

BALIKLARDA AŞILAMA TEKNİKLERİ*

Kürşat Kav @ 1

Osman Erganiş¹

Vaccination Techniques in Fish

Özet: Son yıllarda, kültür balıkçılığında çeşitli bakteriyel ve viral hastalıklara karşı aşıların kullanımı giderek artmaktadır. Yaygın olarak kullanılan enjeksiyon ve/veya immersiyon (daldırma) aşılar, etkeninin formaldehit ile inaktive edilmesi sonucu elde edilen bakterin aşısından hazırlanmaktadır. Aşılar, özellikle iç sularda ve denizlerde kültürü yapılan balıklarda problem olan bakteriyel (*Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*, *Yersinia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Streptococcus spp.*) ve viral enfeksiyonlara (Viral Hemorajik Septisemi (VHS), İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis (IHN), İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis (IPN), vs) karşı mücadelede etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Bu derlemede kültür balıkçılığında problem olan enfeksiyonlara karşı geliştirilen aşılama yöntemleri ile bağışıklık mekanizmaları sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Akuakültür, Balık, Aşılama teknikleri.

Summary: In recent years, fish vaccines are heavily used in aquaculture against bacterial and viral infections. Injection and/or immersion type vaccines that are used commonly are prepared by inactivation of antigen with formaldehyde. Vaccines are used effectively against bacterial (*Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*, *Yersinia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Streptococcus spp.*) and viral infections (*Viral haemorrhagic septicaemia* (VHS), *Infectious Hematopoietic Necrosis* (IHN), *Infectious Pancreatic Necrosis* (IPN), etc) in aquaculture and sea water. In this review, vaccination techniques and mechanisms of immunization are described in aquaculture.

Key Words: Aquaculture, Fish, Vaccination Techniques.

Giriş

Balıklarda aşılama çalışmaları son 20 yıl içerisinde ve özellikle alabalık çiftliklerinde önemli kullanım alanı bulmuştur (Gudding ve ark 1999, Kav 2001).

Balıkların çeşitli bakteriyel patojenlere karşı oluşturduğu immün cevap üzerine yapılan ilk çalışmalarda; *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas punctata* ve *Bacterium salmonicida*'ya (*Aeromonas salmonicida*) karşı antikor üretme yeteneklerinin olduğu gösterilmiştir. Duff (1942) furunculosisin sebebi olan *B. salmonicida* ile yaptığı çalışmada, balıklarda meydana gelen antikorun koruyucu immün cevap oluşturduğunu ilk kez ortaya koymuştur (Evelyn 1997, Gudding ve ark 1999, Vinitnantharat 1999). Balıkların aşılmasına yönelik tekniklerin yerleşmesi ve etkin bir şekilde kullanılması 1970'li yıllardan sonra başlamıştır (Austin ve Austin 1999).

Rutin aşılama tekniklerinin uzun süre kullanılmamasının başlıca sebebi 2. Dünya savaşını

mütakip piyasaya çıkarılan yeni antimikrobiyal ajanların balık hastalıklarında başarılı ve etkin bir şekilde kullanılmaya başlamasına bağlanmaktadır. Kemoterapi dönemi olarak adlandırılan bu periyot esnasında, balık hastalıklarının kontrolünde yetersiz de olsa bir başarı elde edilmiştir. Bu dönemde beslenmeyle uygulanan antimikrobiyel ajanlardan sülf grubu ilaçlar, antibiyotikler, nitrofuranlar ve kalomel (merkür) gibi ilaçlar kullanılmakla birlikte formalin, potasyum permanganat, malaşit yeşili, kuartorum amonyum bileşikler, katyonik herbisitler (Diquat) ve pirdilmerkürük asetat gibi dezenfektanlar da hastalık kontrolünde başarıyla kullanılmıştır (Kav 2001).

Zamanla, kemotropinin yüksek maliyetli olması, korumasının yetersiz kalması, direncin gelişmesi, viral hastalıklara karşı etkisiz olması, çoğu ajanın insan ve çevre sağlığına zararlı olabileceği ve kemoterapotiklerin balıktan atılımı için belli bir süre beklenilmesi gerekliliği gibi nedenlerden dolayı aşılamalara karşı ilgi giderek artmıştır (Evelyn 1997).

Geliş Tarihi: 31.05.2007 @: kav@selcuk.edu.tr

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

1. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kampüs, KONYA

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

Balıklarda Aşılama Yöntemleri

Balıklarda aşılama yöntemleri; immersiyon, oral ve enjeksiyon olarak 3 ana metod altında toplanmıştır (Ellis 1988, Gudding ve ark 1999, Vinitnantharat 2001, Kav 2005).

Tablo 1. Balıkların immünizasyonunda kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması.

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

İmmersiyon ile Aşılama

İmmersiyon; etkili, güvenli ve kolay uygulanabilir bir aşılama yöntemidir. Özellikle ilk aşılama tercih edilmekte, küçük boy veya yavru balıklarda daha az kayba neden olmaktadır (Tatner ve Horne 1985, Vinitnantharat 2001, Türkyılmaz ve Travoğlu 2002, Kav 2005). Bir çok bakteriyel enfeksiyona (*Yersiniozis*, *Vibriosis*, *Furunkülozis* vs) karşı günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Daha az strese neden olması, maliyetinin düşüklüğü, güvenilirliği ve tek seferde bir çok balığın aşılanabilmesine imkan tanınması başlıca avantajlarıdır (Austin 1984, Gudding ve ark 1999, Romoren ve ark 2002b). Sprey, direk daldırma, hiperozmotik daldırma ve basınçlı su uygulamasından oluşan bu yöntemin, antijen alımı ve koruma mekanizmaları kesin olarak bilinmemektedir (Austin 1984, Nakanishi ve Otake 1997, Gudding ve ark 1999). Hiperozmotik daldırmalar tuz, üre veya % 2 Bovine Serum Albumin (BSA) gibi maddeler içerdiğinden direkt daldırmadan daha zararlı ve stresli olmaktadır. Ayrıca küçük balıklar için hiperozmotik ve

direkt daldırmalar, büyük balıklar için ise sprey aşılar daha ekonomiktir. Bu yöntemle çok sayıda balık daha düşük maliyetle aşılanabilmektedir. Diğer taraftan, enjeksiyonla daha az miktardaki aşı ile daha iyi koruma sağlanabilmektedir (Austin 1984, Ellis 1988, Nakanishi ve Otake 1997, Gudding ve ark 1999).

Antijen alınımını etkileyen çeşitli faktörler arasında; aşı konsantrasyonu, daldırma süresi, balığın boyutu, stres, pH, su sıcaklığı, adjuvant, antijenin suda dağılılabileceği kapasitesi ve tuz konsantrasyonları sayılabilir. Bunların içerisinde antijen konsantrasyonu en önemli faktördür (Nakanishi ve Otake 1997, Moore ve ark 1998, Romoren ve ark 2002a).

Hiperozmotik daldırma tekniğinde alabalıklar, %2 BSA içeren NaCl ya da üreli suda 3 dakika ve yine %5.23'lük NaCl solüsyonuna 2 dakika süreyle daldırılır ve sonrasında %2'lik BSA'da 3 dakika süreyle tutulur. Bu metod, balıklarda immersiyon metodunun temelini oluşturmuştur (Nakanishi ve Otake 1997). Antipa ve ark (1980) Direkt metod ile hiperozmotik infiltrasyon tekniği karşılaştırıldıklarında, düşük bakterin düzeylerinde hiperozmotik aşılama tekniğinin daha etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte hiperozmotik infiltrasyon metodu balıklarda solungaç ve deride hasara ve strese neden olduğu için bir çok aşı direk daldırma metodu ile uygulanmaktadır (Nakanishi ve Otake 1997, Moore ve ark 1998). Ayrıca banyo, daldırma ve flaş ekspozur metodlarının koruyucu özelliklerinin sprey, direk daldırma ve hiperozmotik infiltrasyon (daldırma) tekniklerine göre daha avantajlı olduğu ortaya konmuştur. Başlıca dezavantajı ise uygun korumayı sağlayabilecek konsantrasyonu elde etmek için kullanılacak aşı miktarının belirlenmesinin zor olmasıdır. Ancak bu problemin de uygulama süresi uzatılarak aşılabildiği bildirilmektedir (Ellis 1988, Nakanishi ve Otake 1997, Moore ve ark 1998). Dilüe edilmiş aşı solüsyonlarında zamanın uzatılması ile antijen alınımı arasında bir ilişki olduğu ifade edilmektedir. Gerek balığın büyüklüğü ve gerekse daldırma metodu, yaştan daha önemli faktörlerdir. Buna göre balık ne kadar büyükse korumanın da o kadar uzun olacağı kabul edilmektedir (Ellis 1988, Evelyn 1997, Nakanishi ve Otake 1997, Warr 1997).

Antijen alınımında sadece fagositik hücreler değil epitel hücreler de rol oynamaktadır. Daldırma aşılamalardan sonra lokal immüniteyi etkileyen koruma mekanizmaları üzerine humoral immünitenin ne derece katkıda bulunduğu bilinmemektedir (Thorburn ve Janssen 1988, Nakanishi ve Otake

Tablo 2. İmmersiyon aşılama metotlarına ait oluşan antikor titreleri ve Nisbi Koruma Yüzdelерinin (NKY) karşılaştırılması (Austin 1984).

Kullanılan metot	Bakteri	Antikor titresi	*NKY
Daldırma (30-120 sn)	<i>A. hydrophila</i>	-	98
	<i>A. salmonicida</i>	-	~48
	<i>E. ictaluri</i>	-	100
	<i>E. tarda</i>	-	50
	<i>V. anguillarum</i> ; <i>V. ordalii</i>	-	100
	<i>Y. ruckeri</i>	-	71
Banyo (aşırı dilue edilmiş) en az 1 saat	<i>V. anguillarum</i> ; <i>V. ordalii</i>	-	-
Sprey-Duş	<i>Pfiesteria piscicida</i>	1:4-1:128	100
	<i>V. anguillarum</i> ; <i>V. ordalii</i>	-	100
	<i>Y. ruckeri</i>	-	-
Hiperozmotik infiltrasyon	<i>A. salmonicida</i>	-	~59
	<i>E. tarda</i>	1:256-1:1024	-
	<i>P. piscicida</i>	-	-
	<i>R. salmonirarum</i>	-	-

1997, Moore ve ark 1998).

İmmersiyon Tekniğinde Antijen Alınımını Etkileyen Faktörler

Antijen alınımını etkileyen başlıca faktörler; aşı konsantrasyonu, immersiyon zamanının uzunluğu, balığın büyüklüğü, stres, aşı süspansiyonunun tuz konsantrasyonu, pH, su sıcaklığı, anestetikler, partikül veya çözünen antijenin fiziksel durumu ve adjuvantların kullanımıdır (Ellis 1988, Nakanishi ve Ototake 1997, Kav 2005). Yüksek dilüsyonlar ve kısa immersiyon zamanı ile aşı etkinliğindeki düşüş arasında bir ilişki vardır. Thune ve Plumb (1984), immersiyon zamanının uzatılması ile hiperozmotik infiltrasyon tekniğinde antijen alınımının arttığını bildirmektedir. Fender ve Amed (1978), yüksek tuz konsantrasyonunu tolere eden balıklarda zamanın uzaması ile BSA'nın alınımının sınırlandığını bildirmişlerdir. Balıkların yeterli düzeyde antijen alabilmesi için yüksek konsantrasyonlarda kısa zamana, düşük konsantrasyonlarda ise uzun zamana ihtiyaç duyduğu bildirilmektedir (Nakanishi ve Ototake 1997). Ancak antijen çok fazla dilüe edildiğinde balıkların immersiyonda uzun süre tutulmasının önemli bir etkisinin olmadığı da bildirilmektedir (Tatner ve Horne 1985). Konsantrasyon ve immersiyon süresinin kombine etkisi karmaşık olup kullanılan antijenin tipine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Tatner ve Horne 1985).

Bağışıklık üzerine etki eden diğer bir önemli unsur ise suyun sıcaklığıdır. Yapılan çalışmaların sonuçları elde edilen bağışıklığın banyo tarzı aşılamalarda 18 °C'de, 10 °C'ye göre daha güçlü olduğunu ortaya koymuştur (Thorburn ve Jansson 1988). Gökkuşuğu alabalıklarında *Y. ruckeri*'nin 4 °C'de yapılan banyo aşısında 40 gün boyunca immünite gelişmediği bildirilmektedir (Stevenson 1997). Tatner ve Horne (1987), gökkuşuğu alabalıklarında 18 °C'ye göre 5 °C'de antijen alınımının çok düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı yazarlar, benzer şekilde hiperozmotik infiltrasyon sonrası plazma BSA düzeylerinin düşük sıcaklıklarda azaldığı bunun yanında plazma antijen düzeyinin antijenin plazmaya salınım hızının da etkili olduğu bildirilmektedir.

Tatner ve Hourne (1985), düşük aşı konsantrasyonunda hiperozmotik infiltrasyonun antijen alınımı üzerine etkili olmadığını, çözünmüş olan antijenin bakteri hücre duvarından hazırlanan aşılara göre daha iyi sonuç verdiğini ortaya koymuştur. Ancak çözünmüş antijenin lateks partiküllerle verilmesi solungaçlardan geçişini kolaylaştırmakta ve daha güçlü immünite oluşmasını sağlamaktadır. Alkali solüsyon ve adjuvant kullanımı da antijen alınımını artırırken, anestetiklerin antijen alınımı üzerine bir etkisi olmadığı bildirilmektedir (Nakanishi ve Ototake 1997).

İmmersiyon Tekniğinde Antijenin Giriş Bölgesi

Amend ve Fender (1976), balıklarda antijenin esas giriş yerinin yanıl çizgi olduğunu ve solungaçların antijen alınımında ikincil derecede rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Ancak daha sonraki çalışmalar, ana giriş yerinin solungaçların olabileceğini ortaya koymuştur (Smith 1982). Antijen alınımında rol oynayan bir diğer bölge ise bağırsaklardır. Ancak antijen alınımından sorumlu olan primer bölge tam olarak tespit edilememiştir (Nakanishi ve Ototake 1997). Bu belirsizlik temelde üç nedene bağlıdır:

1. İmmersiyon immünizasyondan sonra balığın vucüt yanıl çizgisi, solungaçlar ve bağırsaklardaki antijen konsantrasyonu üzerine yapılmış hemen hemen hiçbir çalışmanın olmaması,
2. Direkt immersiyon ve hiperozmotik infiltrasyon uygulamalarından sonra antijen alınımının farklı mekanizmalarla yapıyor olması,
3. Çözünmüş ve partikül antijenlerin farklı mekanizmalarla alınıyor olmasıdır (Nakanishi ve Ototake 1997).

Antijen alınımında hücreler ve dokular

Balıklarda antijen transportu ve antijen alınım mekanizmaları tam olarak anlaşılmasına rağmen, aşılama programlarında epidermal yüzeyden ve kastan, aşının uygun geçişinin sağlanmasında antijen seçiminin oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Nakanishi ve Ototake 1997). Balık aşılama programlarının etkisini ortaya koymak amacıyla mukustan epidermise kadar olan bölgede antijenlerin nasıl geçtiğinin bilinmesi önemlidir. Antijenin muhtemelen çözünebilir veya partiküler olmasına bağlı olarak vücuda giriş yolları farklılık gösterebilir. Partiküler antijenler hücreler tarafından taşınırken, çözünebilir antijenler hücreler arası boşluklardan kana geçmektedir (Nakanishi ve Ototake 1997).

Daldırma aşu uygulamasından sonra serumda antikor belirleyemeyen araştırmacılara (Croy ve Amend 1977, Baba ve ark 1988) karşın spesifik antikor belirleyen araştırmacılar da (Liewes ve ark 1982) bulunmaktadır. Ancak sadece balıklar değil diğer türlerde dahi, antikor titresi her zaman hastalıktan korunma derecesini yansıtmamaktadır ayrıca hücresel bağışıklığın da belirlenmesi gerekir (Ellis 1997, Erganiş ve Orhan 1997). Ayrıca mukozal antikorlar da serum antikorları kadar koruyucu olabilmektedir. Daldırmadan sonra mukozal immünitenin stimüle edildiği bildirilmektedir (Na-

kanishi ve Ototake 1997). İmmersiyon uygulamalarından sonra antijen alınımında makrofaja benzeyen hücrelerin rol aldığı, hatta yalnızca fagositlerin değil bir çok epitelyal hücre tipinin de antijen alınımında rol belirlenmiştir. Simith (1982), radyoaktif olarak işaretlenmiş partiküllerle immerse edilmiş alabalıklarda bronşiyal hücrelerde antijen tespit etmiştir. Goldes ve ark (1986), solungaçlarda lameller epitel hücrelerinde antijen varlığını ortaya koymuşlardır. Zapata ve ark (1987), partiküler antijenleri solungaç kısmında tespit etmişler ve banyodan hemen sonra solungaç filamentlerinin üzerindeki pavement hücrelerinin içinde belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar ilk olarak antijenlerin epitelyal hücreler tarafından alındığını ve alınımında sekonder olarak solungaç fagositlerinin rol oynadığını belirtmişlerdir.

Deri, humoral veya mukozal immün sistem hücreleri kadar savunmada önemlidir (Ellis 1997, Ellis 1999). Zapata ve ark (1987), serum veya mukusta antikor belirleyemediklerini ve bakteriyel adhezyonların deri tarafından inhibe edilebildiğini ortaya koymuşlardır. Koruma mekanizmaları, patojenin enfeksiyon oluşturmadaki kabiliyeti kadar; tutunması, girişi, canlı kalması ve canlıda çoğalması gibi faktörlere de bağlıdır. Bu tip patojenlerin ilk karşılaştığı bariyer mukus ve epidermis olup buraları geçen etken komplement sistem, lektinler, makrofajlar, granulositler gibi spesifik olmayan humoral ve/veya hücresel faktörlerin oluşturduğu ikinci bariyerle karşılaşacağı belirtilmiştir. Bu faktörler içerisinde en önemlisi komplement sistem olup, makrofajların fagositosizini, lökositlerin göçünü, antikorların üretimini ve patojenlerin öldürülmesini arttırmaktadır. Daldırma yöntemi ile aşılama gelişen immünite birkaç aydan daha uzun süre koruma sağlamamakta ve serotipe spesifik koruma ile immünolojik hafızanın gelişimi için yeterli olmamaktadır (Nakanishi ve Ototake 1997).

İmmersiyon aşılama sonrası immün cevap mekanizması

İmmersiyon aşılama sonucu patojenlere karşı serumda oluşan düşük düzeydeki antikorlar mikrotitrasyon yöntemiyle belirlenebilmektedir. Ancak koruma düzeyi ile belirlenen titre arasında bir ilişki tespit edilememiştir (Croy ve Amend 1977, Baba ve ark 1988). Diğer yandan antikor seviyesi ile koruma arasında bir ilişki olacağını bildiren çalışmalar da mevcuttur (Liewes ve ark 1982, Whittigton ve ark 1994). İmmersiyon yolu ile aşılama sonrası gelişen immünitede humoral bağışıklığın rolü tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte lokal hücresel bağışıklığın daha önemli olabileceği bildirilmektedir

(Nakanishi ve Ototake 1997). Balıkların kas ve serumlarında antikor tespit edilememesine rağmen, immersiyon yoluyla aşılamanın enjeksiyon yoluyla aşılardan daha uzun süre bağışıklıklarını ve derilerine bakteri adhezyonunun engellendiği bildirilmiştir (Croy ve Amend 1977).

Vücudun kas ve epidermis tabakası savunmanın ilk hattını oluşturmaktadır. İkinci hattı ise hücresele ve nonspesifik humoral sistem oluşturmaktadır. Epruvasyon çalışmalarının birçoğunda kas ve epiderminin rolü ve savunmadaki önemleri gösterilmesine rağmen (Amend ve Fender 1976, Thune ve Plumb 1984), immersiyondan sonra bu koruma mekanizmalarına dikkat çekilmemiştir. Ancak, immersiyon ile indüklenen bağışıklık sisteminde mukozal immünitenin rolünün önemli ve karmaşık olduğu, immersiyon aşılama sonrası humoral immün sistemin genellikle zayıf olarak uyarıldığı ve serolojik olarak mikrotitrasyon yöntemleri ile belirlenemeyecek kadar az antikor üretildiği ortaya konulmuştur (Nakanishi ve Ototake 1997)..

Enjeksiyon ile Aşılama

Özellikle som balığı ve alabalık endüstrilerinde yoğun olarak kullanılan bu yöntemle minimum yan etkiyle optimum koruma sağlanabilmektedir. Diğer türlerde, bu tip aşılama tekniğinin uygulanması genellikle koruma süresi yüksek, birim maliyeti düşük ve pratik olarak tanımlanır (Erganiş 2003). Bu yöntem ile hem memeli hayvanlarda hem de balıklarda bakteri hücre duvarı, ekzotoksin veya endotoksinlerin inaktive edilmesi ile hazırlanan mono ve multivalan aşılama adjuvanlı veya adjuvantsız olarak uygulanabilmektedir (Erganiş ve İstanbulluoğlu 1999, Erganiş 2003, Kav 2005). Yöntemin uygulamasındaki temel zorluk, balıklar üzerinde oluşturduğu stres ve zaman alıcı olmasıdır. Özellikle enjeksiyon uygulamalarında enjeksiyon masası, anestezi tankı, otomatik enjektör ve balıkların anestezi çıkmasında kullanılacak temiz su kaynağına ihtiyaç vardır. Bu şekilde uygulama ile bir kişi saatte 1000 - 2000 adet balığı aşılayabilmektedir (Ellis 1988, Austin ve Austin 1999, Vinitnantharat 2001).

Oral Yöntemler

Bu yöntemde, özel yöntemlerle [antijen taşıyıcılar = Antigen Protection Vehicle (APV)] hazırlanan aşı antijenlerinin midenin zararlı etkilerinden korunarak bağırsağa ulaşması ve emilmesi sağlanır (Quentel ve Vigneulle 1997). Aşı normalde tüm balık gıdaları ile verilebilir (Ellis 1988, Quentel ve Vigneulle 1997). Verilen bu antijenleri

bağırsağın son kısımlarında yerleşik olarak bulunan intra-epitelyal makrofajlar, GALT (gut-associated lymphoid tissue), granüositler gibi intestinal immün mekanizmalar alabilir yapıdadır (Hart ve ark 1988, Quentel ve Vigneulle 1997). Bağırsak mukusu, safra ve serumda antikorların belirlenmiş olması hem mukozal hem de sistemik immün cevabın oral uygulamalardan sonra gelişebildiğini göstermiştir. Midede antijenlerin sindiriminin önlenmesi için gastrik sekresyonların nötralizasyonu, oral adjuvanların kullanımı veya antijenlerin özel yöntemlerle kaplanması gereklidir (Georgopoulou and Vernier 1986, Hart ve ark 1988, Quentel ve Vigneulle 1997).

Oral aşılama da tür, yaş, ağırlık ve su sıcaklığı önemlidir. Oral aşılama fenol, kloroform, formol, perklorik asit gibi kimyasallar ile inaktive edildiği gibi, ısıtma veya sonikasyon da kullanılabilir. Oral aşılama, hazırlanmalarına bağlı olarak bazı dezavantajlara sahiptir; besinin hazırlanması ve depolama antijenlerde kayba neden olduğu gibi aşının etkisi besin tüketim miktarına bağlı olduğu için antijen dağılımı standardize edilememektedir (Quentel ve Vigneulle 1997).

Oral aşılama sonrası antijen alınımı ve bağışıklık

İlk oral aşılama denemesi 1942 yılında Duff tarafından gerçekleştirilmiştir. Duff, cut-throat trout (*Salmo clarkii*) balık türleri üzerinde yaptığı bağışıklama çalışmalarında; kloroformla inaktive edilmiş *A. salmonicida* (Furunküloz) bakterinin aşısını oral olarak kullanmış ve etkin sonuçlar elde etmiştir (Duff DCB 1942). Bu ilk uygulamadan sonra çeşitli balık patojen bakterilerine ve özellikle balık yetiştiriciliği için çok önemli olan Vibriosize sebep olan *V. anguillarum*, kızıl ağıza sebep olan *Y. ruckeri* ve furunküloze sebep olan *A. salmonicida*'ya karşı oral aşılama çalışmaları yapılmıştır (Joosten ve ark 1997, Quentel ve Vigneulle 1997). Farklı çalışmalarda koruma oranları değişik şekillerde (kabul edilebilir, yetersiz ya da önemsiz olarak) değerlendirilmiştir. Bu durumda çalışma dizaynlarının farklılığı ve oral aşılamanın içeriği temel neden olarak gösterilmiştir (Quentel ve Vigneulle 1997).

Oral aşılama yönteminin başlıca dezavantajları ise elde edilen bağışıklığın genelde diğer uygulama yolları ile kıyaslandığında düşük ve daha kısa süreli olması ve çok miktarda antijene ihtiyaç duyulmasıdır. Yoğun bakım şartlarından dolayı oral aşılama çok pahalı olmaktadır (Ellis 1988, Joosten ve ark 1997).

Elektronmikroskopik, immünohistokimyasal ve

immünokimyasal bir çalışmada, deniz ve tatlı su balıklarında bağırsaklarının sekonder segmentinde mukozal bariyer bulunmasına rağmen, bağırsak lümeninden bakterileri absorbe edilebildiği ortaya konulmuştur (Quentel ve Vigneulle 1997). Memelilerde olduğu gibi epitel hücreleri arasında direk molekül geçişi bazı patolojik durumlarda olmaktadır. Balığın bağırsağında çözünmüş veya partikül tarzda bulunan antijenlerin her ikisi de epitel hücreleri tarafından alınmaktadır. Bunlar bağırsak epitelinde proteinlerin hidrolize edildiği sub-ranükleer vakuoler sistemi ile pinositozu ve bazı türlerde eksositozu arttırmaktadır. Bu sebepten aktif proteinlerin oral uygulamasından sonra mideli ve midesiz teleostların plazmasında biyolojik aktif proteinler belirlenmiştir (Quentel ve Vigneulle 1997). Balık bağırsağının son kısmının absorptif enterositlerindeki endostatik mekanizma memeli hücrelerine benzer yapıdadır. Diğer yandan memeli hücrelerindeki aksine balıkların bağırsağındaki emici hücreler, yüksek oranda hidrolitik aktiviteye sahip çok sayıda lizozom içerirler (Quentel ve Vigneulle 1997).

Bağırsak mukozası üzerinde peyer plaklarında lenfoid hücreler ve makrofajlar oldukça yoğun olarak bulunur. Bununla birlikte intestinal mukozanın genelinde de plazma hücrelerine, granüositlere ve makrofajlara rastlanılabilir (Newman 1993, Joosten ve ark 1997, Quentel ve Vigneulle 1997). Balıkların bağırsak lenfositlerinden makrofaj aktive eden faktör (MAF) salındığı belirlenmiştir (Quentel ve Vigneulle 1997). İmmünglobülin taşıyan lenfoid hücrelerin lamina propriada bulunması B veya plazma hücrelerin buralarda yoğunlaştığını göstermektedir (Hart ve ark 1988, Quentel ve Vigneulle 1997). Peyer plakları ile karşılaştırıldığında makrofajların ve lenfoid hücrelerin akümülyasyonları balıklarda düşüktür. Makrofajlar, çeşitli türdeki granüositler, plazma hücreleri ve lenfositler gibi bir çok lenfosit türü intestinal mukozada bulunabilir (Hart ve ark 1988, Quentel ve Vigneulle 1997).

Gökkuşluğu alabalıkların bağırsak lökositlerin mukozal epitelden izolasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, bağırsak lenfositlerinin MAF salgıladığı tespit edilmiştir. Kan kökenli lökositlerden salgılanan MAF bu türlerde bulunan özel bir T lenfosit türüdür (Quentel ve Vigneulle 1997).

Balıklarda bağırsak boyunca lenfoid hücrelerinin dağılımında farklılık tespit edilmiştir. Lenfoid hücrelerin dağılımı bağırsakta farklılık göstermemesine karşın Rombout ve Van den berg (1989), bağırsağın ikinci segmentinde diğer bölgelere göre dört misli daha fazla makrofaj be-

lirlemiştir. Rombout ve ark (1986), bağırsak segmentindeki makrofajların immünglobülin pozitif olduklarını ve düşük adherens özellikte olduğunu göstermiştir. Bu özelliklerinden dolayı diğer lenfoid organlarındaki makrofajlara benzemediğini ve hareket yeteneklerinin sınırlı olduğunu bildirmişlerdir. Bağırsak fagositleri, böbrek lökositleri için kemotratif bir faktör de salgılamaktadır Ayrıca antijen sunum fonksiyonların da olduğu bildirilmektedir. Özellikle lamina propria'nın stratum granulosum katındaki eozinofilik granüler hücrelerin (EGCs) yoğun bulunduğu ve Aeromonas, Vibrio enfeksiyonlarından sonra parçalanarak sayılarının azaldığı bildirilmiştir. Makrofajlar aynı zamanda herhangi bir bakteriyel affinitenin varlığında serbest oksijen radikalleri salgırlar ve partikülleri sindirebilirler (Quentel ve Vigneulle 1997). Bağırsak makrofajlarının antijen sunan hücre fonksiyonuna sahip olduğu bildirilmektedir (Ellis 1999, Quentel ve Vigneulle 1997). Salmonid bağırsaklarının genel bir özelliği olarak lamina propria üzerinde stratum compactum olarak adlandırılan düzgün kollajen bir hat vardır. Burası eozinofilik granüler hücrelerle (EGC) ilişkilidir ve stratum granulosumu oluşturduğu bildirilmekle beraber teleostların her bir grubunda stratum compactum ve stratum granulosum olmadığı da bildirilmektedir (Quentel ve Vigneulle 1997). Hart ve ark (1988), EGC'lerin memeli mast hücrelerine karşılık geldiğini, stratum granulosum gibi bağırsak katmanlarının balık türleri içerisinde çok farklılık gösterdiğini ve bazılarında da hiç olmadığını, bunun da türler arasında antijen emilimindeki farklılıklara neden olabileceğini bildirmektedir.

Oral olarak uygulanan aşılamalardan sonra spesifik plazma ağıltininlerinin varlığının gösterilmesi, bağırsaklardaki antikor salgılayan hücrelerde ve böbrekte antikorların tespit edilmesi, oral uygulanan aşılamanın sistemik immün cevaba da neden olduğunu göstermektedir (Hart ve ark 1988). Oral aşılamalarda sistemik immün yanıtta plazma lizozim aktivitesi, komplement, lökositlerin fagositik aktiviteleri ve nonspesifik sitotoksik hücre aktivitesindeki artışın neden olduğu bildirilmiştir (Quentel ve Vigneulle 1997).

Lokal intestinal immün cevap

GALT'ta bulunan hücrelerin farklılığı lokal bir immün cevabın varlığını gösterir (Hart ve ark 1988). İmmünohistokimyasal metodların kullanımı ile oral ve anal aşı uygulamaları sonrasında, barsak arka kısmının lümeninden antijenin intestinal epitel hücrelerinin arasından intraepitelyal makrofajlara transportu tespit edilmiştir (Quentel ve Vigneulle 1997).

Balıkların memelilerde olduğu gibi lokal bir immün sisteme sahip olduğu ve antijenin oral ve anal uygulamasından sonra bağışıklık sisteminin aktive olduğu bildirilmektedir (Quentel ve Vigneulle 1997).

Sistemik immün cevap

Oral aşı uygulamalarının ayu, tourbot ve sea bass'larla bazen de salmonidlerde yeterli düzeyde koruma sağladığı bildirilmiştir (Quentel ve Vigneulle 1997). Davidson ve ark (1994) Gökkuşuğu alabalıklarını oral olarak aşıladıktan sonra bağırsak ve böbreklerinde antikor salgılayan hücrelerin varlığını, plazma aglütinin antikorlarının yokluğuna rağmen böbreklerinin ön tarafında ve dalaklarında plak yapan hücrelerin varlığı bildirmiştir.

Oral aşılardan sonra serumda antikorların gözlenmemesine rağmen, oral olarak immünize edilmiş ayu, alabalık, sea bass ve gökkuşuğu alabalıklarından elde edilen serum ile pasif immünizasyonun koruyucu etkisi olduğu bildirilmektedir (Quentel ve Vigneulle 1997).

Sonuç ve Öneriler

Akuakültürde aşı kullanımının çok geniş bir konu olduğu ve aşı uygulamaları çalışmalarının gelecekte de büyük öneme sahip olacağı görülmektedir. Günümüzde aşilar yaygın olarak Amerika, Japonya, Avrupa ülkeleri, Endonezya ve Tayland'da kullanılmaktadır. Aşiların akuakültürde sağladığı faydalar uzun süreli olmakla birlikte, Türkiye'de aşı uygulamaları henüz çok yeni bir konudur. Ancak bilgi birikiminin artmasına bağlı olarak ilgi de giderek artmaktadır. Bakteriyel, viral, paraziter ve mantar enfeksiyonlarına karşı etkili mücadelenin yapılabilmesi, aşiların uygun zamanda, uygun dozda ve uygun şekillerde kullanımı ile sağlanacaktır.

Kaynaklar

Amend DF and Fender DC (1976) Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic infiltration: a model for vaccinating fish (Abstract). Science, 192, 793-794.

Antipa R, Gould R and Amend DF (1980) *Vibrio anguillarum* vaccination of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) by direct and hyperosmotic immersion. J Fish Dis, 3: 161-165.

Austin B (1984) The future of bacterial fish vaccines. Vaccine, 2: 249-254.

Austin B and Austin DA (1999) Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish. Second Edition Ellis Norwood Ltd. London.

Baba T, Imamura J, Izawa K and Ikeda K (1988) Immune protection in carp *Cyprinus carpio* L. after immunization with *Aeromonas hydrophila* crude lipopolysaccharide. J Fish Dis, 11:237-244.

Croy TR and Amend DF (1977) Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. Aquaculture, 12:317-325.

Davidson GA, Ellis AE and Secombes CJ (1994) A preliminary investigation into the phenomenon of oral tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum 1792). Fish Shellfish Immunol, 4, 159-160.

Duff DCB (1942) The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. J. Immunol, 44: 87-94.

Ellis AE (1988) Fish vaccination. Academic Press, London. UK.

Ellis AE (1997) Immunization with bacterial antigens: Furunculosis Dev Biol Stand, 90: 107-116.

Ellis AE (1999) Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol, 9: 291-308.

Erganiş O (2003) Clostridial vaccine reactions on sheep: a small clinical and microbiological field investigation. "Clostridial enterotoxaemia and Enteritis in Farm Animals" Workshop organised by the Univ. of Liege, Veterinary Faculty and CEVA-Phylaxia Co, Budapest on 30-31 May 2003.

Erganiş O ve İstanbulluoğlu E (1999) İmmünoloji, 2. Baskı, S.Ü. Veteriner Fakültesi Basım Ünitesi, KONYA.

Erganiş O ve Orhan G (1997) Gumboro Hastalığının Hüküm Sürdüğü ve Farklı Yaş Gruplarında Cıvıv Bulunan Bir İşletmede Uygulanan Aşı Programı Üzerinde Tartışma. Çiftlik Dergisi, Haz, 69 - 70.

Evelyn TPT (1997) A Historical review of fish vaccinology. Dev Biol Stand, 90: 3-12.

Fender DC and Amend DF (1978) Hyperosmotic infiltration: factors influencing uptake of bovine serum albumin by rainbow trout (*salmo gairdneri*). J Fish Res Bd Can, 35, 871-874.

Georgopoulou U and Vernier JM (1986) Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules. Dev Comp Immunol, 10: 529-537.

Goldes SA, Ferguson HW, Daoust PY and Moccia RD (1986) Phagocytosis of the inert suspended clay kaolin by the gills of rainbow trout *salmo gairdneri* (Abstract). J Fish Dis, 9, 147-152.

Gudding R, Lillehaug A and Evensen Q (1999) Recent developments in fish vaccinology Vet Immunol Immunopathol, 72: 203-212.

Hart S, Wrathmell AB, Haris JE and Grayson TH (1988) Gut Immunology in Fish: A Review. Dev Comp Immunol, 12: 453-480.

- Joosten PHM, Tiemersma E, Threels A, Caumartin-Dhieux C and Rambout JHWM (1997) Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish Shellfish Immunol*, 7: 471-485.
- 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. S. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- Liewes EW, Van Dam RH, Voss-maas MG and Bootsma R (1982) Presence of antigen sensitized leukocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.) following bath immunization against *Flexibacter columnaris*. *Vet Immunol Immunopathol*, 3:603-609.
- Moore JD, Ototake M and Nakanishi T (1998) Particulate antigen uptake during immersion immunisation of fish: The effectiveness of prolonged exposure and the roles of skin and gill. *Fish Shellfish Immunol*, 8: 393-407.
- Nakanishi T and Ototake M (1997) Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination *Dev Biol Stand*, 90:59-68.
- Newman SG (1993) Bacterial vaccines for fish. *Ann Rev Fish Dis*, 3:145-185.
- Quentel C and Vigneulle M (1997) Antigen uptake and immune responses after oral vaccination. *Dev Biol Stand*, 90: 69-78.
- Rombout JHWM, Block LJ, Lamers CHJ and Egberts E (1986) Immunization of carp (*Cyprinus carpio*) with a vibrio anguillarum bacterium: indications for a common mucosal immune system. *Dev Comp Immunol*, 10, 341-351.
- Rombout JHWM and Van Den Berg AA (1989) Immunological importance of the second gut segment of carp. I. uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *J Fish Biol*, 35, 13-22.
- Romoren K, Beate TJ, Smistad G and Evensen O (2002a) Immersion delivery of plasmid DNA I. A study of the potentials of chitosan based delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *J Control Release*, 85: 203-213.
- Romoren K, Beate TJ and Evensen O (2002b) Immersion delivery of plasmid DNA II. A study of the potentials of chitosan based delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *J Control Release*, 85: 215-225.
- Smith PD (1982) Analysis of hyperosmotic and bath methods for fish vaccination: comparison of uptake of particulate and non particulate antigens (Abstract). *Dev Comp Immunol*, 2, 181-186.
- Stevenson RMW (1997) Immunization with bacterial antigens: Yersiniosis. *Dev. Biol. Stand*, 90: 117-124.
- Tatner MF and Horne MT (1985) The effects of vaccine dilution, length of immersion time, and booster vaccinations on the protection levels induced by direct immersion vaccination of brown trout, *Salmo trutta*, with *Yersinia ruckeri* (ERM) vaccine. *Aquaculture*, 46: 11-18.
- 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.
- Thorburn MA and Jansson ELK (1988) The effects of booster vaccination and fish size on survival and antibody production following vibrio infection of bath-vaccinated rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 71: 285-291.
- Thune RL and Plumb JA (1984) Evaluation of hyperosmotic infiltration for the administration of antigen to channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Abstract). *Aquaculture*, 36, 4-44.
- Toranzo AE, Santos Y and Barja J (1997) Immunization with bacterial antigens: Vibrio infections. *Dev Biol Stand*, 90: 93-105.
- Türkyılmaz S ve Travoğlu Y (2002) Bakteriyel balık hastalıklarında kullanılan aşılama yöntemleri. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 33: 1-2.
- Whittington RJ, Munday BL, Akhlaghi M Reddacliff GL and Carson J (1994) Humoral and peritoneal cell responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to ovalbumin, *Vibrio anguillarum* and Freund's complete adjuvant following intraperitoneal and bath immunisation. *Fish Shellfish Immunol*, 4:475-488.
- Vinitnantharat S (1999) Fish vaccines. *Adv Vet Med*, 41: 539-550.
- Vinitnantharat S (2001) Immunological methods of disease control. *Aquatic Animal Health Division, Alpharma Inc*, 103-109.
- Warr GW (1997) The adaptive immune system of fish. *Dev Biol Stand*, 90: 15-21.
- Zapata AG, Torroba M, Alvarez F, Anderson DP, Dixon AW and Wisiniewski M (1987) Electron microscopic examination of antigen uptake by salmonid gill cells after bath immunization with a bacterin. *J Fish Biol*, 31, 209-217.