

BALIKLARDA BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ

Kürşat KAV^{1@}Osman ERGANIS¹

Immun Sytem of Fish

Geliş Tarihi: 30.10.2007

Kabul Tarihi: 20.12.2007

Özet: Bu derlemede, balıkların bağışıklık sistemi, bağışıklığın alt tipleri, immün cevap, antikor üretimi ve bağışıklık sistemini etkileyen faktörler hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Balık, İmmün sistem, Antikor üretimi

Summary: In this review, fish immun system, subunits of fish immun system, antibody production and the factors which effect the immun system were mentioned.

Key Words: Fish, Immun system, Antibody production

1. Giriş

Balıklarda bağışıklık temel olarak omurgalılarla aynı yapıdadır (Tablo 1). İmmün yanıtta başlıca fark tüm fizyolojik sistemlerde olduğu gibi bağışıklık sisteminin sıcaklığa bağlı değişken yapıda olmasından kaynaklanmaktadır. Balıklarda bağışıklık sistemi temel olarak doğal ve kazanılmış bağışıklık olmak üzere iki ana alt grupta sınıflandırılabilir (Bly ve Clem 1992, Kubilay 1997, Evans 1998, Ellis 1999, Materna 2001).

Yumurtadan yeni çıkan larva balıkların lenfosit ve antikor üretim kapasiteleri sınırlı olduğundan çevresel antijenlere ve hastalıklara karşı dirençleri düşüktür (Tatner 1986, Kubilay 1997, Pastoret ve ark 1998, Ellis 2001).

Agnathans sınıfı balık türlerinin sınıflandırmadaki seviyesinin üzerinde yer alan balıklarda T ve B lenfositler, antijen sunma, Major Histocompatibility Complex (MHC), T cell receptor (TCR), immünoglobulinler, sitokinler ve yardımcı moleküller gibi bütün temel mekanizma ve molekülleri bulunur (Tablo 4) (Newman 1993, Pastoret ve ark 1998, Nakanishi ve ark 1999, Ellis 2001, Magor ve Magor 2001).

2. Balıklarda Bağışıklık Sistemi

2.1. Doğal Bağışıklık

Balıklarda da doğal direnç humoral ve hücresel

faktörlere sahiptir (Tablo 2) (Abbas ve ark 1997, Pastoret ve ark 1998, Ellis 1999, Ellis 2001). Bu mekanizmalar patojenik etkenlere karşı geliştirilmiş, geniş spektrumlu ve kalıcı gerçek engellerdir (Kubilay 1997, Evans 1998). Bu tip bağışıklık sisteminin koruyucu etkisi genellikle invaziv ajanın antijenik yapısıyla direk ilişkili değildir. Balıklarda genel olarak, temel doğal bağışıklık unsurları az geçirgen epidermis, mukus, opsonin etkili ve kanda bulunan kimyasal komponentler ve konakçıyı virüslara karşı koruyan interferonlardır (Warr 1997, Evans 1998, Pastoret ve ark 1998, Ellis 2001).

Doğal bağışıklıkta rol oynayan önemli etmenler arasında yer alan mukus ve epidermis, balıklarda ilk savunma hattını oluşturur. Bu engeller aracılığı ile sağlanan koruma çok etkilidir. Epidermal mukoza hücrelerinden sürekli olarak salınan mukus ve hücre döküntüleri mikroorganizmalar için bir bariyer oluşturur. Mukus içerdiği lizozim enzim analogları ile mikroorganizmaların yerleşmesini ve gelişmesini engelleyici yapıdadır. Pullar, epidermis ve dermis ise fiziksel yaralanmalara ve gelişebilecek muhtemel enfeksiyonlara karşı bir kalkan görevi üstlenmiştir (Kubilay 1997, Evans 1998, Ellis 2001).

2.1.1. Doğal bağışıklığın sıvısal faktörleri

2.1.1.a. İnhibitörler

Bu derleme Selçuk üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen (BAP 2002/003 nolu) "Gökkuşluğu Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) Streptokokkozis (*Lactococcus garvieae*) Hastalığına Karşı Aşı Çalışmaları" isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

1 Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kampüs, Konya-Türkiye
e-posta: kav@selcuk.edu.tr

Tablo 1. Balık ve memeli immün sistemlerinin karşılaştırılması (Newman 1993).

Komponent	Balık	Memeli
İmmünglobülinler	1-2 sınıf	5 sınıf
İmmünglobülin alt sınıfları	Var	Var
Komplement	Var	Var
Anemnestik yanıt	Var (kompleks değil)	Var
B lenfosit	Var	Var
T Lenfosit	Var	Var
Hapten taşıyıcı etki	Var	Var
Lenfokinler	Var	Var
Sıcaklığa bağımlılık	Evet	Hayır
Bağışıklığın gelişimi	Antijene bağlı	Antijene bağlı
Yaşa bağımlılık	Var	Var

a. Transferrin: Birçok patojen tarafından kullanılan ve konakçıda enfeksiyonun oluşturulmasında ve yerleştirilmesinde etkili olan temel element demir (Fe)'dir. Bununla birlikte demirin bir kan proteini olan transferrine yüksek affinite göstermesi ve büyük oranda bu proteine bağlı olarak bulunması nedeniyle omurgalılarda doku sıvısındaki demir düzeyi oldukça düşüktür. Bu nedenle omurgalılarda sadece yüksek oranda demir bağlayabilen sistemlere sahip mikroorganizmalar *in vivo* olarak gelişebilme imkanına sahiptir (Ellis 1999, Evans 1998, Schmidtke ve Carson 2003). Patojen bakteriler konaktaki transferrinden demir elde edebilecek birçok mekanizmaya sahiptir. Bununla birlikte, transferrin yüksek derecede genetik

polimorfizm göstermektedir. Bu şekilde belirli transferrin genotipine sahip konaklarda, bazı belirli bakteriyal patojenlerin transferrinden demir elde etmesine sınırlama getirilebilmektedir. Oregon coho salmon balıklarının bakteriyal böbrek hastalığına karşı gösterdiği direnç buna örnek olarak verilmektedir (Evans 1998, Pastoret ve ark 1998, Ellis 1999).

b. Antiproteaz: Balık plazması başlıca $\alpha 1$ -antiproteinaz ve $\alpha 2$ -makroglobulin olmak üzere birçok proteaz inhibitörüne sahiptir. Patojen bakterilerin birçoğu konak doku proteinlerini kendi aminoasit ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla parçalamak üzere proteolitik enzim üretirler. Örneğin *A. salmonicida* bilinen önemli proteaz üretici bakterilerden biridir (Ellis

Tablo 2. Doğal bağışıklığın hücresel ve sıvısal faktörleri (Ellis 1999).

	Doğal Bağışıklık
	a) İnhibitörler
	Transferrin (farklı genotiplerde)
	Antiproteaz ($\alpha 1$ antiproteaz, $\alpha 2$ makroglobulin)
	Lektinler
	b) Lizinler
Sıvısal Faktörler	Antibakteriyel peptitler
	Proteaz
	Lizozim
	CRP (C reaktif proteinler)
	Komplement (litik, yangısal, şemotaksik ve opsonizasyon faktörü)
	a) Nötrofiller
Hücresel Faktörler	b) Makrofajlar
	c) Makrofaj/ nötrofil

1999). Bu bakteri tarafından üretilen proteaz gökkuşağı alabalıklarındaki a1-antiproteinaz'a karşı dirençli olmasına rağmen, a2-makroglobulin tarafından inhibe edilir. Bu mekanizmanın, *A. salmonicida* enfeksiyonlarında ve a2-makroglobulin'in furunkülozise karşı savunmada önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Freedom 1991).

c. Lektinler: Lektinler bazı şekerlere bağlanabilme yeteneğindeki protein yapısında olan moleküllerdir (Arason 1996, Pastoret ve ark 1998). Birçok balık türünün yumurta, mukus ve serumlarında varlıkları tespit edilmiştir. Chinook salmon yumurtalarında bulunan lektinler *V. anguillarum*, *A. hydrophila* ve *Edwardsiella tarda*'nın gelişimini inhibe etmektedir. Bazı araştırmacılar (Voss ve ark 1978, Yousif ve ark 1994), Coho salmon yumurtalarındaki lektinin *A. salmonicida*'yı aglütine ettiğini belirtmişlerdir.

2.1.1.b. Lizinler

a. Antibakteriyel peptitler: Bunlar düşük moleküler ağırlığa sahip olan ve bakteri hücre duvarının yapısını bozan peptitlerdir. Birçok balık türünün deri salgısından izole edilmişlerdir (Cole ve ark 1997, Ellis 1999).

b. Proteaz: Deri mukusunda bulunan ve tripsin benzeri aktivite gösteren proteazın *V. anguillarum*'u lize ettiği bildirilmiştir (Ellis 1999).

c. Lizozim: Lizozimler bakteri hücre duvarının peptidoglikan yapısını oluşturan N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozaminin arasındaki bağı hidrolize eden enzimlerdir. Lizozim balıklarda mukus, serum ve lökositce zengin dokularda tespit edilmiştir (Ellis 1999).

d. C-reaktif proteinler (CRP): Bakteri, mantar ve parazitlerin yüzey yapılarında yaygın olarak bulunan fosforilkolinle reaksiyona girerek etki etmektedir. CRP'nin omurgasızları da kapsayan birçok hayvan türünde varlığı tespit edilmiştir (Pastoret ve ark 1998). Komplemanı aktive edebilme ve böylece litik ve fagositik mekanizmaları devreye sokabilme kabiliyetindedir. Balıkların normal serumunda oldukça yüksek konsantrasyonlarda tespit edilmiştir (Kodama ve ark 1989, Szalai ve ark 1994). CRP'nin balıkların mukusunda ve derilerinde de bulunabildiği bildirilmektedir (Yano 1996, Claire ve ark 2002).

Gökkuşağı alabalıklarında CRP'nin komplement sistemi aktive ettiği ve *V. anguillarum*'un fagositozisini arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. CRP serum düzeyinin bu patojenle infeksiyonda yaklaşık 3 katı kadar arttığı bildirilmektedir (Murai ve ark 1990).

e. Komplement sistemi: Komplement sistemi savunma mekanizması için merkez olan bir serum protein sistemidir. Teleost sınıfı balık türlerinde memelilerdekine benzer iki farklı komplement yoluna

sahiptir. Bunlar Classical Complement Pathway (CCP) ve Alternative Complement Pathway (ACP) yollarıdır (Sakai 1992, Pastoret ve ark 1998). ACP aktivitesi antikorlardan bağımsızdır. Memeli serumu ile karşılaştırıldığında balık serumunda yüksek düzeydedir. Bu da balıklarda memelilerden daha önemli bir yol olduğunu gösterir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakkarid (LPS) doğrudan Activation Classical Complement Pathway 2 (ACCP2)'yi aktive eder. Bu olay hücre duvarının lizisi ile sonuçlanabilir (Pastoret ve ark 1998, Ellis 1999).

2.1.2. Doğal bağışıklığın hücresel faktörleri

Bakteriyel savunmada fagositik hücreler önemli bir role sahiptir. Bu hücreler bakterileri fagosite ederler ve süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen molekülü üretimi yoluyla bakterileri öldürürler (Evans 1998, Pastoret ve ark 1998, Ellis 1999).

Nötrofil ve makrofajların, lizozomlarında lizozim ve diğer hidrolitik enzimler bulunur. Buna ilaveten, balık makrofajları nitrik oksit de üretmektedir. Bu molekül memelilerde bulunan hidroksil radikali ve peroksinitrillere benzer güçlü bir antibakteriyel ajandır (Secombes ve Fletcher 1992, Pastoret ve ark 1998).

Gökkuşağı alabalıklarında *Y. ruckeri*'nin subletal intraperitoneal enjeksiyonu sonrasında hızlı bir yangısal reaksiyon geliştiği ve yangı bölgesine çok miktarda fagositik hücre göçü olduğu gösterilmiştir (Evans 1998).

2.2. Kazanılmış Bağışıklık

Kazanılmış immün sistemin en belirgin özelliği mükemmel bir spesifiteye ve hafızaya sahip olmasıdır (Warr 1997, Evans 1998, Pastoret ve ark 1998). Memeli ve kanatlılara benzer olarak balıklarda da, kazanılmış immün cevaptan yoksun olan Agnathans sınıfı balık türleri hariç, balıkların diğer tüm türlerinde kazanılmış bağışıklığın bir göstergesi olarak enfeksiyonlara karşı gelişen antikor cevabının oluştuğu bildirilmektedir (Tablo 3) (Warr 1997, Evans 1998). Teleost sınıfı balıklarda ise memelilerdeki makroglobulin veya Immünglobulin M olarak isimlendirilen sınıfa benzerlik gösteren sadece bir sınıf immünoglobulin belirlenmiştir (Pastoret ve ark 1998). Agnathans sınıfı balık türleri seviyesi üzerindeki balıkların sitotoksik T hücre aktivitesine sahip olduğuna inanılmaktadır (Tablo 4). Ancak balıkların temel bağışıklık mekanizmalarına ve gelişmiş omurgalılardaki bazı immün moleküllere (T-B hücreleri, lenfosit işbirliği, antijen sunumu, MHC, TCR, Immünglobülinler,

sitokinler ve ek moleküller) sahip oldukları bilinmektedir (Warr 1997, Pastoret ve ark 1998).

2.2.1. Lenfosit alt tipleri

Balıklarda lenfosit alt popülasyonu üzerinde elde edilen sonuçlar tavuk ve farelerdekine benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmalar (Clem ve ark 1991, Warr 1997, Evans 1998, Pastoret ve ark 1998), Teleost sınıfı seviyesindeki balık türleri timuslarında hem allograf reaksiyona hem de antikor cevabın gelişimine katılan hücrelerin gelişim alanı olduğunu göstermektedir. *In vitro* çalışmalar lenfosit alt tiplerinin plazma membranlarına antijen sunma gibi temel bir görevi olduğunu bildirmişlerdir (Warr 1997, Evans 1998, Pastoret ve ark 1998, Magor ve Magor 2001).

Clem ve ark (1991), kanal kedi balıklarının IgM pozitif hücrelerinin antikor ürettiğini, bellek B hücrelerinin antikor üretmediğini ancak hafıza kabiliyetlerinin olmasından dolayı immün cevabın arttığını, antikor üretiminde etkili olan aksesuar denem üçüncü bir hücre popülasyonunun (monosit-makrofaj) olduğunu da ifade etmişlerdir. Bu aksesuar hücreler antijen tutabilir ve bunları yeniden sunabilirler. Bunların

yanında lenfosit alt tiplerini ayırmak ve tanımlamak için monoklonal antikorların kullanımı sonucunda non immünglobulin kross reaktivitesi ile memelilerde olduğu gibi Teleost sınıfı balıkların B hücrelerinin de yüzey Ig (+) lenfosit alt popülasyonunun olduğu bildirilmektedir (Warr 1997, Evans 1998, Pastoret ve ark 1998).

2.2.2. MHC molekülleri

Balıkların MHC sınıf I ve II moleküllerine sahip olduğu, moleküler genetik yaklaşım yöntemi ile ortaya konulmuştur. Balık MHC molekülleri memeli homologlarına oldukça benzerlik göstermekle beraber bu sınıf moleküllerin polimorfizm karakterlerini de göstermektedir (Dixon ve ark 1995, Warr 1997, Evans 1998, Nakanishi ve ark 1999).

2.2.3. Sitokinler

Balık lenfositlerinin ve aksesuar hücrelerinin sitokinler olmaksızın nasıl haberleştikleri ve fonksiyonları hakkında bilgiler yeterince açıklanamamıştır. Bununla birlikte, Interleukin-1 (IL-1), Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF), Tümör Nekrozis Faktör Beta (TGF) ve sitokin benzeri moleküllerin

Tablo 3. Bakteriyel antijenlere karşı balıklarda şekillenen spesifik unsurlar ve savunma mekanizmaları (Ellis 1999).

Kazanılmış bağışıklık	
a) Antikorlar	
Sıvısal Faktörler	Anti-adhezinler
	Anti-toksinler
	Anti-invasinler
	Klasik yoldan komplemanı aktive edenler
Hücresel Faktörler	Aktive olmuş makrofajlar
	Spesifik T lenfositleri ve antijenler
	Sitokinler (IFN γ , TNF)
	Bakteriyel aktiviteye bağlı makrofaj aktivasyonu

Tablo 4. Balıklarda kazanılmış bağışıklık sistemi (Warr 1997, Evans 1998).

Balık	B Lenfositler		T Lenfositler			
	Antikor	Ig gen düzenleyicisi	Graft reaksiyon	Sitotoksinite	Yardımcı T lenfosit	TCR
Agnathans	-	-	+	-	-	-
Teleost	IgM					+ (α/β)
Chondrichthyes	IgM, IgW, IgR, NAR (C)	Çok segmentli	+	?	?	+ (β/δ)
Osteichthyes	IgM, IgM (Δ Fc) IgD	Çok segmentli Translocon	+	?	+	+
Dipnoi	IgM, IgY (Δ Fc)	?	?	?	?	+

(+) bilinmekte, (-) bilinmiyor, (?) gösterilmemiş veya araştırılmamış

varlığı belirtilmektedir (Tablo 3) (Warr 1997, Nakanishi ve ark 1999, Secombes ve ark 2001).

2.2.4. T lenfosit reseptörleri

Memelilerde T hücre reseptörleri / veya / polipeptit kombinasyonu içeren heterodimerik bir yapıdadır. T hücrelerinin / TCR taşıyan alt tiplerinin fonksiyonları henüz tam olarak anlaşılammıştır. Moleküler klonlama teknikleri ile köpekbalığı, alabalıklar'da, Elasmobranch ve Teleost sınıfı balık türlerinde de ve -TCR polipeptitleri identifiye edilmiştir (Pastoret ve ark 1998, Nakanishi ve ark 1999).

2.2.5. Lenfosit membranının aksesuar molekülleri

Balık lenfositlerinin, lenfosit etkileşimi ve bilgi aktarımını düzenleyen memelilerdekine benzer molekülleri kullanıldığına dair bilgiler bulunmaktadır (Tablo 3). Balıkların hem membran IgM hem de TCR'lerin membran içi segmentleri, Ig veya TCR ile tam bir reseptör kompleksi şekillendiren aksesuar molekülleri ile etkileşim kurdukları bildirilmektedir (Warr 1995, Warr 1997, Evans 1998, Pastoret ve ark 1998, , Magor ve Magor 2001).

Warr (1997), balık lenfositlerinde sinyal aktarım mekanizmasının memeli lenfositlerindeki çok benzediğini ve yayın balıklarının B lenfositlerinin aktivasyonunda kalsiyumun hızla içeri girişi ve sitoplazmik proteinlerin tirozin fosforilasyonunun rol aldığını bildirmiştir.

3. İmmün cevap

Agnathans sınıfı balıklarda kazanılmış immün cevabının olmadığı belirtilirken diğer tüm balık gruplarında bir antikor cevabının oluştuğu gözlenmektedir (Tablo 4). Balıklarda güçlü düzeyde sitotoksik T lenfosit cevabı bildirilmemiştir. Buna rağmen immün hücreler tarafından düzenlenen sitotoksik etkinin diğer formlarının mevcut olduğu tahmin edilmektedir. Genellikle Agnathans sınıfının üzerindeki balıklarda sitotoksik T hücrelerinin bulunduğu bildirilmektedir (Ellis 1999, Secombes ve ark 2001).

3.1. İmmün Cevapta Rol Oynayan Organlar

Memelilerde kan hücrelerinin üretiminden kemik iliği sorumludur. Antikor üretimi ve uyarılması ile ilgili organlar timus, lenf düğümü ve kemik iliği iken balıklar kemik iliğine ve lenf nodüllerine sahip değildirlir (Evans 1998, Ellis 1999). Teleost sınıfı balıklarda

başlıca lenfoid organlar timus, böbrek ve dalaktır (Ellis 1988b, Pastoret ve ark 1998). Timus, genellikle gelişen lenfositlerden oluşur. Diğer vertebralılarda olduğu gibi primer lenfoid organ ve lenfositlerin üretildiği bir havuz olarak kabul edilir. Lenfositler buradan dolaşıma ve diğer lenfoid organlara göç eder (Evans 1998).

Balıklarda antikor üretme yeteneğine sahip B lenfosit hücreleri özellikle ön böbrek ve dalakta yoğunlaşmış olarak bulunurlar. Balıklarda böbrek başlıca antikor üreten organdır. Böbrekler lenfosit ve plazma hücrelerinden zengin hemapoetik dokuya sahiptir ve aynı zamanda antijenleri fagosite eden çok sayıda makrofaj içeren filtrasyon organı olarak görev yapar (Evans 1998, Pastoret ve ark 1998). Gökkuşluğu alabalıklarında en önemli hemapoetik organ anterior böbrek olup çok sayıda blast ve farklılaşmamış hücre bulundurmaktadır. Alabalık böbreğinde, kandan veya diğer organlardan daha fazla sayıda fagositik makrofaj bulunur (Pastoret ve ark 1998).

4. İmmünglobulinler ve Antikor Üretimi

Antikorlar antijenik uyarımlar sonucu vücutta plazma hücreleri tarafından sentezlenen ve homolog antijenle spesifik bir şekilde birleşen glikoprotein karakterindeki immünglobulinlerdir (Abbas ve ark 1997, Evans 1998, Pastoret ve ark 1998).

Balık ve diğer vertebralıların patojen invazyonlara karşı doğal antikor olarak lektine sahip olduğu düşünülmektedir. Memelilerde ki IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE'nin aksine Teleost sınıfı balıklarda makroglobulin veya IgM'e benzeyen tek tür immünglobulin belirlenmiştir (Tablo 4). Teleost sınıfı balıklarda IgM antikorların yanı sıra hiperimmünize edilen havuz Japon balıklarında (*Carassius auratus*) IgG benzeri immünglobulin varlığı da bilinmektedir (Evans 1998, Pastoret ve ark 1998).

Balıklarda virus ve yabancı eritrosit gibi antijenlere karşı aglütinlerin üretildiği gösterilmiştir. Gökkuşluğu alabalığı ve yılan balığı dahil birkaç balıkta, Freund's complete adjuvantı ile antijen enjeksiyonu sonucu aglütinlerin üretiminin arttığı bildirilmektedir (Ellis 1988a, Evans 1998). Presipitan antikorlar çözünmüş antijenlerin presipitasyonuna neden olurlar ve bu nedenle testler agar jellerinde veya selüloz asetat şeritlerinde yapılır. Aşağı yapıllı vertebralılarda presipitin testinde büyük zorluklarla karşılaşılması nedeniyle presipitan antikorlarının pek iyi gelişmediği bildirilmektedir (Pastoret ve ark 1998). Presipitan antikorlar *Lymphocystis* virüsüne karşı doğal olarak enfekte olmuş dere pisilerinde (*Platichthys flesus*) belirlenmiştir. Bununla birlikte diğer doğal enfekte balıklarda presipitinlerin oluşumu ile ilgili büyük farklılıkların olduğu da bildirilmiştir (Evans 1998).

Balık serumlarında virus nötralizan antikorlar da bildirilmiştir. Bu antikorlar virüs partiküllerinin yüzeyine yapışır ve hücreleri enfekte etme kabiliyetlerini engeller (Pastoret ve ark 1998).

Memelilerde antikorlar yüksek konsantrasyonlarda doku sıvısı, mukus, göz yaşı ve sütte bulunur. IgM ve IgG serumda ve doku aralıklarında bulunurken, IgA mukus ve süt sekresyonlarında tespit edilmiştir. Balıklarda ise antikorlar serum, doku sıvısı, sindirim kanalı, deri ile solungaçlardan salgılanan mukus içinde tespit edilmiştir. Ayrıca çeşitli tipteki komplement, lizozim, properdin, hemolizin, presipitan nötralizan antikorlar ve hemagglütinilerinin varlığı da saptanmıştır (Evans 1998, Pastoret ve ark 1998).

5. Bağışıklık Sistemi Üzerine Etki Eden Faktörler

5.1. Çevresel Faktörler

Stres, fizyolojik heamositazisi bozma eğiliminde olan zararlı faktörlere karşı vücudun reaksiyonları olarak tanımlanabilir. Stres, doğal (mevsim, ısı, tuzluluk oranı, güneş ışığı alma süresi, kalabalık vs) ve suni (asit yağmurları, çevre kirlilikleri, el ile tutma vs) olmak üzere iki bölümde incelenebilir. Çok sayıdaki faktör içerisinde kimyasal kirlilik, bakım-besleme şartları ve düşük ısı balıkların streten nasıl etkilendiğini ortaya koymada en çok çalışılan konulardandır. Stres faktörlerinin hem doğal hem de spesifik immün sistem üzerine baskılayıcı etkiler yaptığı gösterilmiştir. Stres faktörlerine kısa veya uzun süreli maruz kalmak, enfeksiyöz hastalıklara karşı predispozisyon oluşturmaktadır. Balıklarda, stres ve enfeksiyöz hastalıklar arasındaki bağlantılar memelilerde olduğu kadar iyi anlaşılmasa da soğuğa maruz kalma, yorgunluk ve kalabalık yetiştirme çeşitli bakteri ve virus enfeksiyonlarına sekonder olarak yol açtığı bilinmektedir (Ellis 1988a, Bly ve ark 1997, Goos ve Consten 2002).

5.2. Stres ve immün cevap

Çevre kirliliği gibi stres faktörlerinin genellikle immünosupressif etkili olduğu bildirilmiştir (Ellis 1988a, Goos ve Consten 2002). Saha çalışmaları chinook salmonlar'da ve minnows'larda polisiklik aromatik hidrokarbon gibi toksik atıkların mitojenik proliferasyonlar, antikor üretimi ve makrofaj fonksiyonunu baskıladığını ortaya koymuştur (Bly ve ark 1997). Diğer yandan zebrafish'lerde bakırın makrofaj fagositozisi yeteneğini azaltırken çinkonun bu fonksiyonu güçlendirdiği de bildirilmektedir (Rougier ve ark 1994). Bunun yanı sıra bazı doğal faktörlerin de stres oluşturabileceği bildirilmiştir (Bly ve ark 1997).

Alabalıkların temiz sulardan çiftlik ortamına taşındıklarında değişen ortam tuzluluk seviyesi nedeniyle aşırı kortizol salgılamaları buna örnek verilebilir. Yine benzer şekilde tuzluluk seviyesindeki ani değişiklikler *Y. ruckeri* enfeksiyonlarında antikor salınımını baskılar. Tuz seviyesinin belirli bir periyod (30 gün) içerisinde tedricen yükselmesine bağlı olarak alabalıklarda kan kortizol seviyelerinde yükselme görülmediği, immünoglobülin üretiminin ise baskılandığı bildirilmektedir (Goos ve Consten 2002). Bu sonuçlar ile balıklarda glukokortikoid salınımına bağlı olmayan bir nöroendokrin immünosupresyonun gelişebileceği bildirilmektedir (Goos ve Consten 2002).

Birçok su canlısı aşırı tuzluluk veya tuzluluk değişimine maruz kalmamaktadır. Balıklar başta olmak üzere su ürünlerini etkileyen başlıca stres faktörleri mevsim, ısı, ışık periyodu, kalabalık yetiştirme, suni ortam stresi, yakalama-bırakma ile ilgilidir. Yakalama veya sınırlı bir alanda yetiştirme (hapsetme)'nin etkisi birçok balık türü üzerinde çalışılmış ve genellikle immünosupressif etkili olduğu tespit edilmiştir (Elsaesser ve Clem 1994, Schreck ve ark 1995, Goos ve Consten 2002). İmmünosupresyonla ilişkili birçok akut stres faktörü (balıklarda ve diğer türlerde) genellikle yükselmiş glukokortikoid ve ACTH seviyeleri ile ilişkilidir (Small ve Bilodeau 2005, Balm ve Pottinger 1995). Laboratuvar çalışmaları ekzojen olarak kortizol verilen kedi balığı (Elsaesser ve Clem 1994) ve alabalıklarda (Espelid ve ark 1996) genellikle yakalama ile oluşan etkinin benzerinin refleksi olarak şekillendiği ve immünosupresyon geliştiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, yayın balıklarında immün sistem üzerinde sıcaklığın etkisinin yukarıda bahsedilen ve yakalama (el veya ağ ile yakalama) ile oluşan stresin etkisinden farklı olduğu bildirilmektedir. Yayın balıklarında yakalamaya bağlı olarak nötrofil, lenfopeni ve serum glukoz düzeylerinde yükselme gösterirken, düşük sıcaklıklarda bu değişimler gözlenmemektedir (Bly ve Clem 1992, Small ve Bilodeau 2005). Bununla birlikte yakalamayla karşılaştırıldığında, sıcaklık değişimine bağlı olarak gelişen immün fonksiyonun kaybının ortadan kalkması ve immün özelliklerin geri kazanılması daha uzun süre almaktadır (Bly ve Clem 1992, Davis 2004). Mevsimsel ısı değişikliklerinin lenfosit proliferasyonunu etkilediği de bildirilmektedir. Proliferasyon kış ayları sırasında oldukça düşüktür. Diğer yandan, alternatif yolların (komplement sistem gibi) ve fagositik aktivitenin ise düşük su ısılarında yükseldiği de bildirilmektedir (Collazos ve ark 1995). Sonuç olarak, mevsimin immün sistem üzerindeki etkisi göz önüne alındığında, düşük su sıcaklıklarında kazanılmış immün cevabın (hücresel bağışıklık sistemi) baskılandığı bildirilmektedir (Bly ve Clem 1992, Stuge ve ark 1995). Bununla birlikte ısının non-spesifik immün cevap üzerindeki etkisi ise hala tartışmalıdır. Bazı çalışmalar immün aktiviteyi arttırdığını gösterirken,

çalışmaların çoğunda ise immün supresyonun geliştiği bildirilmiştir (Bly ve Clem 1992).

5.3. Stres faktörleri, homeostazis ve hastalık etiyojisi arasındaki ilişki

Stres faktörleri sadece immün sistemi etkilememekte, aynı zamanda homeostazisi de birçok farklı mekanizma ile bozabilmektedir. Bly ve Clem (1992), kanal kedi balıklarında su sıcaklıklarındaki ani düşüşün sadece immün fonksiyonu etkilemediğini aynı zamanda dermisteki mukus hücre göçünü de önemli ölçüde yavaşlattığını ortaya koymuştur. Bly ve ark (1997), sadece düşük ısı stresinin bile tek başına epiderminin süperfisial katındaki mukus hücre sayısının normalin %50'si kadar azalttığını bildirmektedir. Gökkuşluğu alabalıklarında kortizolün etkisine bağlı şekillenen deri değişiklikleri üzerine yapılan bir diğer çalışma sonuçları ise mukus hücrelerinde apoptozis arttığını ortaya koymuştur (Iger ve ark 1995). Balıklarda mukus, savunma mekanizmasının ilk tabakasıdır ve strese bağlı olarak bu savunma kalkanın zayıflaması, enfeksiyöz hastalıklara karşı riski artırmaktadır (Bly ve ark 1997).

5.4. Su sıcaklığı

Sığır serum albümini (BSA) ile immünize edilen sazan balıkları 12 °C'de tutulduğunda hiçbir antikor titresi elde edilmemesine rağmen, 25 °C'de tutulanların antikor titrelerinde artışlar tespit edilmiştir. Sıcaklığın immün yanıtı olan etkisi üzerine yapılan çalışmalar, antikor üretiminin suyun sıcaklığına bağlı olduğunu ve yüksek sıcaklıklarda antikor üretiminin arttığını göstermiştir (Anderson 1974, Ellis 1988b, Austin ve Austin 1999). Bu durum düşük sıcaklıkta T-supresör hücre proliferasyonunun artmasına bağlı olarak plazma hücreleri tarafından üretilen antikor miktarının azalmasından kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Mannig ve Mughal 1985).

Gökkuşluğu alabalıklarında kızıl ağız hastalığı (ERM) ile ilgili olarak yürütülen immersiyon çalışmalarında, fenolle inaktive edilen Yersiniozis etkeninin enjeksiyonla uygulama sonrasında, 17 °C'de tutulan balıkların 3 hafta sonra serumlarında yüksek aglütinasyon titresi bulunduğu, 9 °C'de tutulan balıklarda ise spesifik serum aglütininlerine rastlanmadığı bildirilmektedir (Anderson 1974, Austin ve Austin 1999).

5.5. Vücut ağırlığı

Genellikle salmonid balıklar, 0.5 g ağırlığının altında (10 °C'de) aşılandıklarında koruyucu bağışıklık geliştirmemektedir. Bir çok salmonid türde 1 g ağırlıktan daha yüksek seviyede koruma gelişirken, tam immünizasyon balık ancak 2.5 g ağırlığa ulaştığında

gelişmektedir. Bu nedenle balığın vücut ağırlığının immün savunmada önemi fazladır. Farklı sıcaklıklarda yetiştirilen balıklarda büyüme oranı farklı olduğu için, bağışıklık yaş ile ilgili olmayıp vücut ağırlığına bağlıdır (Johnson ve ark 1983, Ellis 1988b). Kızıl ağız ve vibriosis'e karşı aşılama ile oluşturulan koruyucu bağışıklığın, balığın ağırlığına bağlı olarak arttığı ve gelişen bağışıklığın 1 gramlık balıklarda 1 yıldan fazla sürede koruyucu seviyenin üzerinde kaldığı ve erginlik dönemine kadar uzayabildiği bildirilmektedir (Johnson ve ark 1983, Ellis 1988b).

5.6. Beslenmenin etkisi

Aşılamada yeterli düzeyde immün yanıt oluşumu, balığın sağlıklı ve iyi kondüsyonda olmasına bağlıdır. Bu nedenle balığa besin ihtiyacının karşılanması için dengeli bir rasyonun temin edilmesi gerekir. Ticari yemler ile sazan, gökkuşluğu alabalığı, Atlantik salmonu ve kanal yayın balıklarının ihtiyacı karşılanabilmektedir (Ellis 1988a, Landolt 1989).

Kanal yayın balıklarının yavrularında, *Edwardsiella ictaluri* antijenlerine karşı farklı miktarda C vitamini verilmesi ile C vitamini miktarına bağlı olarak antikor yanıtında belirli bir artma tespit edilmiştir (Ellis 1988a).

5.7. Antijen

Antijenler vücutta spesifik antikor sentezini uyaran ve meydana gelen antikorlarla özel reaksiyon verebilen moleküllerdir (Evans 1998).

5.7.1. Antijenin fiziksel durumu

Memelilerde antijenin fiziksel yapısı, immünojenik veya tolerejenik özelliği ile ilgilidir. Balıklarda da antijenin uygulanış şekli oldukça önemlidir. Balıklarda antijen genellikle immersiyon (banyo) şeklinde uygulanmaktadır. Antijenin fiziksel yapısı, alınımında ve bağışıklık şekillenmesinde etkili olmaktadır. Gökkuşluğu alabalıklarında antijenin solungaçlardan alındığı, eriyik halindeki antijenin alınmasında ise partiküler taşıyıcıların (Lateks tanecikleri) bu işlemi çok kolaylaştırdığı bildirilmektedir (Mannig ve Mughal 1985).

Antikor üretimi için genellikle eriyik protein antijenlerinin adjuvant içinde verilmesi gerekir. Sazanlara BSA, Freund's incomplete adjuvantı içinde enjekte edildiği zaman immünojenik etki şekillendiği halde, fizyolojik tuzlu su içinde verildiğinde bu etkinin şekillenmediği tespit edilmiştir. Antijenlere karşı şekillenen bağışıklık balık türlerine göre değişmektedir. BSA Tilapia için iyi bir antijen olduğu halde, gökkuşluğu alabalığı için adjuvant içinde enjekte edildiğinde dahi

zayıf bir bağışıklık elde edilebilmektedir (Avtalion 1981, Mannig ve Mughal 1985).

5.7.2. Antijenin dozu

Primer immün yanıtta antikor üretiminin seviyesi genellikle uygulanan antijen dozu ile ilgilidir (Tatner ve ark 1987, Ellis 1988a). Bazı antijenlerin çok yüksek dozlarda enjeksiyonunda balığın tolerans oluşturabildiği gözlenmiştir (Ellis 1988a, Ellis 1988b).

5.7.3. Antijenin verilmiş yöntemleri

Balıklarda en iyi bağışıklık, immünojenin enjeksiyonu yolu ile elde edilir. Bu yöntemi etkinlik açısından sırasıyla banyo ve oral yöntem izlemektedir. *Y. ruckeri* antijeni kanal yayın balıklarına intraperitoneal, intramüsküler ve intraözefagal verildiğinde en düşük antikor titresini, intraözefagal verilen balık grubunda elde edilmiştir (Ellis 1988a). *Y. ruckeri*'ye karşı aşılmalarda ise enjeksiyon yönteminin banyo yöntemine göre çok daha iyi bir bağışıklık sağladığı bildirilmiştir (Johnson ve Amend 1983). Antijenin intramüsküler enjeksiyonu ile intraperitoneal enjeksiyon göre biraz daha yüksek antikor titresini elde edildiği de bildirilmektedir (Ellis 1988a).

Oral immünizasyon sonucunda serumda genellikle antikora rastlanmamaktadır. Fakat antikorun sindirim kanalı mukusunda ortaya çıktığı bildirilmiştir (Ellis 1988b). *A. salmonicida* ile oral yolla aşılana balıklara sonradan antijenin intraperitoneal olarak uygulanması durumunda, serum antikor titresinin oral immünizasyondan kaynaklanan baskılayıcı T (suppressor) hücrelerin etkisiyle baskı altına alındığı bildirilmektedir (Ellis 1988a). Ancak, yem ile birlikte verilen *Vibrio* aşısında sistemik supresyona neden olmamıştır. Oral aşılamadan 4 hafta sonra kanda aglutinin antikorlar oluştuğu bildirilmektedir (Ellis 1988b).

5.7.4. Antijenik yarış

Antijenik yarış, bir antijene karşı oluşturulacak immün yanıtın diğer bir antijen uygulanması ile inhibe olmasıdır. Balıklarda iki farklı gamaglobülin birlikte veya eritrositlerin viruslarla birlikte verilmesi genellikle bu tip bir reaksiyona yol açmaktadır. Diğer yandan salmonid balıklarda bakteriyel antijenlerin çeşitli kombinasyonları ile yapılan uygulamalarda koruyucu bağışıklığın oluşmasında engelleme tespit edilmemiştir (Larsen 1988, Ellis 1988a). Bu nedenle, balıklarda antijenik yarışmanın varlığının tespit edilmesine rağmen, polivalan aşılarla yeterli koruyucu etkinin oluşmasında bir engelleme görülmemektedir (Larsen 1988, Ellis 1988a).

6. Bağışıklık Sistemi Üzerine Etki Eden Diğer Faktörler

Antikor üretimi, balıklarda antijenle ilk kez veya müteakip karşılaşmasına bağlıdır. Teleost sınıfı balıklarda klasik primer ve sekonder cevaplarda antikor seviyesinin ulaştığı en yüksek titre memelilerle mukayese edilebilecek özelliktedir. Balıklar genellikle uzun bir üretim fazına sahiptirler ve antikor titresindeki yükselmenin memelilere ve kuşlara göre daha yavaş olduğu bildirilmiştir. Genellikle ılık sularda yaşayan balıkların antikor üretimi için sıcak sularda yaşayan türlere göre daha uzun üretim fazına sahip oldukları kabul edilmektedir (Kubilay 1997, Pastoret ve ark 1998).

Ektotermik vertebralılarda antikor üretimini çeşitli çevresel ve fizyolojik faktörler etkilemektedir. İmmün yanıt bütün ektotermik vertebralılarda sıcaklığa bağlıdır ve düşük sıcaklık antikor üretimini geciktirir veya tamamen durdurur (Pastoret ve ark 1998). İmmün yanıtın oluşturulmadığı sıcaklık derecesi türlere ve onların yaşadıkları doğal çevre sıcaklığına göre değişiklik gösterir. Aynalı sazan gibi ılık su balıklarında 12 °C'nin altında antikor üretilemezken, gökkuşacağı alabalıkları 5 °C gibi düşük sıcaklıklarda bile antikor üretebilmektedir (Ellis 1988a).

6.1. Adjuvantlar ve immünoestimulanlar

Balıklarda sonradan kazanılan bağışıklığı arttırmak için bir çok kimyasal ve biyolojik madde (Montanide-ISA-763-A, Montanide-IMS-2212, Carbomer ve Aquamun, Freund's complete ve incomplete, vs) adjuvant olarak kullanılmaktadır (Mannig ve Mughal 1985, Anderson 1992, Erganiş ve İstanbulluoğlu 1999, Kav 2005). Ancak adjuvantın kullanılması enjeksiyon yerinde nekrotik veya granülomatoz lezyonlara neden olmakta ve pazarlamada sıkıntı oluşturmaktadır (Ellis 1988a, Anderson 1992, Kav 2001). Balıklarda etkili olarak kullanılan diğer adjuvantlar arasında banyo yolu ile uygulanan DMSO (Dimetil sülfoksit) ve intravenöz enjeksiyonla verilen deniz tunicate (*Ecteinascidia turbinata*) ekstraktı (ETE)'da bulunmaktadır (Ellis 1988a).

6.2. İmmün cevabı baskılayan faktörler

Balıklarda ağır metaller, organik çözücüler ve pestisitler immün yanıtı etkilemektedir (Landolt 1989). Balıklarda çeşitli hastalıkların ortaya çıkması, balık yoğunluğu, dokunma gibi strese neden olan faktörlerle ilgilidir (Avtalion 1981, Möck ve Peters 1989). Stresin kortikosteroid salgılanmasını artırarak immün baskı yaptığı bildirilmektedir (Anderson ve ark 1982, Ellis 1988b). *Y. ruckeri*'ye karşı banyo yolu ile aşılana gökkuşacağı alabalıklarına kortikosteroidin intraperitoneal enjeksiyonu, kan dolaşımında bulunan antikor üreten hücre sayısında azalmaya ve antikor titresinin

düşmesine sebep olmuştur (Mannig ve Mughal 1985). Oksitetrasiklinlerin *in vivo* olarak immün reaksiyonlar üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu bildirilmiş ve bu etkinin fagositik makrofajlar ile B ve T lenfositleri arasındaki etkileşime bağlı olduğu bildirilmiştir (Ellis 1988b).

7. Sonuç ve Öneriler

Balıkların immün sistemi memeli immün sisteminden çok büyük farklılıklar göstermemekle birlikte kendilerine özel (sıcaklık, antikor ve antijen tipi, uyarılma yolu vs) immün sistemlerinin varlığında tespit edilmiştir.

Kaynaklar

- Abbas AK, Lichtman AH and Poper JS (1997) Cellular and molecular immunology saunders text and Review seri. Third edition W.B. Saunders Company London, UK.
- Anderson DP (1974) Fish Immunology. T. F. H. Publication Inc. Ltd. Neptun City, New Jersey, U.S.A
- Arason GJ (1996) Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. Fish Shellfish Immunol 6, 277-289.
- Austin B and Austin DA (1999) Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish. Second Edition Ellis Norwood Ltd. London, UK.
- Avtalion RR (1981) Environmental control of immune response in fish. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2, 2, 163-188.
- Balm PHM and Pottinger TG (1995) Corticotrope and melanotrope POMC-Derived peptides in relation to interrenal function during stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol. 98, 3, 279-288.
- Bly JE and Clem LW (1992) Temperature and teleost immune function. Fish Shellfish Immunol 2, 159-171.
- Bly JE, Quiniou SM-A and Clem LW (1997) Environmental effects on fish immune mechanisms. Dev Biol Stand 90, 33-43.
- Claire M, Holland H and Lambris JD (2002) The complement system in teleosts. Fish Shellfish Immunol 12, 399-420.
- Clem LW, Miller NW and Bly JE (1991) Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities. Phylogenesis of Immune Functions. 191-213.
- Cole AM, Weis P and Dizmond G (1997) Isolation and characterisation of pleurocidin, an antimicrobial peptide in skin secretions of winter flounder. J Biol Chem. 272, 12008-12013.
- Collazos ME, Barriga C and Ortega E (1995) Seasonal variation in the immune system of the cyprinid Tinca tinca. Phagocytic functions. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 18, 105-113.
- Davis KB (2004) Temperature affects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 139, 4, 433-440.
- Dixon B, Van Erp SH, Rodrigues PN, Egbert E and Stet RJ (1995) Fish major histocompatibility complex genes: an expansion. Dev Comp Immunol 19, 109-133.
- Ellis AE (1988a) Fish vaccination. Academic Press, London, UK
- Ellis AE (1988b) Ontogeny of the immune system in teleost fish, Academic Press, London, UK.
- Ellis AE (1999) Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol 9: 291-308.
- Ellis AE (2001) Innate host defence mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev Comp Immunol 25, 827-839.
- Ellsaesser CF and Clem LW (1994) Functionally distinct high and low molecular weight species of channel catfish and mouse IL-1. Cytokine 6, 10-20.
- Erganiş O ve İstanbulluoğlu E (1999) İmmünoloji, 2. Baskı, S.Ü. Veteriner Fakültesi Basım Ünitesi, KONYA.
- Espelid S, Lokken GB, Steiro K And Bogwald J (1996) Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar*L.). Fish Shellfish Immunol, 6, 2, 95-110.
- Evans HD (1998) The Physiology of Fishes. Second Edition, CRC Press Boca Raton, New York, USA.
- Freedom SJ (1991) The role of α 2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. Comp Biochem Physiol 98, 549-553.
- Goos HJTh. and Consten D (2002) Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. Mol Cell Endocrinol. 197,1-2, 105-116.
- Iger Y, Balm PHM, Jenner HA and Wendelaar Bonga SE (1995) Cortisol induces stress-related changes in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol, 97,2, 188-198.
- Johnson KA, Flynn JK and Amend DF (1983) Onset of immunity in salmonid fry vaccinated by direct immersion in *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. J Fish Dis. 5, 207-213
- Kav K (2001) Balıklarda aşılama çalışmaları. Doktora semineri II, S. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, KONYA.
- Kav K (2005) Gökkuşluğu Alabalıklarının (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum 1792) Streptokokkozis (*Lactococcus garvieae*) Hastalığına Karşı Aşı Çalışmaları. Doktora Tezi, S. Ü. Sağlık

Bilimleri Enstitüsü, KONYA.

Kodama H, Yamada F, Murai T, Nakanishi Y, Mikami T and Izawa H (1989) Activation of trout macrophages and production of CRP after immunisation with *Vibrio anguillarum*. *Dev Comp Immunol*, 13, 123–132.

Kubilay A (1997) Gökkuşığı alabalıklarında patojen bakteri *Yersinia ruckeri*'ye karşı antikor üretimi ve tespiti üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, ISPARTA.

Landolt ML (1989) The Relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture*, 79, 193-206.

Larsen JL (1988) A successful vaccination trial with a trivalent vaccine. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 8, 4, 82-84

Magor BG and Magor KE (2001) Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Dev Comp Immunol*, 25, 8-9, 651-682.

Mannig MJ and Mughal MS (1985) Factors affecting the immune responses of immature fish in: *Fish Shell Pathol*. Academic Press, London, UK.

Materna E (2001) Temperature interaction, prepared as part of EPA region on temperature water quality criteria guidance development project. United States Environmental Protection Agency, 1-33.

Möck A and Peters G (1989) Lysozyme activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) stressed by handling and transport. IV. EAAP International Conference, Diseases of fish and Shellfish, 24-28, (Book of Abstract) Spain.

Murai T, Kodama H, Nakai M, Mikami T. and Izawa H (1990) Isolation and characterisation of rainbow trout C-reactive protein. *Dev Comp Immunol* 14, 49–58.

Nakanishi T, Aoyagi K, Xia C, Dijkstra JM and Ototake M (1999) Specific cell-mediated immunity in fish. *Vet Immunol Immunopathol*, 72, 101-109.

Newman SG (1993) Bacterial vaccines for fish. *Ann Rev Fish Dis*, 3, 145-185.

Pastoret PP, Griebel P, Bazin H and Govaerts A (1998) Handbook of vertebrate immunology. Academic Press, OH, USA.

Rougier F, Troutaud D, Ndoye A and Deschaux P (1994) Non-specific immune response of zebrafish, *brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) following copper and zinc exposure. *Fish Shellfish Immunol*, 4, 2, 115-127.

Sakai DK (1992) Repertoire of complement in immunological defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease*, 223-247.

Schmidtke LM and Carson J (2003) Antigen recognition by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

of whole cell proteins expressed by *Lactococcus garvieae* when obtained directly from fish and under iron limited culture conditions. *Veterinary Microbiology*, 93, 63-71.

Schreck CB, Jonsson L, Feist G and Reno P (1995) Conditioning improves performance of juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, to transportation stress. *Aquaculture*, 135, 1-3, 99-110

Secombes CJ and Fletcher TC (1992) The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 53-71.

Small BC and Bilodeau AL (2005) Effects of cortisol and stress on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) pathogen susceptibility and lysozyme activity following exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *Gen Comp Endocrinol*, 142, 1-2, 256-262.

Stuge TB, NW Miller and LW Clem (1995) Channel catfish cytotoxic effector cells from peripheral blood and pronephroi are different. *Fish Shellfish Immunol*, 5, 6, 469-471.

Szalai AJ, Bly J E and Clem LW (1994) Changes in serum concentration of channel catfish (*Ictalurus punctatus* Rafinesque) phosphorylcholine – reactive protein (PRP) in response to inflammatory agents, low temperature shock and infection by the fungus *Saprolegnia* sp. *Fish Shellfish Immunol*, 4, 323–336.

Tatner MF (1986) The Ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 12, 93-105.

Tatner MF, Adams A and Leschen W (1987) An analysis of primary and secondary antibody response in intact and tyhmectomized rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to human gamma globulin and *Aeromonas salmonicida*. *J. of Fish Biol.* 31: 177-195

Yano T (1996). The nonspecific immune system: Humoral defence. In the fish immune system: organism, pathogen and environment. San Diego, Academic Press. 105–157.

Yousif AN, Albright LJ and Evelyn TPT (1994) Purification and characterisation of a galactose-specific lectin from the eggs of Coho Salmon *Oncorhynchus kisutch* and its interaction with fish pathogens. *Abstract Dis Aquat Org*, 20, 127-136.

Voss Jr EW, Fryer JL and Banowitz GM (1978) Isolation, purification and partial characterisation of a lectin from chinook salmon ova. *Arch Biochem Biophys*, 186, 25-34.

Warr GW (1995) The immunoglobulin genes of fish. *Dev Comp Immunol*, 19, 1-12.

Warr GW (1997) The adaptive immune system of fish. *Dev Biol Stand*, 90, 15-21.