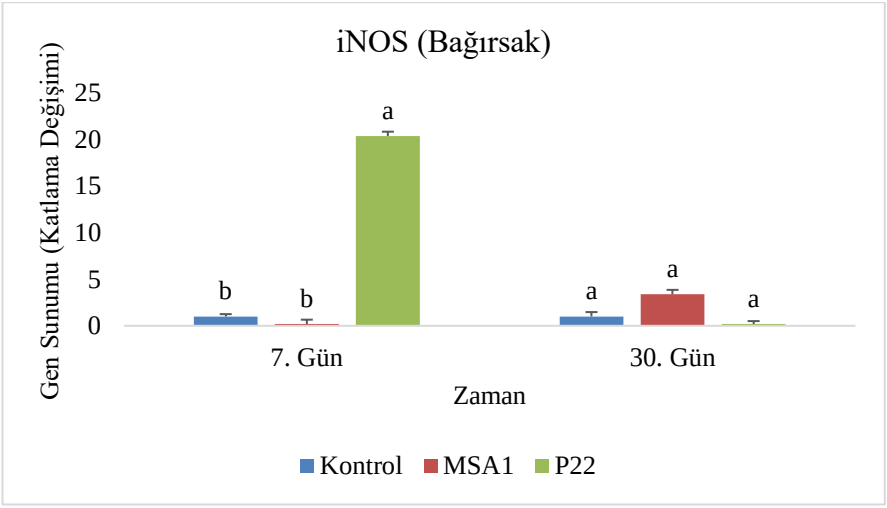


Grafik 4.33. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda INOS gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

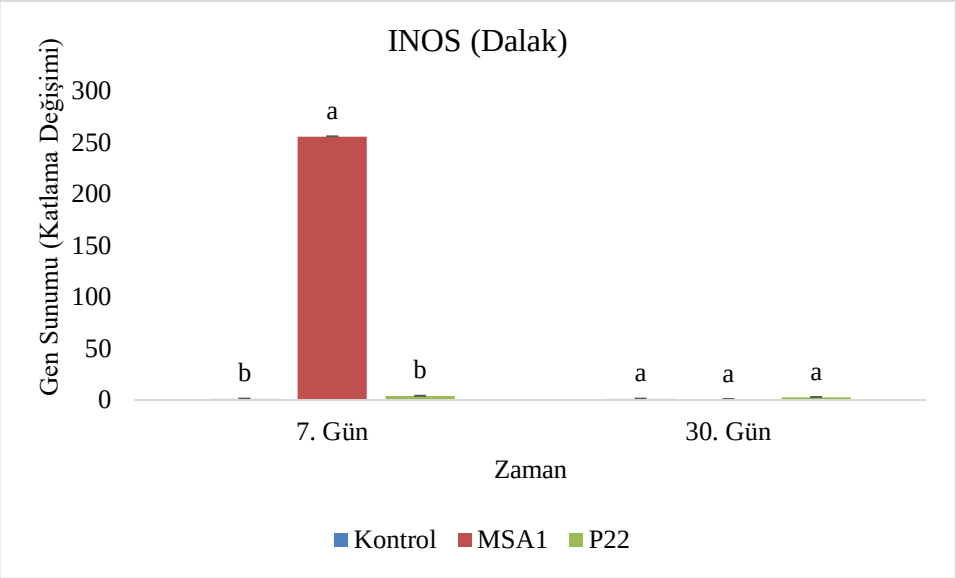


Grafik 4.34. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda INOS gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

7. Gün değerlerine göre P22 uygulanan grupta böbrekte ve bağırsakta diğer gruplara göre iNOS gen sunumuda artış meydana gelirken ($P<0,05$) MSA1 ve kontrol grubunun aralarında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir ($P>0,05$). 30. günde böbrek ve bağırsakta P22 ve MSA1 uygulanan gruplarda herhangibir farklılık söz konusu olmayıp 7. güne göre gen sunumu katlama değerlerinde artış olmuştur ($P<0,05$) (Grafik 4.34; Grafik 4.35).



Grafik 4.35. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda INOS gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade ede

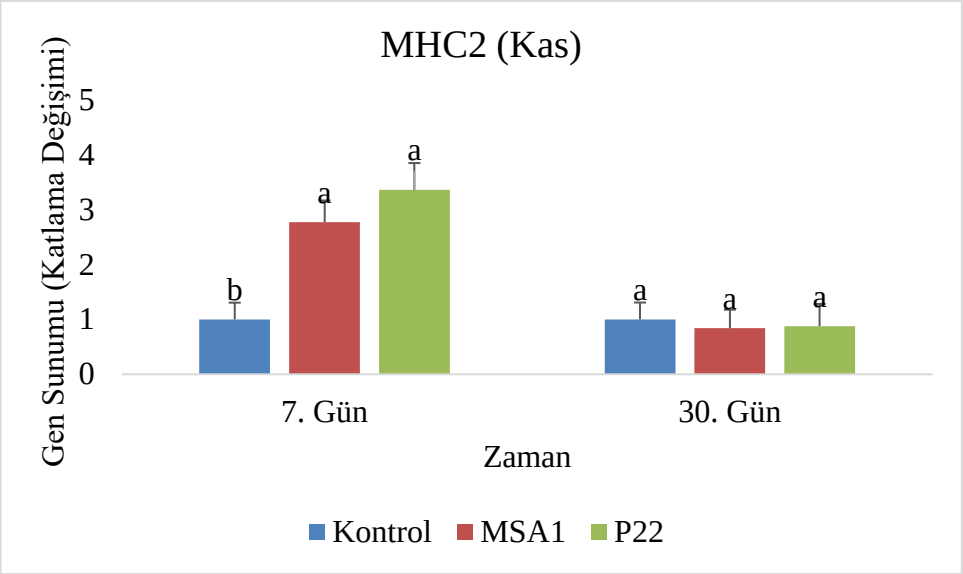


Grafik 4.36. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda INOS gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

MSA1 uygulanan grubun 7. günde iNOS gen sunumu değerline bakıldığında diğer gruplardan yüksek olduğu ($P<0,05$), 30. günde ise tüm gruplarda gen sunumu katlama değerlerinin düşük olduğu ve gruplar arasında herhangibir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P>0,05$) (Grafik 4.36).

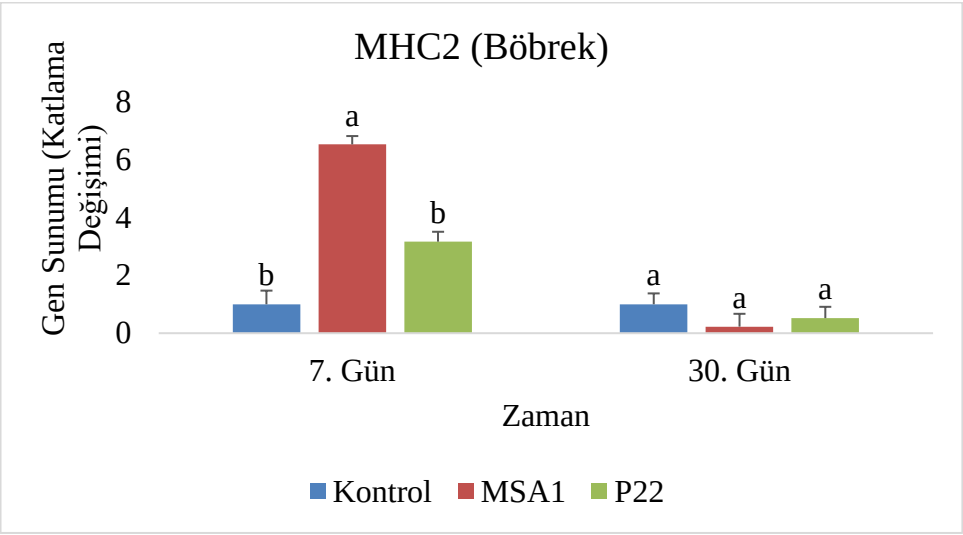
4.1.1.8. MHC-2

Bu araştırmada kas dokusunda MHC2 geninin, MSA1 ve P22 uygulanan gruplarında 7. günde kontrol grubuna göre, katlama değişiminde artış görülmekle birlikte ($P<0,05$), 30. günde gruplar arasında önemli bir değişim görülmemiştir ($P>0,05$) (Grafik 4.37).



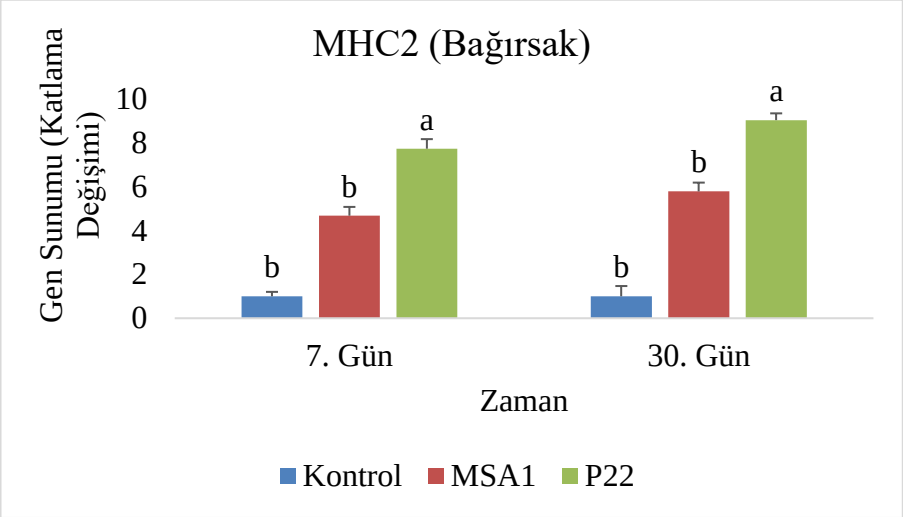
Grafik 4.37. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda MHC-2 gen sunumlarında kasta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

MHC2 geninin böbrekte MSA1 uygulanan gruptaki katlama değişimine bakıldığında diğer gruplara göre artış gösterdiği (P<0,05), P22 uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre herhangi bir farklılık gerçekleşmediği görülmüştür (P>0,05) (Grafik 4.38). 30. günde gen ekspresyonu değerlerinin tüm deneme gruplarında ve kontrol gruplarında herhangi bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir (P>0,05).



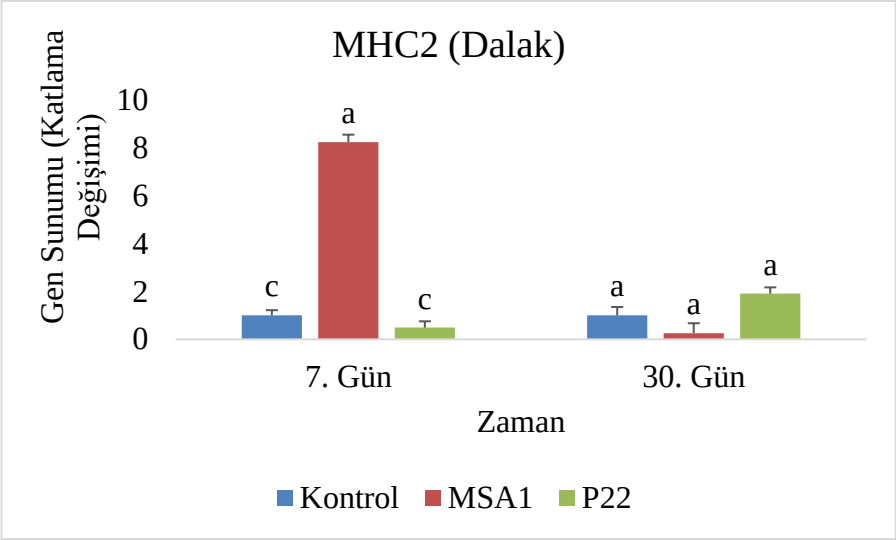
Grafik 4.38. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda MHC-2 gen sunumlarında böbrekte meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

MHC2 geninin bağırsakta 7. günde ve 30. günde P22 grubunda gösterdiği katlama değişim değerinin diğer gruplara göre önemli derecede arttığı (P<0,05). MSA1 geninin ise kontrole göre artış gösterdiği ama bu artışın önem teşkil etmediği tespit edilmiştir (P>0,05) (Grafik 4.39).



Grafik 4.39. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda MHC-2 gen sunumlarında bağırsakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

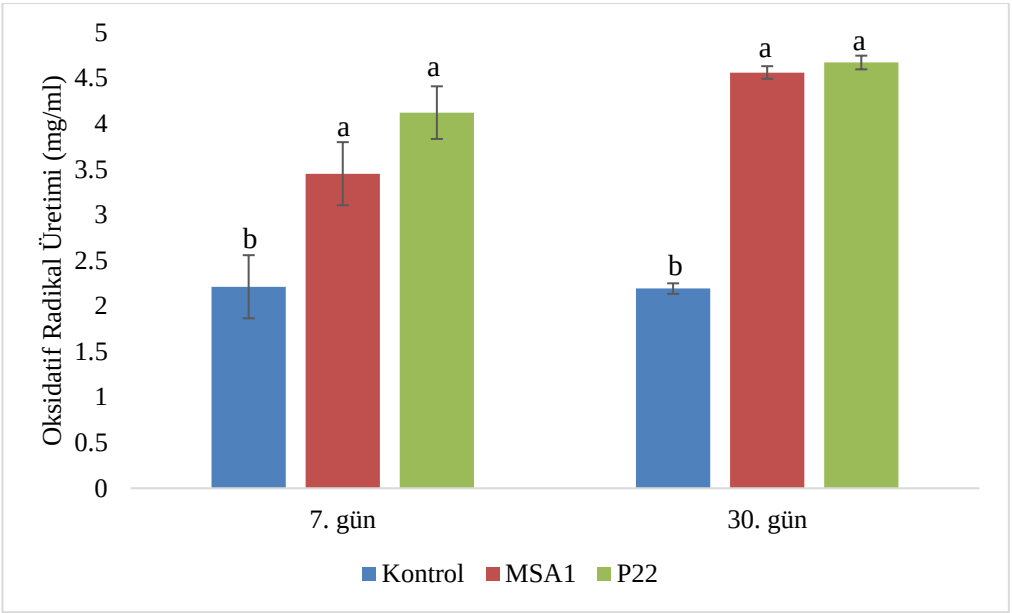
MHC2 geninin dalakta 7. günde MSA1 uygulanan grupta diğer gruplara göre artış gösterdiği (P<0,05). 30 günde ise kasta ve böbrekte olduğu gibi gen sunumu katlama değişiminin azalma gösterdiği ve gruplar arasında farklılık olmadığı tespit edilmiştir (P>0,05) (Grafik 4.40).



Grafik 4.40. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda MHC-2 gen sunumlarında dalakta meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

4.2.Oksidatif Radikal Üretimi (ORÜ)

Çalışmanın her 7 ve 30. gününde balıklardaoksidataif radikal üretiminde meydana gelen değişimler Grafik 4.41'de verilmiştir.

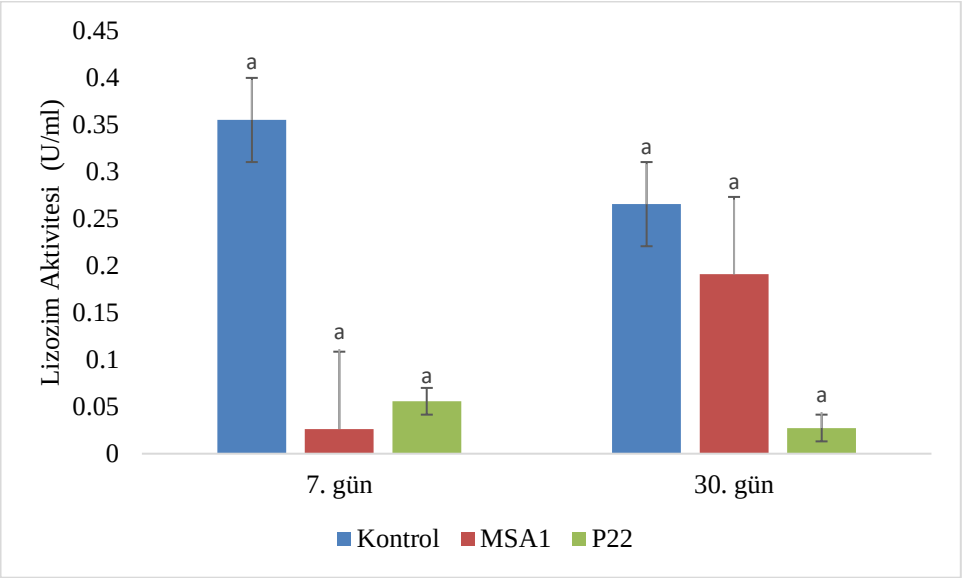


Grafik 4.41. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda ORÜ meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Çalışma sonuçlarına göre OPR sonuçları, tüm deneme gruplarında her iki örnekleme döneminde kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir.

4.3. Lizozim Aktivitesi (LYS)

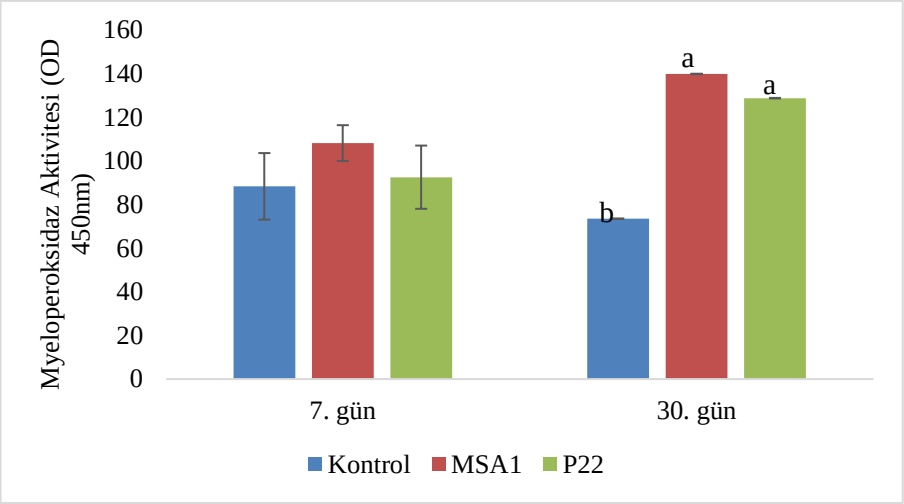
Çalışma sonunda elde edilen LYS sonuçları Grafik 4.42'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre genel olarak kontrol grubunun LYS aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Bununla birlikte bu artış diğer gruplarla kıyaslandığında kayda değer olmadığı tespit edilmiştir (P>0,05).



Grafik 4.42.MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda LYS aktivitelerinde meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder

4.4. Myeloperoksidaz Aktivitesi (MPO)

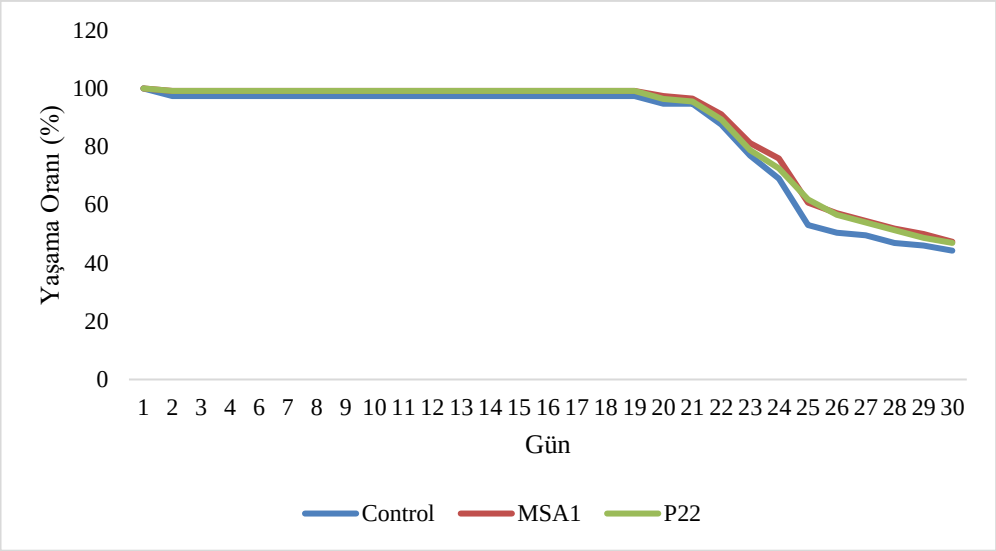
Çalışma sonunda elde edilen LYS sonuçları Grafik 4.43'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışmanın 7. günde deneme grupları MPO aktivitesi kontrol grubuna kıysala artış göstermiş olmakla birkite bu artış istatistiki açıdan önemsiz olarak tespit edilmiştir (P>0,05). Bununla birlikte çalışmanın 30. gününde tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre önemli bir artıştan sözetmek mümkündür (P<0,05).



Grafik 4.43. MSA1 ve P22uygulanmış gökkuşağı alabalığı yavrularının 30 gün sonunda MPO aktivitelerinde meydana gelen değişimler. Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

4.5. Yaşama Oranları

BalıklaraP22 ve MSA1 aşıları uygulandıktan 30 gün sonra*Renibacterium salmoninarum*bakterisi verilerek, 30 gün süreyle yaşama oranlarına bakılmıştır. Uygulama sonrasında özellikle 21. günden itibaren yaşama oranlarına önemli bir düşüş meydana gelmiştir. Sonuç olarak kontrol, MSA1 ve P22 gruplarının sırasıyla %44,26, %47,32 ve %46,92 olacak şekilde yaşam oranları düşmüş olup, gruplar arasında önemli bir farklılık meydana gelmemiştir (P>0,05) (Grafik 4.44).



Grafik 4.44. Kontrol, MSA1 ve P22 uygulanan grupların *Renibacterium salmoninarum*bakterisi enjeksiyonundan sonra 30 günlük yaşama oranları.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sonuçlarına göre balıkların kas, böbrek ve dalaklarında gen sunumlarının 7. günde arttığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda balıklarda ilk 7 günlük süreçte bir immun yanıt oluştuğundan bahsedilebilir. Bununla birlikte tam antikor oluşturulması gereken 30 günde gen sunumlarında bir artış olmaması ve bağışıklık parametrelerinin değişmemesinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda çalışmanın yaşamaoranları da değerlendirildiğinde gruplar arasında farklılık oluşmaması 30 günlük süre içerisinde aşıya karşı özel antikorları gelişmediğini ve bağışıklıkyanıtta etki etmediği söylenebilir.

İnterlökin-1 ailesi (IL-1F) sitokinleri ve reseptörleri doğal inflamatuar cevaplarda mediyatördürler ve hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar işlev görürler (Ballak vd. 2015). IL-1β başlıca monositler, makrofajlar, dendritik hücrelerle B-lenfositler ve natürel killer (NK) hücrelerin bir ürünü olarak oldukça inflamatuar bir sitokindir Dinarello (2011). Bu çalışmada genel olarak MSA1 ve P22 uygulanan gruplarda IL-1β gen sunumlarına artış gözlenmiştir. Yu vd. (2019) çalışmamıza paralel olarak SGIV-19R geni ile oluşturdukları DNA aşısı ile aşıladıkları lahozlarda (*Epinephelus coioides*) IL-1β gen sunumlarının arttığını tespit etmişlerdir. Embregts vd. (2019) yaptıklarıçalışmada Herpesvirus ORF25 ile aşıladıkları koi balıkalrında IL-1β gen sunumlarında çalışmamız benzer olarak artışlar gözlemlemişlerdir.

Proinflamatuar süreçle ilgili önemli bir kemokin, IL- 8 olarak da adlandırılan CXCL-8'dir. Bu kemokin, CXC kemokin alt ailesinin bir üyesidir ve in vitro nötrofilleri, T lenfositleri ve bazofilleri aktive ettiği, fakat makrofajlar veya monositleri uyarmadığı bilinmektedir (Mukaida vd., 1998). Makrofajlar da dahil olmak üzere birçok hücre tipi, çeşitli uyarılara (LPS, sitokinler ve virüsler) cevap olarak IL-8'i üretir. IL-8'in nötrofilleri uyarma kabiliyeti, muhtemelen spesifik reseptörlere bağlanmasını etkileyerek N-terminalinde CXC motiflerine bitişik ELR motifinin varlığı ile açıklanabilir (Hebert vd., 1991). Bu çalışmada IL-8 MSA1 grubu uygulana balıklarda artış göstermiştir. Bu bağlamda MSA1 uygulanan gruplarda nötrofill, T lenfositleri ve bazofillerin aktive olduğu söylenebilir.

IL-10 balıklarda fugu cinsi japon balıklarının genomu araştırılırken keşfedilmiş olup, dokularda çok düşük belirleyici ifadeye sahip olan memeli moleküllerine %42-45 benzerlik göstermiştir (Zou vd., 2003). İnterlökin-10 (IL-10) başlangıçta Th1 sitokinlerinin üretimi için önleyici bir faktör olarak keşfedilmiş olup,daha sonra, pleiotropik sağkalım ve farklılaşma rolü de dahil olmak üzere IL-10 için çeşitli kan hücrelerinde inhibe edici ve uyarıcı etkileri tanımlanmıştır.Aktive monositler, T hücreleri ve keratinositler gibi diğer hücre tipleri tarafından üretilen IL-10, bazı periferik tolerans formların, immün yanıtların ve enflamasyonun majör bir bastırıcısı olarak çok önemli bir rol üstlenmektedir (Cerpa vd. 2012). Çalışmada genel oalrak P22 gruplarında IL-10 aktivitelerinde artış tespit edilmiştir. Bu artış, P22 plazmidi içeren aşılar kullanımonositlerde ve T lenfositlerinde artış olduğunun göstergesi olabilir.

IL-12, p35 ve p40 alt birimlerinden oluşan bir heterodimerik sitokindir. p35 ve p40 alt birimleri fugu cinsi japon balıklarının genom analizi ile balıklarda keşfedilmiştir (Zou vd., 2003). İntrasellüler mikroplara karşı erken doğal yanıtta ana medyatördür ve bu mikroplara karşı adaptif immün cevabın anahtar indükleyicisidir. Özellikle NK sitolitik aktivitesini aktive eder, ayrıca en önemli etkilerinden biri de T ve NK hücrelerinden IFN-γ salınımını arttırmaktadır. IL-12 için ana kaynaklar, aktive mononükleer fagostiler ve dentritik hücrelerdir. Doğal immünitede LPS, viral inf. ve intrasellüler bakterilere karşı savunmada etkilidir (Abbas ve Lichtman, 2003). Çalışmamızda dokulara bağlı olarak hem MSA1 hem de P22 gruplarında çalışmanın yedinci gününde artışlar tespit edilmiştr. Bu artışlar özellikle hücre içi aktive olan *R. salmoninarum*' a karşı etkinlik gösterildiğinin bir ifadesi olabilir. Özellikle ön böbrek ve bağırsaklarda yeralna NK hücrelerinin MSA1 ve P22 plazmidlerini tanıladığı düşünülebilir.

Doğal ve adaptif immunitede yer alır. IL-6, T lenfositleri, makrofajlar, fibroblastlar, nöronlar, endotelyal ve glial hücreleri gibi çeşitli bir grup ile üretilir.IL-6, immünoglobulin üretimi, lenfosit ve monosit farklılaşması, kemokin salgılanması ve lökositlerin göçünün kontrolünde rol oynamaktadır (Cerpa vd., 2012).Ancak, IL-6'nın balıktaki fonksiyonu ve sinyal yolları hakkında çok az şey bilinmektedir. İlginç bir şekilde, makrofajlarda alabalık IL-6 ekspresyonunun, LPS, poli I: C ve IL-1 'in

makrofaj hücre dizisi RTS-11'de ve ayrıca kafa böbrek makrofajlarında indüklendiği bildirilmektedir (Costa vd., 2011). Çalışmada IL-6 gen sunumlarında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte IL-6 gen sunumu açısından P22 uygulanan grupların daha etkili olduğu söylenebilir.

COX'un iki izoformu tanınır: yapıcı bir izoform olan Cox-1 ve bir uyarılabilir izoform olan Cox-2. Cox-2, bağışıklık, yumurtlama ve adipogenez gibi balıkların çeşitli fizyolojik ve patolojik ortamlarında önemli bir moderatörü olarak tanımlanmıştır. COX-2'nin balıktaki büyük işlevine rağmen, düzenleme ve moleküler mekanizması açısından henüz tam olarak keşfedilememiştir. COX-2 gen ekspresyonunun modülasyonu birçok balık türünde parazit enfeksiyonları için çalışılmıştır (Wang vd., 2016).Bu çalışmada COX-2'nin daha ziyade P22 uygulana gruplarda etkinliğini arttırdığı söylenebilir. Sekonder enfeksiyonaın önlenmsi bağlamında özellikle çalışmanın ilk yedi günlük periyodundaki artışlar P22'nin aynı zamanda bağışıklık uyarıcı etkileri olduğu anlamına dagelmektedir.

TGF-β 'nın en önemli etkisi; lökosit ve lenfositlerin aktivasyon ve poliferasyonunu inhibe etmekte olup, B hücrelerini IgA yapımına sevk eder. TGF-β; lenfositler, dendritik hücreler, NK hücreleri, makrofajlar ve granülositler dâhil olmak üzere çeşitli lökosit soylarında hücre gelişimini, çoğalmasını, farklılaşmasını, göçünü ve sağkalımını düzenleyen bir pleiotropik sitokindir(Cerpa vd. 2012).Bazı yeni çalışmalar, TGF- β1'in, memelilerde olduğu gibi aktive edilmiş lökositler üzerinde güçlü immün depresyon etkileri olduğunu ortaya koymuştur(Cerpa vd. 2012).Örneğin, TGF-β1, Japon balıklarında ve sazanlarda TNF kaynaklı makrofaj aktivasyonunu önemli ölçüde bloke ettiği, ancak japon balıklarında fibroblast hücre hattının (CCL71) çoğalmasını uyardığı belirtilmiştir (Haddad vd., 2008). Çalışmamıza benzer olarak Yu vd., (2019). SGIV-19R geni ile oluşturdukları DNA aşısı ile aşıladıkları lahozlarda (*Epinephelus coioides*) TGF-β gen sunumlarının arttığını tespit etmişlerdir.

Genel olarak, IgM, çeşitli antijenlere karşı etkili spesifik humoral tepkiler ortaya çıkarabilen teleostlardaki ana immünoglobulindir. Bu çalışmada kasta ve böbrekte 7. günde hem MSA1 hem de P22 uygulanan gruplarda artış gözlenmiştir. Benzer olarak

SGIV-19R proteini ile aşılanan *Epinephelus coioides*'lerde IgM gen sunumlarında artış gözlenmiştir. Bu bağlamda MSA1 ve P22 plasmid DNA'larına karşı antikor üretiminin arttığı söylenebilir.

iNOS tarafından gerçekleştirilen nitrik oksit üretimi immun sistemin önemli bir bileşenidir. iNOS ekspresyonu sitokinler tarafından düzenlenmekte olup, balıklarda, makrofajlardan optimal nitrik oksit salınımının makrofaj aktivasyon faktörleri ve lipopolisakkarit ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Neumann ve Belosevic 1996). iNOs çalışmada her iki denem grubunda çalışmaın 7. gününde artışlar göstermiştir. Tüm diğer genlerle benzerlik gösteren bu artış nitirik oksit salınımının makrofajlarda arttığını göstermeltedri. Bu aynı zamanda ORP üretimi ile de çalışma verileri açısından örtüşmektedir.

MHC genleri, antijen sunumunun ve dolayısıyla T lenfositlerin adaptif immün tepkisinin nasıl başladığını anlamak için çok önemlidir (Cuesta, Esteban ve Meseguer, 2005). MHC, antijenlerin sırasıyla CD^{8+} ve CD^{4+} T lenfositlerine bağlanmasından ve sunulmasından sorumlu olan iki tip membran bağlı glikoprotein üretiminde görev almaktadır (Sato vd., 2000). Bu çalışmada MHC2 gen sunumları diğer gen sunumlarına paralele olarak çalışmanın yedinci gününde artış göstermiştir. Bu sonuçlara göre MSA1 ve P22'nin T lenfositleri tarafında yakalandığı ve buna bağlı olarak MHC2 gen sunumlarında artış gözlendiği düşünülebilir.

ORÜ çalışmada tüm gruplarda artış göstermiştir. Bu humurol yanıtın kayıt edilen 30 gün boyunca devanm ettiğini göstermektedir. Uygulamada kullanılan plazmidlerin uzun süreli olarak sistemi oksidatif radikal salınımına mecbur ettiği kanısı oluşmaktadır. Bununla birlikte oksidatif radikal üretiminde genlerde iNOS gen sunumlarındaki 30 gün düşüşleri bu sonuçlar ile bağdaşmamaktadır.

Lizozim mukus içerisinde salgılanan ve balıkalrın bariyer sistemlerinde durdurcu etki gösteren, aynı zamanda patojenik bakterilerin hücre duvarları liziz eden önemli bir enzimdir (Sahoo vd. 2005). Bu çalışma sonuçlarına göre hiçbir denem grubunun lizozim aktivitelerinde bir değişiklik söz konusu olmamıştır. Buna ek olarak *R.*

salmoninarum enfeksiyonun hücre içi etki göstermesi, lizozim aktivitelerindeki etkisizliğin ana sebebi olabilir.

Myeloperoksidaz genel olarak nötrofiller tarafından salgılanan ve H_2O_2 üretimini sağlayan ve böylelikle bakterilerin öldürülmesinde kullanılan bir enzimdir. Bu çalışmada MPO aktivitesi deneme gruplarında önemli derecede artış göstermiştir. Özellikle nötrofillerin MSA1 ve P22 plazmidleri ile uyarıldığı ve bu bağlamda oksidatif radikalleri ürettiği söylenebilir. Bu sonuçlar ORP ve iNOS gen sunumlarındaki artış ile örtüşmektedir.

Yaşam oranları kontrol edildiğinde yaklaşık olarak 21. günden sonra balıklarda ölümler başlamıştır. Genel olarak *R. salmoninarum*'um ortalama 21 gün kuluçka süresi olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda balıkların yaşama oranları beklentilerin altında kalmıştır. Özellikle deneme gruplarında, kontrol grubuna kıyasla bir artıştan söz etmek mümkün değildir. Bu durumda balıklarda *R. salmoninarum*'a karşı özel antikorların oluşmadığı söylenebilir. Çalışmamızdan farklı olarak Liu vd., 2019 yapıtıkları çalışmada sagH geni ile aşıladıkları Japon pisi balıklarında (*Paralichthys olivaceus*)*Streptococcus iniae* enfeksiyonuna karşı yaşama oranlarında artış tespit etmişlerdir. Bununla birlikte çalışmamıza benzer olarakHerpesvirus ORF25 ile aşıladıkları koi balıkalrında yaşama oranlarında control grubuna kıyasla bir artış tespit edememişlerdir.

Lim vd. (2019) pisi balığı yetiştiriciliğinde (*Paralichthys olivaceus*)miR-155'in adjuvan etkisinin görülmediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, serum nötralizasyon aktivitelerinde, G geni ya da G geni ile beraber DNA aşılarını eksprese eden miR-155, kontrol aşılarından (PBS ve boş vektör) daha yüksek aktivitelere neden olsa da, sadece G geni ile G geni ve miR- arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Serum virüsidal aktivitesinde, G geni ile miR-155 eksprese eden DNA aşısıyla immünize edilmiş balık, immünizasyondan 3 gün sonra (dpi) hirame rabdovirüsüne (HIRRV) karşı, diğer gruplara kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek aktivite göstermiştir ve bunun vektörden üretilen miR-155'in pisi balığında doğal immün tepkilerini artırabileceğini ortaya koymuşlardır. Özellikle 28d.p.i.'de VHSV'ye karşı belirgin şekilde artmış serum virüsidal aktiviteleri yalnız G geni ve G geni ile DNA aşılarını

eksprese eden miR-155 ile immünize edilmiş gruplarda, klasik komplemen yolunu ve ardından viral inaktivasyonu aktive edebilen G proteinine karşı artan antikorları göstermişlerdir. Pisi balığında DNA aşıları hakkında mevcut bilgi yeterli olmadığı için, DNA aşılarının, bu balığın kültürü yapılan çiftliklerinde daha pratik kullanımını sağlamak için DNA aşılarının koruyucu etkinliği konusunda daha çeşitli araştırmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır.

Embregets vd., (2019)SVCV glikoproteini (SVCV-G) kodlayan bir DNA plazmidinin intramüsküler enjeksiyonuna dayanarak sazan için başarılı bir aşı olduğunu bildirmişlerdir. Bunun, kas içi (i.m.) aşılama yolunun SVCV'ye karşı koruyucu tepkileri tetiklemek için uygun olduğunu ve SVCV G-proteininin uygun bir aşı antijeni olduğunu göstermişlerdir. Ancak, DNA aşılarının genel başarısına rağmen, özellikle balık rabdovirüslerine karşı, pratik uygulamaları hala tüketicilerin kabul kaygıları kadar yasalar ile de sınırlandırıldığını belirtmişlerdir. Ayrıca, plazmid uygulamasının intramüsküler yolu, büyük ölçüde intraperitoneal veya daldırma aşılamalarına dayanan mevcut aşılama rejimlerinin çoğu ile kolayca kombine edilemeyeceğini açıklamışlardır. Bu nedenle, bu çalışmada aşı antijeni olarak SVCV-G proteinini kullanarak DNA tabanlı bir intramüsküler enjekte edilebilir aşıya alternatifleri değerlendirdikleri çalışmada, , SVCV'ye karşı gelecekteki aşılama stratejilerinde bir tahmin sağlamak için detaylı olarak tartışılacağını belirtmişlerdir.

DNA aşılarını sırasıyla gökkuşağı alabalığı ve CMV promotöründen interferon ile indüklenebilir Mx promotörü ile karşılaştırmışlardır. Çiftlik balıklarında balık rabdovirüslerinin neden olduğu hastalıklara karşı oldukça etkili DNA aşıları, bir kurucu sitomegalovirüs promotörünün (CMV) kontrolü altında viral glikoproteini kodlayan bir DNA plazmit vektöründen oluştuğu bilinmektedir (Sepulveda vd., 2019).

Embregts vd.(2019) çalışmalarında, daha az enjeksiyon gerektiren ORF25 bazlı bir DNA aşılama protokolünü optimize etmeye ve enfeksiyonun doğal yoluna daha çok benzeyen bir türüne karşı koruma sağlamayı amaçlamışlardır. Buna benzer olarak çalışma verileri ile ilgili elde edilen veriler benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmalar ışığında balıkların farklı iki DNA bazlı aşı ile aşılanmaları sonucunda yaşama oranlarında kontrol grubuna göreherhangi bir farklılık gözlenmemesi ile birlikte (P>0,05), bunlara ek olarak özellikle 7. günde gen sunumlarının artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca humoral yanıtlarda da önemli artışlar tespit edilmiştir. Bu durum MSA1 ve P22genlerininimmunostimulant etki gösterebileceği düşüncesini doğurduğundan ileriki çalışmalarda söz konusu bu genlerin üzerinde durularak, yeni nesil adjuvant ve aşılama öncesi immunostimulant uygulamalarının geliştirilmesiaçısından bir öncül nitelik taşıdığı düşünülmektedir. Ayrıca antikor oluşumunun, ilgili genlere karşı çalışma süresinde oluşmadığı, bu bağlamda daha uzun süreli denemelerin yapılması gerektiği kanaati hasıl olmuştur.

KAYNAKLAR

Abul K. Abbas, &Andrew H. Lichtman.(2003). Cellular and Molecular Immunology, 5 th. Ed. Saunders, 243-275.

Aedo, E. & Bustos, P. (1991) Obtenci6n de ovas de salmones libres de BKD. Chile Pesquero 62, 51-55.

Allnutt, F. T., Bowers, R. M., Rowe, C. G., Vakharia, V. N., LaPatra, S. E., & Dhar, A. K. (2007). Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast. Vaccine, 25(26), 4880-4888.

Ana, I., Saint-Jean, S. R., & Pérez-Prieto, S. I. (2010). Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish & shellfish immunology*, 28(4), 562-570.

Armstrong, R. D., Martin, S. W., Evelyn, T. P., Hicks, B., Dorward, W. J., & Ferguson, H. W. (1989). A field evaluation of an indirect fluorescent antibody-based broodstock screening test used to control the vertical transmission of Renibacterium salmoninarium in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53(4), 385.

Austin, B. (1985). Evaluation of antimicrobial compounds for the control of bacterial kidney disease in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 8(2), 209-220.

Austin, B., & Rayment, J. N. (1985). Epizootiology of Renibacterium salmoninarum, the causal agent of bacterial kidney disease in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 8(6), 505-509.

Austin, B., Embley, T. M., & Goodfellow, M. (1983). Selective isolation of *Renibacterium salmoninarum*. FEMS Microbiology Letters, 17(1/3), 111-114.

Awad, E., Mitchell, W. J., & Austin, B. (2011). Effect of dietary supplements on cytokine gene expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 34(8), 629-634.

Balfry, S. K. (1990). Observations on the epizootiology of bacterial kidney disease in farmed salmonids (Doctoral dissertation, Theses (Dept. of Biological Sciences)/Simon Fraser University).

Ballak, D. B., Stienstra, R., Tack, C. J., Dinarello, C. A., & van Diepen, J. A. (2015). IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine*, *75*(2), 280-290

Ballesteros, N. A., Saint-Jean, S. R., & Perez-Prieto, S. I. (2014). Food pellets as an effective delivery method for a DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Fish & shellfish immunology*, 37(2), 220-228.

Banner, C. R., Rohovec, J. S., & Fryer, J. L. (1983). *Renibacterium salmoninarum* As a Cause of Mortality Among Chinook Salmon in Salt Water 1. *Journal of the World Mariculture Society*, 14(1-4), 236-239.

Beacham, T. D., & Evelyn, T. P. T. (1992). Population and genetic variation in resistance of *Chinook salmon* to vibriosis, furunculosis, and bacterial kidney disease. *Journal of Aquatic Animal Health*, 4(3), 153-167.

Bell, G. R., & Traxler, G. S. (1986). Resistance of the Pacific lamprey, *Lampetra tridentata* (Gairdner), to challenge by *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of kidney disease in salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 9(3), 277-279.

Bell, G. R., Hoffmann, R. W., & Brown, L. L. (1990). Pathology of experimental infections of the sablefish, *Anoplopoma fimbria* (Pallas), with Renibacterium salmoninarum, the agent of bacterial kidney disease in salmonids. *Journal of fish diseases*, 13(5), 355-367.

Biering, E., & Krossøy, B. (2002). U.S. Patent No. 6,471,964. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Brown, L. L., G. K. Iwama, T. P. T. Evelyn, W. S. Nelson &R. P. Levine (1994): Use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect DNA from Renibacterium salmoninarum within individual salmonid eggs. Dis. Aquat. Org., 18,165-171.

Brown, L.L., Ricks, R., Evelyn, T.P.T. & Albright, L.J. (1990) Experimental intra-ovum infection of coho salmon (*Orcorhynchus kisutch*) eggs with Renibacterium salmoninarum using a microinjection technique. *Diseases of Aquatic Organisms* 8, 7–11.

Bruno, D. W. & Munro, A. L. S. (1986a). Uniformity in the biochemical properties of *Renibacterium salmoninarum* isolates obtained from several sources. FEMS Microbiol. Lett. 33,247-250.

Bruno, D. W. (1988). Bacterial kidney disease. Department of Agriculture and Fisheries for Scotland, Marine Laboratory.

Bruno, D. W. (1988). The relationship between auto-agglutination, cell surface hydrophobicity and virulence of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. FEMS Microbiology Letters, 51(2-3), 135-139.

Bruno, D. W., & Munro, A. L. (1986b). Observations on *Renibacterium salmoninarum* and the salmonid egg. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1(2), 83-87.

Bullock, G. L., & Herman, R. L. (1988). Bacterial kidney disease of salmonid fishes caused by *Renibacterium salmoninarum* (No. 78, pp. 0-10). US Fish and Wildlife Service.

Bullock, G. L., & Stuckey, H. M. (1975). Fluorescent antibody identification and detection of the Corynebacterium causing kidney disease of salmonids. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 32(11), 2224-2227.

Bullock, G. L., Griffin, B. R., & Stuckey, H. M. (1980). Detection of Corynebacterium salmoninus by direct fluorescent antibody test. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(4), 719-721.

Butendieck, B., Morales, P., Figueroa, J., Concha, M., & Leon, G. (1995). Specific gene amplification as a means to detect *Renibacterium salmoninarum*. ARCHIVOS DE MEDICINA VETERINARIA, 27(2), 47-54.

Cain, K. D., Byrne, K. M., Brassfield, A. L., LaPatra, S. E., & Ristow, S. S. (1999). Temperature dependent characteristics of a recombinant infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein produced in insect cells. *Diseases of aquatic organisms*, 36(1), 1-10.

Calarota, S., Bratt, G., Nordlund, S., Hinkula, J., Leandersson, A. C., Sandström, E., & Wahren, B. (1998). Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. The Lancet, 351(9112), 1320-1325.

Chen, D. D., Yao, Y. Y., Cui, Z. W., Zhang, X. Y., Peng, K. S., Guo, X., et al. (2018). Comparative study of the immunoprotective effect of two DNA vaccines against grass carp reovirus. *Fish & shellfish immunology*, 75, 66-73.

Chen, P. K., Bullock, G. L., Stuckey, H. M. & Bullock, A. C. (1974). Serological diagnosis ofcorynebacterial kidney disease of salmonids. J. *Fish. Res. Bd Can.* 31,1939-1940.

Chen, S. P., Peng, R. H., & Chiou, P. P. (2015). Modulatory effect of CpG oligodeoxynucleotide on a DNA vaccine against nervous necrosis virus in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & shellfish immunology*, 45(2), 919-926.

Chettri, J. K., Raida, M. K., Holten-Andersen, L., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2011). PAMP induced expression of immune relevant genes in head kidney leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental & Comparative Immunology*, 35(4), 476-482.

Choi, S. H., Kim, M. S., & Kim, K. H. (2012). Immunization of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) with an auxotrophic Edwardsiella tarda mutant harboring the VHSV DNA vaccine. *Fish & shellfish immunology*, 33(3), 569-574.

Cipriano, R.C., Starliper, C.E. & Schachte, J.H. (1985) Comparative sensitivities of diagnostic procedures used to detect bacterial kidney disease in salmonid fishes. *Journal of Wildlife Diseases* 21, 1441–1448.

Citarasu, T., Lelin, C., Thirumalaikumar, E., Babu, M. M., & Vakharia, V. N. (2019). Macrobrachium rosenbergii nodavirus (MrNV)-CP-RNA-2 DNA vaccine confers protective immunity in giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii against MrNV infection. *Fish & shellfish immunology*, 86, 319-326.

Coeurdacier, J. L., Laporte, F., & Pepin, J. F. (2003). Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish & shellfish immunology*, 14(5), 435-447.

Costa MM, Maehr T, Diaz-Rosales P, Secombes CJ, &Wang T. (2011)Bioactivity studies ofrainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: effects on macrophage growthand antimicrobial peptide gene expression. *Mol Immunol*. Sep;48(15-16):1903-16.

Cuesta, A., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2006). Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Molecular immunology*, 43(8), 1275-1285.

Cvitanich, J. D. (1994). Improvements in the direct fluorescent antibody technique for the detection, identification, and quantification of *Renibacterium salmoninarum* in salmonid kidney smears. *Journal of aquatic animal health*, 6(1), 1-12.

Dhar, A. K., Manna, S. K., & Allnutt, F. T. (2014). Viral vaccines for farmed finfish. *Virusdisease*, 25(1), 1-17.

Diler, O., Demirkan, T., Altun, S. & Çalıkuşu, F. (1998). Fethiye bölgesindeki bazı alabalık işletmelerinde yersiniosis'in mevsimsel dağılımı üzerine bir araştırma. In: Doğu Anadolu Bölgesi III. Su Ürünleri Sempozyumu: akuademi.net.

Dinarello, C. A. (2011). A clinical perspective of IL - 1β as the gatekeeper of inflammation. *European journal of immunology*, *41*(5), 1203-1217.

Donnelly, J. J., Liu, M. A., & Ulmer, J. B. (2000). Antigen presentation and DNA vaccines. American journal of respiratory and critical care medicine, 162(supplement_3), S190-S193.

Egan, M. A., & Israel, Z. R. (2002). The use of cytokines and chemokines as genetic adjuvants for plasmid DNA vaccines. Clinical and Applied Immunology Reviews, 2(4-5), 255-287.

Elliott, D. G., & Barila, T. Y. (1987). Membrane filtration–fluorescent antibody staining procedure for detecting and quantifying Renibacterium salmoninarum in coelomic fluid of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(1), 206-210.

Elliott, D. G., & Pascho, R. J. (1991). Juvenile fish transportation: impact of bacterial kidney disease on survival of spring/summer Chinook salmon stocks, 1989. US Army Corps of Engineers, Walla Walla District.

Elliott, J. M., & Hurley, M. A. (1995). The functional relationship between body size and growth rate in fish. Functional Ecology, 625-627.

Ellis, A.E. (1990) Lysozyme Assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B., Eds., Techniques in Fish Immunology, SOS Publications, Fair Haven, 101-103.

Embregts, C. W. E., Rigaudeau, D., Tacchi, L., Pijlman, G. P., Kampers, L., Veselý, T., et al.& Forlenza, M. (2019). Vaccination of carp against SVCV with an oral DNA vaccine or an insect cells-based subunit vaccine. *Fish & shellfish immunology*, 85, 66-77.

Embregts, C. W., Tadmor-Levi, R., Veselý, T., Pokorová, D., David, L., Wiegertjes, G. F., & Forlenza, M. (2019). Intra-muscular and oral vaccination using a Koi Herpesvirus ORF25 DNA vaccine does not confer protection in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 85, 90-98.

Evelyn, T. P. T., Ketcheson, J. E., & Prosperi-Porta, L. (1984). Further evidence for the presence of Renibacterium salmoninarum in salmonid eggs and for the failure of povidoneiodine to reduce the intraovum infection rate in water hardened eggs. *Journal of fish diseases*, 7(3), 173-182.

Evelyn, T. P. T., Ketcheson, J. E., & Prosperi-Porta, L. (1986). Use of erythromycin as a means of preventing vertical transmission of *Renibacterium salmoninarum. Diseases of aquatic organisms, 2*(1), 7-11. A

Evelyn, T. P. T., Prosperi-Porta, L., & Ketcheson, J. E. (1986). Experimental intra-ovum infection of salmonid eggs with *Renibacterium salmoninarum* and vertical transmission of the pathogen with such eggs despite their treatment with erythromycin. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1(3), 197-202. b

Evelyn, T. P. T., Prosperi-Porta, L., & Ketcheson, J. E. (1986). Persistence of the kidney-disease bacterium, *Renibacterium salmoninarum*, in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), eggs treated during and after water-hardening with povidone-iodine. *Journal of Fish Diseases*, 9(5), 461-464.

Evenden, A. J., Grayson, T. H., Gilpin, M. L., & Munn, C. B. (1993). *Renibacterium salmoninarum* and bacterial kidney disease—the unfinished jigsaw. Annual *Review of Fish Diseases*, 3, 87-104.

Fields, R. C., Shimizu, K., & Mule, J. J. (1998). Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(16), 9482-9487.

Fryer, J. L., & Sanders, J. E. (1981). Bacterial kidney disease of salmonid fish. Annual Reviews in Microbiology, 35(1), 273-298.

Gilmore, W., & Weiner, L. P. (1988). β-Endorphin enhances interleukin-2 (IL-2) production in murine lymphocytes. Journal of neuroimmunology, 18(2), 125-138.

Griffiths, R. W., Schloesser, D. W., Leach, J. H., & Kovalak, W. P. (1991). Distribution and dispersal of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Great Lakes region. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(8), 1381-1388.

Han, B., Xu, K., Liu, Z., Ge, W., Shao, S., Li, P., et al. (2019). Oral yeast-based DNA vaccine confers effective protection from *Aeromonas hydrophila* infection on *Carassius auratus*. *Fish & shellfish immunology*, 84, 948-954.

Hao, K., Chen, X. H., Qi, X. Z., Yu, X. B., Du, E. Q., Ling, F., et al (2017). Protective immunity of grass carp induced by DNA vaccine encoding capsid

protein gene (vp7) of grass carp reovirus using bacterial ghost as delivery vehicles. *Fish & shellfish immunology*, 64, 414-425.

Hayakawa, Y., Harada, T., Hatai, K., Kubota, S. S., Bunya, T., & Hoshiai, G. I. (1989). Histopathology of BKD (Bacterial kidney disease) occurred in Sea-cultured Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Pathology*, 24(1), 17-21.

Hebert CA, Vitangcol RV,& Baker JB. (1991) Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. J Biol Chem. 5;266(28): 18989-94.

Hsu, H. M., Wooster, G. A., & Bowser, P. R. (1994). Efficacy of enrofloxacin for the treatment of salmonids with bacterial kidney disease, caused by *Renibacterium salmoninarum. Journal of Aquatic Animal Health*, 6(3), 220-223.

Huang, Y., Cai, S., Pang, H., Jian, J., & Wu, Z. (2017). Immunogenicity and efficacy of DNA vaccine encoding antigenic AcfA via addition of the molecular adjuvant Myd88 against Vibrio alginolyticus in Epinephelus coioides. *Fish & shellfish immunology*, 66, 71-77.

Jansson, E., Hongslo, T., Lindberg, R., Ljungberg, O., & SVENSSON, B. M. (1991). Detection of *Renibacterium salmoninarum* and Yersinia ruckeri by the peroxidaseantiperoxidase immunohistochemical technique in melanincontaining cells of fish tissues. *Journal of fish diseases*, 14(6), 689-692.

Kaatari, S., Turaga, P., & Wiens, G. (1989). Development of a vaccine for bacterial kidney disease in salmon (No. DOE/BP/16480--5). Oregon State Univ.

Kamalii, A., Prabu, E., Ruby, P., & Ahilan, B. (2018). Advanced Developments In Fish Vaccination. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 33(1/2), 101-109.

Kimura, J. (1978). A method for determining median nerve conduction velocity across the carpal tunnel. Journal of the neurological sciences, 38(1), 1-10.

Komatsu, K., Tsutsui, S., Hino, K., Araki, K., Yoshiura, Y., Yamamoto, A., ... & Watanabe, T. (2009). Expression profiles of cytokines released in intestinal epithelial cells of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in response to bacterial infection. Developmental & Comparative Immunology, 33(4), 499-506.

Kumar, S. R., Ahmed, V. I., Parameswaran, V., Sudhakaran, R., Babu, V. S., & Hameed, A. S. (2008). Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio (Listonella) anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(1-2), 47-56.

Kurath, G. (2008). Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. Revue scientifique et technique-Office international des épizooties, 27(1), 175.

Lazarte, J. M. S., Kim, Y. R., Lee, J. S., Im, S. P., Kim, S. W., Jung, J. W., et al (2017). Enhancement of glycoprotein-based DNA vaccine for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) via addition of the molecular adjuvant, DDX41. *Fish & shellfish immunology*, 62, 356-365.

Lee, E. H., & Evelyn, T. P. T. (1994). Prevention of vertical transmission of the bacterial kidney disease agent *Renibacterium salmoninarum* by broodstock injection with erythromycin. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18(1), 1-4.

León, G., Martinez, M. A., Etchegaray, J. P., Vera, M. I., Figueroa, J., & Krauskopf, M. (1994b). Specific DNA probes for the identification of the fish pathogen, *Renibacterium salmoninarum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(2), 149-153.

Leon, G., N. Maulen, J. Figueroa, J. Villanueva, C. Rodriguez,M. I. Vera & M. Krauskopf (1994a): A PCR. based assayfor the identification of the fish

pathogen *Renibacterium salmoninarum*. FEMS (Federation of EuropeanMicrobiological Societies) Microbiology Letters, 115, 131-136.

Li, S., Xie, H., Yan, Z., Li, B., Wu, P., Qian, X., et al. & Zhao, X. (2019). Development of a live vector vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout. *Fish & shellfish immunology*, 89, 516-524.

Lim, H. J., Abdellaoui, N., & Kim, K. H. (2019). Effect of miR-155 as a molecular adjuvant of DNA vaccine against VHSV in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & shellfish immunology*, 88, 225-230.

Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S. E., Daum, R. S., Fridkin, S. K., Gorwitz, R. J., et al. & Rybak, M. J. (2011). Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. Clinical infectious diseases, 52(3), e18-e55.

Liu, C., Hu, X., Cao, Z., Sun, Y., Chen, X., & Zhang, Z. (2019). Construction and characterization of a DNA vaccine encoding the SagH against *Streptococcus iniae*. *Fish & shellfish immunology*, 89, 71-75.

Liu, L., Gong, Y. X., Liu, G. L., Zhu, B., & Wang, G. X. (2016). Protective immunity of grass carp immunized with DNA vaccine against *Aeromonas hydrophila* by using carbon nanotubes as a carrier molecule. *Fish & shellfish immunology*, 55, 516-522.

Liu, X., Xu, J., Zhang, H., Liu, Q., Xiao, J., & Zhang, Y. (2016). Design and evaluation of an Edwardsiella tarda DNA vaccine co-encoding antigenic and adjuvant peptide. *Fish & shellfish immunology*, 59, 189-195.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. methods, 25(4), 402-408.

Lorenzen, N., Olesen, N. J., Jørgensen, P. V., Etzerodt, M., Holtet, T. L., & Thøgersen, H. C. (1993). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *Journal of General Virology*, 74(4), 623-630.

Ma, Y. P., Ke, H., Liang, Z. L., Ma, J. Y., Hao, L., & Liu, Z. X. (2017). Protective efficacy of cationic-PLGA microspheres loaded with DNA vaccine encoding the sip gene of *Streptococcus agalactiae* in tilapia. *Fish & shellfish immunology*, 66, 345-353.

Macgregor, J. I., & Jordan, V. C. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological reviews*, 50(2), 151-196.

Meeusen, E. N., Walker, J., Peters, A., Pastoret, P. P., & Jungersen, G. (2007). Current status of veterinary vaccines. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 489-510.

Mitchum, D. L., & Sherman, L. E. (1981). Transmission of bacterial kidney disease from wild to stocked hatchery trout. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(5), 547-551.

Mitchum, D. L., Sherman, L. E., & Baxter, G. T. (1979). Bacterial kidney disease in feral populations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*), brown trout (*Salmo trutta*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, *36*(11), 1370-1376.

Moffitt, C. M. (1992). Survival of juvenile chinook salmon challenged with *Renibacterium salmoninarum* and administered oral doses of erythromycin thiocyanate for different durations. *Journal of Aquatic Animal Health*, 4(2), 119-125.

Mor, G., Singla, M., Steinberg, A. D., Hoffman, S. L., Okuda, K., & Klinman, D. M. (1997). Do DNA vaccines induce autoimmune disease? Human gene therapy, 8(3), 293-300.

Moreno, S., & Timon, M. (2004). DNA vaccination: an immunological perspective. Inmunologia, 23(1), 41-55.

Mukaida N, Harada A,& Matsushima K. (1998) Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. Cytokine Growth Factor Rev.;9(1):9-23.

Neumann NF,& Belosevic M. (1996) Deactivation of primed respiratory burst response of goldfish macrophages by leukocyte-derived macrophage activating factors. *Dev Comp Immunol*; 20:427-39.

Olivier, G., Griffiths, S. G., Fildes, J., & Lynch, W. H. (1992). The use of Western blot and electroimmunotransfer blot assays to monitor bacterial kidney disease in experimentally challenged Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 15(3), 229-241.

Paclibare, J. O., Evelyn, T. P. T., Albright, L. J., & Prosperi-Porta, L. (1994). Clearing of the kidney disease bacterium *Renibacterium salmoninarum* from seawater by the blue mussel Mytilus edulis, and the status of the mussel as a reservoir of the bacterium. *Diseases of aquatic organisms*, 18(2), 129-133.

Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., et al.& Aoki, T. (2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(4), 372-382.

Pascho, R. J., & Mulcahy, D. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay for a soluble antigen of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of

salmonid bacterial kidney disease. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(1), 183-191.

Pascho, R. J., Elliott, D. G., & Streufert, J. M. (1991). Brood stock segregation of spring chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* by use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the fluorescent antibody technique (FAT) affects the prevalence and levels of *Renibacterium salmoni. Diseases of Aquatic Organisms,* 12(1), 25-40.

Pascho, R. J., Landolt, M. L., & Ongerth, J. E. (1995). Inactivation of *Renibacterium salmoninarum* by free chlorine. *Aquaculture*, 131(3-4), 165-175.

Paterson, W. D., Lall, S. P., & Desautels, D. (1981). Studies on Bacterial Kidney Disease in Atlantic Salmon (*Salmon salar*) in Canada. *Fish Pathology*, 15(3-4), 283-292.

Peñaranda, M. M. D., LaPatra, S. E., & Kurath, G. (2011). Specificity of DNA vaccines against the U and M genogroups of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss). Fish & shellfish immunology*, 31(1), 43-51.

Plumb, J. A., & Hanson, L. A. (2010). Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. John Wiley & Sons.

Raida, M. K., Holten-Andersen, L., & Buchmann, K. (2011). Association between Yersinia ruckeri infection, cytokine expression and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*, 30(6), 1257-1264.

Reyes-Cerpa, S., Maisey, K., Reyes-López, F., Toro-Ascuy, D., Sandino, A. M., & Imarai, M. (2012). Fish cytokines and immune response. In New advances and contributions to fish biology. IntechOpen.

Rondón-Barragán, I., Nozaki, R., Hirono, I., & Kondo, H. (2017). LAMP-1-chimeric DNA vaccines enhance the antibody response in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus. *Fish & shellfish immunology*, 67, 546-553.

Sahoo, P., Kumari, J., & Mishra, B. (2005). Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *Journal of Applied Ichthyology*, 21(2), 151–155. https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2004.00606.x

Sakai, M., Amaaki, N., Atsuta, S., & Kobayashi, M. (1987). Comparative sensitivity of dot blot methods used to detect *Renibacteriwn salmoninarum. Journal of Fish Diseases*, 10(5), 415-418.

Sakai, M., Atsuta, S., & KOBATACHI, M. (1991). The detection of serum antibody to *Renibacterium salmoninarum* in pencultured coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 14(2), 243-246.

Salgado-Miranda, C., Loza-Rubio, E., Rojas-Anaya, E., & García-Espinosa, G. (2013). Viral vaccines for bony fish: pasft, present and future. Expert review of vaccines, 12(5), 567-578.

Sato, A., Figueroa, F., Murray, B. W., Málaga-Trillo, E., Zaleska-Rutczynska, Z., Sültmann, H., et al (2000). Nonlinkage of major histocompatibility complex class I and class II loci in bony fishes. *Immunogenetics*, *51*(2), 108-116.

Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P., & Hoffman, S. L. (1994). Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(21), 9866-9870.

Sepúlveda, D., Lorenzen, E., Rasmussen, J. S., Einer-Jensen, K., Collet, B., Secombes, C. J., & Lorenzen, N. (2019). Time-course study of the protection induced by an interferon-inducible DNA vaccine against viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout. *Fish & shellfish immunology*, 85, 99-105.

Sigh, J., Lindenstrøm, T., & Buchmann, K. (2004). The parasitic ciliate Ichthyophthirius multifiliis induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases,* 27(7), 409-417.

Siwicki, A. K. (1993). Nonspecific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. *Fish diseases diagnosis and preventions methods*.

Skinner, L. A., Schulte, P. M., Balfry, S. K., McKinley, R. S., & LaPatra, S. E. (2010). The association between metabolic rate, immune parameters, and growth performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following the injection of a DNA vaccine alone and concurrently with a polyvalent, oil-adjuvanted vaccine. *Fish & shellfish immunology*, 28(2), 387-393.

Sommerset, I., Lorenzen, E., Lorenzen, N., Bleie, H., & Nerland, A. H. (2003). A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. Vaccine, 21(32), 4661-4667.

Sorum, H. (1998). Mobile drug resistance genes among fish bacteria. Apmis, 106(S84), 74-76.

Sun, Y., Hu, Y. H., Liu, C. S., & Sun, L. (2012). Construction and comparative study of monovalent and multivalent DNA vaccines against *Streptococcus iniae*. *Fish & shellfish immunology*, 33(6), 1303-1310.

Sun, Y., Zhang, M., Liu, C. S., Qiu, R., & Sun, L. (2012). A divalent DNA vaccine based on Sia10 and OmpU induces cross protection against *Streptococcus iniae* and Vibrio anguillarum in Japanese flounder. *Fish & shellfish immunology*, 32(6), 1216-1222.

Suzumoto, B. K., Schreck, C. B., & McIntyre, J. D. (1977). Relative resistances of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to bacterial kidney disease. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 34(1), 1-8.

Tacket, C. O., Roy, M. J., Widera, G., Swain, W. F., Broome, S., & Edelman, R. (1999). Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. Vaccine, 17(22), 2826-2829.

Tam, J. P. (1988). Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. Proceedings of the National Academy of Sciences, 85(15), 5409-5413.

Tang, D. C., DeVit, M., & Johnston, S. A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature, 356(6365), 152.

Teska, J. D., Dawson, A., Starliper, C. E., & Tillinghast, D. (1995). A multipletechnique approach to investigating the presumptive low-level detection of *Renibacterium salmoninarum* at a broodstock hatchery in Maine. *Journal of Aquatic Animal Health*, 7(3), 251-256.

Tonheim, T. C., Bøgwald, J., & Dalmo, R. A. (2008). What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish & shellfish immunology*, 25(1-2), 1-18.

Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., et al.. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science, 259(5102), 1745-1749.

Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., & Baldwin, A. S. (1998). NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. Science, 281(5383), 1680-1683.

Wang, H., Zhu, F., Huang, Y., Ding, Y., Jian, J., & Wu, Z. (2017). Construction of glutathione peroxidase (GPx) DNA vaccine and its protective efficiency on the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) challenged with Vibrio harveyi. *Fish & shellfish immunology*, 60, 529-536.

Wang, T., Mai, K., & Ai, Q. (2016). A review of cyclooxygenase-2 role in fish. Austin J. Nutr. Metab, 3, 1037.

Wang, X. J. (2001). Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity. Trends in neurosciences, 24(8), 455-463.

Williamson, E. D., Eley, S. M., Griffin, K. F., Green, M., Russell, P., Leary, S. E., ... & Titball, R. W. (1995). A new improved sub-unit vaccine for plague: the basis of protection. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 12(3-4), 223-230.

Winter, G. W., Schreck, C. B., & McIntyre, J. D. (1980). Resistance of different stocks and transferrin genotypes of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, and steelhead trout, *Salmo gairdneri*, to bacterial kidney disease and vibriosis. Fish. Bull, 77(4), 795-802.

WOLF, K. &DumberC. E. (1959): Test of 34 therapeutic agents for control of kidney disease in trout. Trans. Amer. Fish. Soc., 88, 117-124.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science, 247(4949), 1465-1468.

Wood, J. W., & Wallis, J. (1955). Kidney disease in adult chinook salmon and its transmission by feeding to young chinook salmon. Fisheries Commission of Oregon, Research Briefs, 6, 32-40.

Xu, H., Xing, J., Tang, X., Sheng, X., & Zhan, W. (2019). Intramuscular administration of a DNA vaccine encoding OmpK antigen induces humoral

and cellular immune responses in flounder *(Paralichthys olivaceus*) and improves protection against Vibrio anguillarum. *Fish & shellfish immunology*, 86, 618-626.

Yan, N., Xu, K., Li, X., Liu, Y., Bai, Y., Zhang, X., et al.& Zhang, Z. (2015). Recombinant Saccharomyces cerevisiae serves as novel carrier for oral DNA vaccines in Carassius auratus. *Fish & shellfish immunology*, 47(2), 758-765.

Young, C. L., & Chapman, G. B. (1978). Ultrastructural aspects of the causative agent and renal histopathology of bacterial kidney disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 35(9), 1234-1248.

Yu, N. T., Zheng, X. B., & Liu, Z. X. (2019). Protective immunity induced by DNA vaccine encoding viral membrane protein against SGIV infection in grouper. *Fish & shellfish immunology, 92*, 649-654.

Zhang, C., Zhao, Z., Zha, J. W., Wang, G. X., & Zhu, B. (2017). Single-walled carbon nanotubes as delivery vehicles enhance the immunoprotective effect of a DNA vaccine against spring viremia of carp virus in common carp. *Fish & shellfish immunology*, 71, 191-201.

Zhang, M., Hu, Y. H., Xiao, Z. Z., Sun, Y., & Sun, L. (2012). Construction and analysis of experimental DNA vaccines against megalocytivirus. *Fish & shellfish immunology*, 33(5), 1192-1198.

Zhu, B., Liu, G. L., Gong, Y. X., Ling, F., & Wang, G. X. (2015). Protective immunity of grass carp immunized with DNA vaccine encoding the vp7 gene of grass carp reovirus using carbon nanotubes as a carrier molecule. *Fish & shellfish immunology*, 42(2), 325-334.

Zou J, Clark MS,& Secombes CJ. (2003) Characterisation, expression and promoter analysis ofan interleukin 10 homologue in the puffer fish, Fugu rubripes. *Immunogenetics*, 55(5):325-35.

URL-1.Plasmid-DNA-Purification-System (1995) accessed 1september 2018 https: //www.pcr-lab-products.com/Plasmid-DNA-Purification- System/exprep-plasmid-sv/?language=de

URL-2.Mohammed,K.(2018) protocols/technical-manual. accessed 10 August 2013 https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pg -emt-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Ahmed Alhadi ALMABROK
Doğum Yeri ve Yılı : 01/31/1971
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce, Türkçe
E-posta : ejdaydhom@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Janzour secondary school.1988.
Lisans : Veterinerlik Fakültesi/ Tripoli Universitesi 1994.
Master : Libya Akademisi/ biyomedikal bilimler. 2009.

Mesleki Deneyim

Current job: - Head department of veterinary and animal production in Al Ghiran Higher Institute of Agricultural Technology.
October 2013 till June 2014.
Previous jobs: -
•Assistant Lecturer at the Higher Institute of Agricultural Technology department of poultry and farm animals' technology since September 2009.
•Demonstrator at the Higher Institute of Agricultural Technology department of poultry and farm animals' technology 2006 to 2009.
•Trainer at the intermediate stage of the Institute in the period
between 1999 and 2006.

•**Degrees obtained: -**

1)Bachelor of Veterinary Medical Sciences, 1994 College of Veterinary Medicine - University of Tripoli overall rating - good.

2)Master of Life Sciences / Division of biomedical sciences, 2009 The Libyan Academy overall rating: - Very Good.
Thesis title: - Seroprevalence of Toxoplasmosis in Ruminants and Poultry in Libya.

•learning activities: -

1)Teaching and training of students of the intermediate diploma subjects (pathology and internal medicine) from the period between 1999 to 2006.
2)Teaching of higher diploma students to the subjects of (Poultry diseases and Animal hygiene) from 2009 to 2014.

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yaymlanan Makaleler

1.Almabrok, A.A., Amhamed, I.D., Mohamed, G.A., Bilen, S., &Altief, T.A.S. (2018). Effect of *Tilia tomentosa* methanolic extract on growth performance, digestive enzyme activity, immune response and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio*). Marine Science and Technology Bulletin, 7(1): 12-20.

2.Mohamed, G.A., Amhamed, I.D., Almabrok, A.A., Barka, A.B.A., Bilen, S.,&Elbishti, R.T., (2018). Effect of celery (*Apium graveolens*) extract on the growth, haematology, immune response and digestive enzyme activity of common carp (*Cyprinus carpio*). Marine Science and Technology Bulletin,

3.Amhamed, I.D., Mohamed, G.A., Almabrok, A.A.,& Bilen, S., (2018). Efficacy of a *Chenopodium album* extract dietary supplement on the immunological and haematological indices, digestive enzymes secretion and growth performance in juvenile *Cyprinus carpio*. Alınteri, Journal of Agricultural Sciences,

Uluslararası Bilimsel Tolpantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1.Amhamed, I. D., Mohamed, G.A., Bilen, S.,&Almabrok, A.A., (2018). Digestive Enzyme Activity and Growth Performance of Common Carp *(Cyprincus carpio)* Fed Diet Supplemented With Celery (*Apium graveolens*) Extract. International Congress On Engineering And Life Sciences 'ICELIS'. Kastamonu, 26-29 April 2018, TURKEY.

2.Mohamed, G.A., Amhamed, I. D., **Almabrok**, A.A.,& Bilen, S., (2018). Innate immune and hematological responses to *Chenopodium album* methanolic extract in Common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles International Congress On Engineering And Life Sciences 'ICELIS'. Kastamonu, 26-29 April 2018, TURKEY.

3.Mohamed, G.A., Amhamed, I. D., **Almabrok**, A.A., &Bilen, S., (2018). The methanolic extract of *Chenopodium album* and its effect on digestive enzymes activity and the growth performance response in Common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. International Congress On Engineering And Life Sciences 'ICELIS'. Kastamonu, 26-29 April 2018, TURKEY.

4.Amhamed, I. D., Mohamed, G.A., **Almabrok**, A.A., &Bilen, S., (2018). Immune and Haematological Responses of Common Carp (*Cyprincus carpio*) Fed Diet Supplemented With Celery (*Apium graveolens*) Extract. International Congress On Engineering And Life Sciences 'ICELIS'. Kastamonu, 26-29 April 2018, TURKEY.

5. Almabrok, A.A., Mohamed, G.A., Amhamed, I. D.,&Bilen, S., (2018). The Effects of *Tilia tomentosa* on the Growth Performances and Digestive Enzyme Activity in Common Carp (*Cyprinus carpio*). International Congress On Engineering And Life Sciences 'ICELIS'. Kastamonu, 26-29 April 2018, TURKEY.

6. Almabrok, A.A., Mohamed, G.A., Amhamed, I. D., &Bilen, S., (2018). Innate immune and hematological responses to *Tilia tomentosa* methanolic extract in Common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. International Congress On Engineering And Life Sciences 'ICELIS'. Kastamonu, 26-29 April 2018, TURKEY.