Önsöz

Bu rapor; “Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde Görülen Bakteriyel Hastalıklara Yönelik; MALDI-TOF MS Yerel Veri Kütüphanesi Oluşturulması, Türe Özgü Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin (cut-off) Belirlenmesi ile Akılcı Antimikrobiyal Kullanımı ve İnaktif Aşıların Geliştirilmesi” başlıklı, 221O484 numaralı ve 1001–Kamu Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenen araştırma projesinin yürütülmesi sonucunda elde edilen bilimsel ve teknik çıktıları kapsamaktadır.

Proje süresince, Türkiye'deki gökkuşağı alabalığı işletmelerinden izole edilen bakteriyel patojenlerin fenotipik, moleküler ve genomik düzeyde detaylı karakterizasyonları yapılmış; su ürünleri sektöründe tanı, izleme ve koruma stratejilerine yönelik bütüncül çözümler geliştirilmiştir. Özellikle MALDI-TOF MS teknolojisi ile yerli veri kütüphanesi oluşturulmuş, türlere özgü ECOFF (epidemiyolojik eşik) değerleri belirlenmiş ve en önemlisi antibiyotik kullanımını azaltmaya yönelik yerli aşı geliştirme stratejileri başarıyla uygulanmıştır.

Proje kapsamında; inaktif monovalan ve bivalan banyo aşıları ile birlikte enjeksiyon yolu ile uygulanan pentavalan (beşli) kombine emülsiyon aşı (YLV5 ICIEV) prototipleri geliştirilmiş, laboratuvar ve saha düzeyinde etkinlik ve güvenlik testleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşılar; *Yersinia ruckeri* BT1 ve BT2, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus petauri* ve *Vibrio anguillarum* gibi ülkemiz su ürünleri sektöründe önemli mortaliteye neden olan patojenlere karşı geliştirilmiş, hedef türde bağışıklık yanıtları detaylı gen ekspresyon analizleri ile doğrulanmıştır.

Bu süreçte, proje önerisinin kabulünden itibaren bilimsel araştırma altyapısının sağlanmasına kadar geçen her aşamada desteklerini esirgemeyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu’na (TÜBİTAK), 1001 Programı kapsamında desteklenen 221O484 numaralı proje dolayısıyla en içten teşekkürlerimizi sunarız.

Proje süresince özverili çalışmalarıyla katkı sağlayan araştırmacı ekibimize, proje paydaşı kurumlara ve teknik desteği ile sürece katkı sunan tüm kişi ve kuruluşlara şükranlarımızı sunarız. Ayrıca saha uygulamalarında iş birliği yapan özel sektör balık yetiştiriciliği işletmelerine ve laboratuvar analiz süreçlerinde görev alan teknik personellere teşekkür ederiz.

Bununla birlikte, proje kapsamında görev alan ve sürecin her aşamasında laboratuvar, saha ve analiz çalışmalarına aktif katkı sağlayan lisansüstü düzeydeki TÜBİTAK bursiyerlerine de ayrıca teşekkür ederiz. Göstermiş oldukları akademik motivasyon ve bilimsel merak, projenin başarıyla tamamlanmasında önemli rol oynamıştır.

Elde edilen proje çıktılarının; Türkiye’de sürdürülebilir akuakültür üretiminin geliştirilmesi, balık sağlığına yönelik biyogüvenlik stratejilerinin güçlendirilmesi ve antimikrobiyal dirençle

mücadele kapsamında akılcı kontrol yaklaşımlarının şekillendirilmesine bilimsel düzeyde katkı sağlayacağı ve bu doğrultuda uygulanabilir bir model sunacağı değerlendirilmektedir.

Prof. Dr. Soner ALTUN
Proje Yürütücüsü
Ağustos 2025 – Bursa

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **I**
İÇİNDEKİLER ..... **III**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **XII**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **XV**
ÖZET ..... **XXIV**
ABSTRACT ..... **XXV**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **1**
3. GEREÇ VE YÖNTEM **8**
3.1 GEREÇ 8
3.1.1 Bakteriyolojik Örnekleme 8
3.1.1.1 Pilot Gökkuşağı Alabalığı İşletmelerinin Özellikleri 8
3.1.2 Su Kalitesi Parametreleri 8
3.1.3 Bakteri Suşları 9
3.1.4 Deneme Ünitesi 9
3.1.5 Aşı Geliştirme Çalışmalarında Kullanılan Gökkuşağı Alabalıklarının Temini ve Balık Grupları 9
3.1.6 Tavşan Materyali ve Deneme Grupları 11
3.1.7 Aşılama Sonrası İmmun Gen ekspresyonlarının Belirlenmesi için Doku Örneklemesi 12
3.2 YÖNTEM 12
3.2.1 Bakteriyel İzolasyon 12
3.2.2 Bakteriyel İdentifikasyon Çalışmaları 12
3.2.2.1 Bakteriyel İzolatların MALDI-TOF MS ile identifikasyonu 12
3.2.2.2 İzolatların Moleküler İdentifikasyon ve Karakterizasyonu 13
3.2.2.2.1 DNA Ekstraksiyonu 13
3.2.2.2.2 İzolatların PCR ile identifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu 13
3.2.3 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ve Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin (cut-off:EcoFF) Belirlenmesi 14
3.2.4 Prototip Aşı Üretiminde Kullanılacak Aşı Suşlarının Belirlenmesi 15
3.2.4.1 İzolatların fenotipik virülens özelliklerinin (FVÖ) belirlenmesi (Jelatinaz, lipaz, hemolizin, proteaz ve DNase üretimi) 15
3.2.4.2 *L. garvieae* (LG) İzolatlarında Kapsül Tespiti: 16
3.2.4.2.1 *L. garvieae* İzolatlarında Fenotipik (spesifik besi yeri, kapsül boyama) olarak Kapsül Tespiti: 16
3.2.4.2.2 Elektron Mikroskobu ile *L. garvieae* ve *L. petauri* İzolatlarının Kapsül Formasyonunun Görüntülemesi 17

3.2.4.2.3 *L. garvieae* ve *L. petauri* İzolatlarının Genom Analizi ile Kapsül Gen Bölgesi Formasyonun Belirlenmesi 17
3.2.4.3 Hiperimmun Serum Eldesi....17
3.2.4.3.1 *Y. ruckeri* ile Yeni Zellanda Tavşanlarının Hiperimmunizasyonu 18
3.2.4.3.2 *V. anguillarum* ile Yeni Zellanda Tavşanlarının Hiperimmunizasyonu....18
3.2.4.4 *L. garvieae* ve *L. petauri* ile Yeni Zellanda Tavşanlarının Hiperimmunizasyonu 19
3.2.4.5 *Y. ruckeri, L. garvieae, L. petauri* ve *V. anguillarum* Suşlarının Serotiplendirilmesi 19
3.2.4.6 Lam ve Mikroplak (Microwell Plate, Kantitaif) Aglutinasyon 19
3.2.4.7 SDS-PAGE ile Tüm Hücre Protein Profilleri....20
3.2.4.8 Antijenik Profillerinin Belirlenmesi....20
3.2.4.9 Aday Aşı Suşların Tüm Genom Analizi ile Biyoinformatik Analizi....21
3.2.4.9.1 İzolatların Tüm Genom Sekans Analizi ile Genom Özellikleri ve Virülens Genlerinin Belirlenmesi 21
3.2.5 Aşı Geliştirme Çalışmaları 23
3.2.5.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılacak Balıkların Mikrobiyolojik Muayenesi ve Sakinleştirilmesi 23
3.2.5.2 Gökkuşağı Alabalıklarında Virulens Denemeleri....23
3.2.5.2.1 Eprüvasyon Deneyleri 23
3.2.5.3 İnaktif Aşıların Hazırlanması 25
3.2.5.3.1 Etken İzolasyonu ve Saflaştırılması....25
3.2.5.3.2 İnaktif Banyo ve Enjeksiyon Monovalan, Bivalan, Kombine Emülsiyon Aşı/Aşıların(*Y. ruckeri* BT 1, *Y. ruckeri* BT 2, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum*) Hazırlanması....25
3.2.5.3.2.1 Ana tohum suşu (master seed) ve çalışma tohum suşu (working seed) stoklarının oluşturulması. 25
3.2.5.3.3 Final Ürün Testleri....27
3.2.5.3.3.1 Aşılarda Sterilite Kontrolü 27
3.2.5.3.3.2 İnaktif Aşılarda Güvenlik (Zararsızlık) Deneyleri 27
3.2.5.4 Aşı Etkinliğinin Değerlendirilmesi 30
3.2.5.4.1 Eprüvasyon Denemeleri....30
3.2.5.4.2 Aşıların Uygulanması....31
3.2.6 Bağışıklığın Değerlendirilmesi....35
3.2.7 İnaktif Aşılarda Etkinlik Kabul Kriterleri....35
3.2.8 İnaktif Aşılarda Saha Etkinlik Araştırılması 35
3.2.9 qPCR ile Dokuda İmmun gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi....36
3.2.9.1 RNA izolasyonu ve cDNA Sentezi....36
3.2.9.2 Eş Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)..36

3.2.10 İstatistiksel analizler 37
4. BULGULAR 37
4.1 PILOT İŞLETMELER 37
4.2 BAKTERIYEL İZOLASYON SONUÇLARI 38
4.2.1 Fenotipik Testler ve MALDI TOF MS (Bruker) İdentifikasyon 38
4.2.1.1 MALDI-TOF MS (Bruker) İdentifikasyon ve Yerel Veri Kütüphanesi Oluşturulması 41
4.2.1.2 MALDI-TOF MS (Bruker) Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi 45
4.2.2 Moleküler İdentifikasyon 49
4.3 ANTIMIKROBIYAL DUYARLILIK TESTI VE EPIDEMIYOLOJIK EŞIK DEĞERLERININ (CUT-OFF:ECOFF) BELIRLENMESINE İLIŞKIN SONUÇLAR 49
4.3.1 *Aeromonas* spp. İzolatlarının Disk Difüzyon Tekniği ile Antimikrobiyal Duyarlılığın Değerlendirilmesi 50
4.3.2 *Pseudomonas* spp. İzolatlarında Disk Difuzyon Testi ile Antimikrobiyal Duyarlılığın Değerlendirilmesi 53
4.3.3 *Y. ruckeri* İzolatlarında Disk Difuzyon Testi ile Antimikrobiyal Duyarlılığın Değerlendirilmesi 55
4.3.4 *L. petauri* İzolatlarında Disk Difuzyon Testi ile Antimikrobiyal Duyarlılığın Değerlendirilmesi 56
4.3.5 *V. anguillarum* İzolatlarında Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları 58
4.3.6 *F. psychrophilum* İzolatlarında Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları 59
4.3.7 *V. salmoninarum* İzolatlarında Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları 62
4.3.8 Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin (cut-off: EcoFF) Belirlenmesi 64
4.3.8.1 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında (n=38) Oksitetrasiklin'e Karşı Epidemiyolojik Eşik Değer (EcoFF) Analizleri 64
4.3.8.1.1 *Pseudomonas spp.* izolatlarının Oksitetrasiklin'e karşı MIC dağılımı ve epidemiyolojik eşik değerin EcoFFinder yöntemiyle belirlenmesi 64
4.3.8.1.2 NRI (Normalize Edilmiş Direnç Yorumlama) Yöntemi Bulguları 65
4.3.8.1.3 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında Florfenikol Epidemiyolojik Eşik Değer (EcoFF/COwt) Belirlenmesi 66
4.3.8.1.3.1 EcoFFinder Yöntemi Bulguları 66
4.3.8.1.3.2 NRI Yöntemi Bulguları 67
4.3.8.1.4 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında Sulfametoksazol + Trimetoprim (SXT) İçin Epidemiyolojik Eşik Değer (EcoFF/COwt) Belirlenmesi 68
4.3.8.1.4.1 EcoFFinder Yöntemi Bulguları 68
4.3.8.1.4.2 NRI Yöntemi Bulguları 69
4.3.8.1.5 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında Eritromisin İçin Epidemiyolojik Eşik Değer (EcoFF/COwt) Belirlenmesi 70

4.3.8.1.5.1 EcoFFinder Yöntemi Bulguları 70
4.3.8.1.5.2 NRI Yöntemi Bulguları 71
4.3.8.1.6 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında Enrofloksasin İçin Epidemiyolojik Eşik Değer (EcoFF/COwt) Belirlenmesi 72
4.3.8.1.6.1 EcoFFinder Yöntemi Bulguları 72
4.3.8.1.6.2 NRI Yöntemi Bulguları 73
4.3.8.1.7 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında Doksisiklinin Epidemiyolojik Eşik Değerinin (EcoFF/COwt) Belirlenmesi 74
4.3.8.1.7.1 EcoFFinder Yöntemi Bulguları 74
4.3.8.1.7.2 NRI Yöntemi Bulguları 74
4.3.8.2 *Aeromonas* spp. izolatlarında Oksitetrasiklinin(n=38) Epidemiyolojik Eşik Değerinin (EcoFF/COwt) Belirlenmesi 75
4.3.8.2.1 EcoFFinder Analizi Sonuçları 75
4.3.8.2.2 NRI Yöntemi Sonuçları 76
4.3.8.2.3 *Aeromonas* spp. İzolatlarında Florfenikolün Epidemiyolojik Eşik Değerinin (EcoFF/COwt) Belirlenmesi 77
4.3.8.2.4 *Aeromonas* spp. izolatlarında Sulfametkosazol+trimetoprimin EcoFF:ECV değerleri 78
4.3.8.2.5 *Aeromonas* spp. izolatlarında Eritromisinin EcoFF:ECV değerleri 80
4.3.8.2.6 *Aeromonas* spp. izolatlarında Enrofloksasinin EcoFF:ECV değerleri 81
4.3.8.2.7 *Aeromonas* spp. izolatlarında Doksisiklinin EcoFF:ECV değerleri 82
4.3.8.3 *Y. ruckeri* izolatlarında (n=22) Oksitetrasiklinin EcoFF:ECV değerleri 84
4.3.8.3.1 *Y. ruckeri* izolatlarında Florfenikolün EcoFF:ECV değerlerinin Belirlenmesi 85
4.3.8.3.2 *Y. ruckeri* izolatlarında Sulfamethoksazol+trimetoprimin EcoFF:ECV değerlerinin Belirlenmesi 87
4.3.8.3.3 *Y. ruckeri* izolatlarında Eritromisinin EcoFF:ECV değerlerinin Belirlenmesi 88
4.3.8.3.4 *Y. ruckeri* izolatlarında Enrofloksasinin EcoFF:ECV değerlerinin Belirlenmesi 90
4.3.8.3.5 *Y. ruckeri* izolatlarında Doksisiklinin EcoFF: ECV değerlerinin Belirlenmesi 91
4.3.8.3.6 *L. petauri* izolatlarında (n=32) Oksiterasiklinin EcoFF:ECV değerlerinin Belirlenmesi 92
4.3.8.3.7 *L. petauri* İzolatlarında (n=32) Florfenikolün EcoFF:ECV Değerinin Belirlenmesi 94
4.3.8.4 *L. petauri* izolatlarında (n=32) Sulfamethoksazol+trimetoprimin EcoFF:ECV değerleri 95
4.3.8.4.1 *L. petauri* İzolatlarında (n=32) Eritromisinin EcoFF: ECV değerinin Belirlenmesi 96

4.3.8.4.2 *L. petauri* İzolatlarında (n=32) Enrofloksasin EcoFF: ECV Değerinin Belirlenmesi 98

4.3.8.4.3 *L. petauri* İzolatlarında(n=32) Doksisiklinin EcoFF:ECV Değerinin Belirlenmesi 99

4.4 PROTOTIP AŞI ÜRETIMINE YÖNELIK AŞI AŞI SUŞLARININ SEÇIMI 100

4.4.1 *Y. ruckeri* Aşı Suşlarının Seçimine Yönelik Çalışmalar *(Y. ruckeri* İzolatlarının Fenotipik (Virulens), Serotipik (Hiperimmun Serum Eldesi, Aglütinasyon Testleri) Peoteomik (SDS PAGE, Westernblot) ve Genomik Özellikleri (Tüm Genom Sekans, Genom Biyoinformatik Analizi) 103

4.4.1.1 *Y. ruckeri* izolatlarının Fenotipik Virülens Özelliklerinin (FVÖ) Belirlenmesi (Jelatinaz, lipaz, hemolizin, proteaz ve DNase üretimi) 103

4.4.1.2 *Y. ruckeri* Referans/Standart Suşları için Antiserum (Hiperimmun Serum) Elde Edimesi....105

4.4.1.2.1 Serumların Etkinliğinin Belirlenmesi: 105

4.4.1.2.2 Serotiplendirme ve Aglütinasyon Analizleri....107

4.4.1.3 Serotiplendirme (Mikroplak ve Lam Aglütinasyon Testleri): 107

4.4.1.4 *Y. ruckeri* BT1 ve BT2 suşlarının Tüm Hücre Proteinlerinin(WCPT) Belirlenmesi 108

4.4.1.5 *Y. ruckeri* Serotipi O1 BT1 ve BT2 İzolatlarının Western Blot Analizi....112

4.4.1.6 Genomik analiz ve Genom Biyoinformatik Analiz 116

4.4.1.7 İn-Vivo Virulens Testleri ve *Y. ruckeri* serotip O1 BT1 ve BT2 Eprüvasyon Suşlarının Seçim Kriterleri 122

4.4.2 *L. garvieae* ve *L. petauri* Aşı Suşlarının Seçimine Yönelik Çalışmalar *(L. garvieae ve L. petauri* İzolatlarının Fenotipik (Virulens), Serotipik (Hiperimmun Serum Eldesi, Aglütinasyon Testleri) Peoteomik (SDS PAGE, Westernblot) ve Genomik Özellikleri (Tüm Genom Sekans, Genom Biyoinformatik Analizi) 126

4.4.2.1 *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarının Fenotipik Virülens Özellikleri (FVÖ) 126

4.4.2.2 *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarında Kapsül Oluşumunun Elektron Mikroskobu ile Değerlendirilmesi 128

4.4.2.3 *L. garvieae* ve *L. petauri* İzolatlarının Serotipik (Hiperimmun Serum Eldesi) Özellikleri 130

4.4.2.4 *L. garvieae* ve *L. petauri* İzolatlarının Serolojik Özellikleri....131

4.4.2.5 *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarının Tüm Hücre Protein Profilleri....133

4.4.2.6 *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarının Western Blot Analiziyle İmmünojenik Protein Profillerinin Karşılaştırılması 135

4.4.2.7 Genom (Tüm Genom Sekans) ve Genom Biyoinformatik Analizi ile Aşı Suşlarının Belirlenmesi 137

4.4.2.8 Gökkuşağı Alabalıklarında *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarının İn Vivo Virülens Testleri ve Eprüvasyon Suşlarının Seçim Kriterleri....143

4.4.3 *V. anguillarum* Aşı Suşlarının Seçimine Yönelik Çalışmalar *(L. garvieae ve L. petauri* İzolatlarının Fenotipik (Virulens), Serotipik (Hiperimmun Serum Eldesi, Aglütinasyon Testleri) Peoteomik (SDS PAGE, Westernblot) ve Genomik Özellikleri (Tüm Genom Sekans, Genom Biyoinformatik Analizi) 147

4.4.3.1 *Vibrio angullarum* Suşlarının Fenotipik Virülens Özelliklerine (FVÖ) Göre Değerlendirilmesi ve Aşı Suşu Adaylarının Belirlenmesi 147

4.4.3.2 *V. anguillarum* İzolatlarının Serotipik (Hiperimmun Serum Eldesi).....149

4.4.3.3 *V. anguillarum* İzolatlarının Serolojik ve Serotipik Özellikleri.....150

4.4.3.4 *V. anguillarum* Suşlarının Tüm Hücre Protein Profilleri 152

4.4.3.5 *V. anguillarum* Suşlarının Western Blot Analiziyle İmmünojenik Protein Profillerinin Karşılaştırılması.....155

4.4.3.6 Genom (Tüm Genom Sekans) ve Genom Biyoinformatik Analizi ile Aşı Suşlarının Belirlenmesi 158

4.4.3.7 İn-Vivo Virulens Testleri ve *V. anguillarum* Eprüvasyon Suşlarının Seçim Kriterleri 164

4.4.3.8 LD_{60} Dozunun Belirlenmesi 167

4.5 PROTOTIP AŞILARIN ÜRETIMI 173

4.5.1 Monovalan/Bivalan Emülsiyon Banyo ve Enjeksiyon Aşıların Üretimi.....174

4.5.1.1 *Y. ruckeri* BT1 Monovalan Emülsiyon Banyo Aşının GMP Standartlarında Üretimi 174

4.5.1.2 *Y. ruckeri* BT2 Monovalan Emülsiyon Banyo Aşının GMP Standartlarında Üretimi 175

4.5.1.3 *Y. ruckeri* BT1-BT2 Bivalan Emülsiyon Banyo Aşının GMP Standartlarında Üretimi 175

4.5.1.4 *V. anguillarum* Monovalan Emülsiyon Banyo Aşının GMP Standartlarında Üretimi 176

4.5.1.5 *L. garvieae* Emülsion Enjeksiyon Aşının GMP Standartlarında Üretimi ..176

4.5.1.6 *L. petauri* Emülsion Enjeksiyon Aşının GMP Standartlarında Üretimi 177

4.5.1.7 Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşının GMP Standartlarında Üretimi 177

4.5.2 Aşılarda Sterilite Kontrolü.....178

4.5.3 İnaktif Aşılarda Güvenlik (Zararsızlık) Deneyleri 179

4.5.4 Prototip Aşıların (PA) Laboratuvar ve Saha Etkinliklerinin Belirlenmesi 180

4.5.4.1 *Y. ruckeri* BT1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Heterolog *Y. ruckeri* BT1 Suşuna Karşı Etkinliğinin RPS (Relative Percent Survival) ve Kaplan- Meier Sağ Kalım Analiz ile Değerlendirilmesi 183

4.5.4.2 *Y. ruckeri* BT2 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Heterolog *Y. ruckeri* BT2 Şuşuna Karşı RPS (Relative Percent Survival) ve Kaplan- Meier Sağ Kalım Analiz Sonuçları 185

4.5.4.3 *Y. ruckeri* BT1-BT2 Bivalan İnaktif Emülsiyon Banyo Aşısının Heterolog *Y. ruckeri* BT1 Suşuna Karşı RPS (Relative Percent Survival) ve Kaplan-Meier Sağkalım Analizi Sonuçları 187

4.5.4.4 *V. anguillarum* İnaktif Emülsiyon Banyo Aşısının Heterolog *V. anguillarum* Suşuna Karşı RPS (Relative Percent Survival) ve Kaplan-Meier Sağkalım Analizi Sonuçları 190

4.5.4.5 *L. petauri* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşısının Etkinliğinin Değerlendirilmesi 192
4.5.4.6 *L. garvieae* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşının Heterolog *L. garvieae* Suşu ile Yapılan Etkinlik Denemelerine Ait RPS (Relative Percent Survival) ve Sağ Kalım Değerleri 194
4.5.4.7 İnaktif Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşısının Etkinliğinin Değerlendirilmesi 196
4.6 PROTOTIP AŞI/AŞILAR SAHA ÇALIŞMALARI SONUÇ RAPORU 205
4.7 GEN EKSPRESYON SONUÇLARI 208
4.7.1 *Y. ruckeri* BT1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşı Gen Ekspresyon Sonuçları 208
4.7.1.1 TLR-2 Gen Ekspresyon Sonuçları 208
4.7.1.2 IL-8. Gen Ekspresyon Sonuçları 209
4.7.1.3 IL-10 Gen Ekspresyon Sonuçları 210
4.7.1.4 IgT Gen Ekspresyon Sonuçları 211
4.7.1.5 C3 Gen Ekspresyon Sonuçları 212
4.7.1.6 IL-1β Gen Ekspresyon Sonuçları 213
4.7.1.7 IFN-γ Gen Ekspresyon Sonuçları 214
4.7.1.8 CD4-1 Gen Ekspresyon Sonuçları 215
4.7.1.9 CD8-α Gen Ekspresyon Sonuçları 216
4.7.2 *Y. ruckeri* O1 BT2 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşı Gen Ekspresyon Sonuçları 217
4.7.2.1 TLR-2 Gen Ekspresyon Sonuçları 217
4.7.2.2 IgT Gen Ekspresyon Sonuçları 218
4.7.2.3 IL-8 Gen Ekspresyon Sonuçları 219
4.7.2.4 IL-8 Gen Ekspresyon Sonuçları 220
4.7.2.5 IL-10 8 Gen Ekspresyon Sonuçları 220
4.7.2.6 C3 Gen Ekspresyon Sonuçları 222
4.7.2.7 CD4-1 Gen Ekspresyon Sonuçları 223
4.7.2.8 CD8-α Gen Ekspresyon Sonuçları 225
4.7.2.9 IL-1β Gen Ekspresyon Sonuçları 226
4.7.2.10 IFN-γ Gen Ekspresyon Sonuçları 227
4.7.2.11 IgM Gen Ekspresyon Sonuçları 228
4.7.3 *Y. ruckeri* O1 İnaktif Bivalan Emülsiyon Banyo Aşı Gen Ekspresyon Bulguları 229
4.7.3.1 TLR-2 Gen Ekspresyon Bulguları 229
4.7.3.2 IgT Gen Ekspresyon Bulguları 231
4.7.3.3 IL-8 Gen Ekspresyon Bulguları 232
4.7.3.4 IL-10 Gen Ekspresyon Bulguları 233
4.7.3.5 C3. Gen Ekspresyon Bulguları 235

4.7.3.6 CD4-1 Gen Ekspresyon Bulguları 236
4.7.3.7 CD8-α Gen Ekspresyon Bulguları 238
4.7.3.8 IL-1β Gen Ekspresyon Bulguları....239
4.7.3.9 IFN-γ Gen Ekspresyon Bulguları 241
4.7.3.10 IgM Gen Ekspresyon Bulguları....242
4.7.4 *V. anguillarum* O1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşı Gen Ekspresyon Bulguları...243
4.7.4.1 TLR-2 Gen Ekspresyon Bulguları....243
4.7.4.2 IL-8 Gen Ekspresyon Bulguları....245
4.7.4.3 IL-10 Gen Ekspresyon Bulguları....246
4.7.4.4 IgT Gen Ekspresyon Bulguları....247
4.7.4.5 IgM Gen Ekspresyon Bulguları....248
4.7.4.6 C3 Gen Ekspresyon Bulguları 249
4.7.4.7 IL-1β Gen Ekspresyon Bulguları....250
4.7.4.8 IFN-γ Gen Ekspresyon Bulguları 251
4.7.4.9 CD4-1 Gen Ekspresyon Bulguları 252
4.7.4.10 CD8-α Gen Ekspresyon Bulguları 253
4.7.5 *L. garvieae* İnaktif Enjeksiyon Emülsiyon Aşı Gen Ekspresyon Bulguları....254
4.7.5.1 C3 Gen ekspresyon Bulguları....254
4.7.5.2 IgM Gen Ekspresyon Bulguları....256
4.7.5.3 IgT Gen Ekspresyon Bulguları....258
4.7.5.4 IL-8 Gen Ekspresyon Bulguları....259
4.7.5.5 IL-10 Gen Ekpresyon Bulguları 260
4.7.5.6 IFN-γ Gen Ekspresyon Bulguları 261
4.7.5.7 TLR-2 Gen Ekspresyon Bulguları....262
4.7.5.8 IL-1β Gen Ekspresyon Bulguları....263
4.7.5.9 CD4-1 Gen Ekspresyon Bulguları 264
4.7.5.10 CD8-α Gen Ekspresyon Bulguları 265
4.7.6 *L. petauri* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşı 267
4.7.6.1 C3 Gen Ekspresyonu 267
4.7.6.2 IgM Gen Ekspresyon Gen Bulguları 268
4.7.6.3 IgT Gen Ekspresyon Bulguları....269
4.7.6.4 IL-8. Gen Ekspresyon Bulguları....270
4.7.6.5 IL-10 Gen Ekspresyon Bulguları....272
4.7.6.6 IFN-γ Gen Ekspresyon Bulguları 273
4.7.6.7 TLR-2 Gen Ekspresyon Bulguları....274
4.7.6.8 IL-1β Gen Ekspresyon Bulguları....275
4.7.6.9 CD4-1 Gen Ekspresyon Bulguları 276

4.7.6.10 CD8-α Gen Ekspresyon Vulguları 277
4.7.7 İnaktif Beşli Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı (YLV5 ICIEV) Gen Ekspresyonu Bulguları 278
4.7.7.1 TLR-2 Gen Ekspresyonu Bulguları 278
4.7.7.2 IL-8 Gen Ekspresyonu 279
4.7.7.3 IgT Gen Ekspresyonu 281
4.7.7.4 IgM Gen Ekspresyonu Bulguları 282
4.7.7.5 . C3 Gen Ekspresyonu Bulguları 284
4.7.7.6 IL-10 Gen Ekspresyonu Bulguları 285
4.7.7.7 IL-1β Gen Ekspresyonu Bulguları 286
4.7.7.8 IFN-γ Gen Ekspresyonu Bulguları 287
4.7.7.9 CD4-1 Gen Ekspresyonu Bulguları 289
4.7.7.10 CD8-α Gen Ekspresyonu Bulguları 290
5. TARTIŞMA 292
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 340
6.1 YEREL MALDI-TOF MS VERI KÜTÜPHANESI 340
6.2 ANTIMIKROBIYAL DUYARLILIK VE ECOFF/ECV DEĞERLERININ BELIRLENMESI 341
6.3 VIRÜLENS BELIRLEME, AŞI SUŞU SEÇIMI VE KARAKTERIZASYONU 342
6.4 AŞI FORMÜLASYONU, GÜVENLIK VE ETKINLIK DENEMELERI 344

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Prototip aşı geliştirme denemesinde (*Y. ruckeri* O1, *L. garvieae*, *V. anguillarum* O1) balık ağırlıkları ve sayıları* 9
Tablo 2. Virülans çalışmasında kullanılan izolatlarının kökenleri, serotipik/biyotipik (BT) özellikleri, uygulama yolu, bakteri dozu ve enjeksiyon dozu ile ilgili bilgiler. 24
Tablo 3. Gökkuşağı Alabalığı *Y. ruckeri* BT1 ve *Y. ruckeri* BT2 İnaktif Kombine Emülsiyon Daldırma/Enjeksiyon Aşı Güvenlik Testleri Deney Planı 28
Tablo 4. Gökkuşağı Alabalığı *V. anguillarum* O1 İnaktif Emülsiyon Daldırma/Enjeksiyon Aşı Güvenlik Testleri Deney Planı 28
Tablo 5. Gökkuşağı Alabalığı *L. garvieae* ve *L. petauri* İnaktif Bivalan Enjeksiyon Emülsiyon Aşı (İBEEA) Güvenlik Testleri Deney Planı.....29
Tablo 6. Gökkuşağı Alabalığı *Y. ruckeri* O1 BT1, *Y. ruckeri* O1 BT2, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* O1 İnaktif Beşli Kombine Konsante Emülsiyon Enjeksiyon Aşı (YLV5 ICIEV) Güvenlik Testleri Deney Planı 30
Tablo 7. Eprüvasyon Deneylerinde Kullanılan Suşlarının LD60 Dozlarının (cfu/mL) Belirlenmesi Deney Planı 31
Tablo 8. Gökkuşağı Alabalığı (GA) *Y. ruckeri* (BT1 ve BT2) İnaktif Bivalan Emülsiyon Daldırma ve Enjeksiyon Aşı (Yr O1 Bivalan Daldırma/Enjeksiyon Aşı) Etkinlik Testleri Deney Planı....32
Tablo 9. Gökkuşağı Alabalığı *V. anguillarum* O1 İnaktif Emülsiyon Daldırma/Enjeksiyon Aşı Etkinlik Testleri Deney Planı 33
Tablo 10. Gökkuşağı Alabalığı *L. garvieae* ve *L. petauri* İnaktif Bivalan Enjeksiyon Emülsiyon Aşı (Bivalan Enjeksiyon Aşı) Etkinlik Testler Deney Planı.....33
Tablo 11. Gökkuşağı Alabalığı *Y. ruckeri* O1 BT1, *Y. ruckeri* O1 BT2, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* O1 İnaktif Beşli Kombine Konsante Emülsiyon Enjeksiyon Aşı (YLV5 ICIEV) Etkinlik (Potens) Testleri Deney Planı.....34
Tablo 12. Proje kapsamında örnekleme yapılan pilot işletme ve/veye tesislere ait su sıcaklık (sT) ve çözünmüş O2 (ÇO) değerleri.....38
Tablo 13. Pilot İşletmelerde MALDI TOF MS ile Tanımlanan Bakteri Türlerinin Dağılımı 38
Tablo 14. Gökkuşağı Alabalığı İşletmelerinde Yaygın Olan Bakteriyel Etkenler.....40
Tablo 15. Doğrudan formik asit ekstraksiyonu (FAE) ile tanımlanan (I. Aşama) izotlar ile yerel veri kütüphanesinde etanal-formik asit ekstraksiyonu (EFAE) yöntemi (III aşama) uygulanarak tanımlanan izolatlar arasındaki identifikasyon değişimleri.....46
Tablo 16. *Aeromonas* spp. izolatlarının (n=38) antimikrobiyallere karşı tahmini epidemiyolojik sınır değerleri ve duyarlılık tiplerinin yüzdeleri 50
Tablo 17. *Aeromonas* spp. izolatlarının Disk Difuzyon Testi Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları 51
Tablo 18. *Pseudomonas* spp. izolatlarının (n=38) antimikrobiyallere karşı tahmini epidemiyolojik sınır değerleri ve duyarlılık tiplerinin yüzdeleri 53
Tablo 19. *Pseudomonas* spp. Türlerinin disk difüzyon yöntemine ilişkin antimikrobiyal duyarlılık sonuçları 54
Tablo 20. *Y. ruckeri* izolatlarının Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları.....55
Tablo 21. *L. petauri* izolatlarının Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları.....57
Tablo 22. *Vibrio* spp. izolatlarının (n=3) antimikrobiyallere karşı tahmini epidemiyolojik sınır değerleri ve duyarlılık tiplerinin yüzdeleri 58
Tablo 23. *V. anguillarum* izolatlarının Disk Difüzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları.....59
Tablo 24. F. psychrophilum izolatlarının (n=26) antimikrobiyallere karşı tahmini epidemiyolojik sınır değerleri ve duyarlılık tiplerinin yüzdeleri 60
Tablo 25. *F. psychrophilum* İzolatlarının Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları 60

Tablo 26. *Vagococcus salmoninarum* İzolatlarının Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları 62
Tablo 27. *Y. ruckeri* izolatlarının illere göre dağılımı ve fenotipik virulens özellikleri.....104
Tablo 28. *Y. ruckeri* Suşlarının Fenotipik Özellikleri.....104
Tablo 29. *Y. ruckeri* O1 BT1 ve O1 BT2 İzolatlarının Tam Hücre (WC) Tavşan Antiserumları ile Mikroplak (Kantitatif) Aglütinasyon Sonuçları 107
Tablo 30. SDS PAGE tam hücre protein tipleri ile *Y. ruckeri* Serotip O1 İzolatlarının biyotipleri arasındaki ilişki. 111
Tablo 31. Western Blot Analizinde BT1 ve BT2 antiserumlarına karşı Serotip O1 BT1 suşlarında Antijenik Protein Bantlarının Dağılımı. 114
Tablo 32. Western Blot Analizinde BT1 ve BT2 antiserumlarına karşı serotipi O1 BT2 suşlarında antijenik protein bantlarının dağılımı. 115
Tablo 33. *Y. ruckeri* izolatları için flh C'nin 143, 157 kodonları ve fli P'nin 224 kodonlarındaki amino asit pozisyonları ve DNA dizi verileri, GenBank veri tabanında bulunan farklı serotipler, biyotipler ve klonal komplekslerden elde edilen izolatlarla karşılaştırıldı (n =48). 119
Tablo 34. Riborg ve ark. (2023) tarafından bildirilen varsayımsal faktörler listesine göre *Y. ruckeri* O1 BT 1 ve BT2 suşlarımızda virülans genlerinin varlığı/yokluğu 120
Tablo 35. Prototip aşı üretmek için seçilen *L. garvieae* izolatlarının izolasyon bilgileri ve FVÖ profilleri 126
Tablo 36. Prototip aşı üretmek için seçilen *L. petauri* izolatlarının izolasyon bilgileri ve FVÖ profilleri 127
Tablo 37. *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatlarının aglutinasyon test sonuçları.....132
Tablo 38. Bu çalışmadan elde edilen *L. garvieae* ve *L. petauri* suşları arasında karşılaştırılan virülans genlerine ilişkin bulgular. 139
Tablo 39. *L. garvieae* İzolatları Gökkuşağı Alabalığı Virulens Deneyleri 143
Tablo 40. *L. petauri* İzolatları Gökkuşağı Alabalığı Virulens Deneyleri 144
Tablo 41. *V. anguillarum* izolatlarının FVÖ özellikleri 147
Tablo 42. *V. anguillarum* O antijen ve antiserumların lam aglütinasyon sonuçları.....150
Tablo 43. *V. anguillarum* O antijen ve antiserumların mikroplak aglütinasyon sonuçları 151
Tablo 44. SDS PAGE analizinde protein profil benzerlik ilişkileri ve bant sayılarına göre *V. anguillarum* izolatlarının gruplandırılması 153
Tablo 45. Çalışmada Kullanılan *V. anguillarum* izolatların genomlarına ilişkin bulgular 160
Tablo 46. Gökkuşağı alabalıklarında *V. anguillarum* İzolatlarının Virulens Deneyleri 165
Tablo 47. LD 60 Doz (cfu/ml) Deneylerinde Kullanılan Çalışma (Working Seed) Suşlarının Uygulama Dozları ve Balık Gruplarına İlişkin Deney Planı.....167
Tablo 48. Emülsiyon banyo ve enjeksiyon monovalan ve emülsiyon polivalan aşı üretiminde kullanılan ana tohum (master seed) suşları 174
Tablo 49. Enjeksiyon emülsiyon kombine aşıda kullanılan bakteri suşları ve bu suşların aşı formulasyon bilgileri.....178
Tablo 50. Banyo ve enjeksiyon emülsiyon aşıların güvenlik deneyleri deney planı 179
Tablo 51. Monovalan (M) ve Bivalan (B) Banyo Emülsiyon (BE) ile Enjeksiyon Emülsiyon (EE) Aşılarının Etkinlik Denemelerinde Kullanılan Balık Grupları ve Birey Sayıları 182
Tablo 52. *Y. ruckeri* BT1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Eprüvasyon Testi Sonuçları 182
Tablo 53. *Y. ruckeri* BT2 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Eprüvasyon Testi Sonuçları 184
Tablo 54. *Y. ruckeri* BT1-BT2 Bivalan İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Eprüvasyon Test Sonuçları 186
Tablo 55. *Y. ruckeri* BT1-BT2 Bivalan İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Eprüvasyon Testi Sonuçları 188
Tablo 56. *V. anguillarum* İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Eprüvasyon Testi Sonuçları 189
Tablo 57. *L. petauri* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşının Eprüvasyon Test Sonuçları 191
Tablo 58. *L. garvieae* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşının Eprüvasyon Testi Sonuçları 193
Tablo 59. Kombine emülsiyon enjeksiyon (KEE) aşıların etkinlik deneylerinde kullanılan balık grupları ve birey sayıları 196

Tablo 60. İnaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *Y. ruckeri* BT1 Suşuna karşı etkinliği 197
Tablo 61. İnaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *Y. ruckeri* BT2 suşuna karşı etkinliği 198
Tablo 62. İnaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *Y. ruckeri* suşuna karşı etkinliği 200
Tablo 63. İnaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *L. petauri* suşuna karşı etkinliği 202
Tablo 64. İnaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *L. garvieae* suşuna karşı etkinliği 203
Tablo 65. A İşletmesinde, yaklaşık 100 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarına uygulanan yerli inaktif beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV) ile ithal menşeili enjeksiyon aşının, 60 günlük izleme süresi sonunda elde edilen kümülatif mortalite ve sağ kalım oranlarının karşılaştırmalı olarak sunumu. 206
Tablo 66. B İşletmesinde yerli inaktif beşli kombine enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV) uygulanan ve yalancı aşılama yapılan gökkuşağı alabalıklarında 60 günlük saha denemesi sonucunda elde edilen kümülatif mortalite, ve sağ kalım oranları.....207

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bruker kütüphanesine kaydı yapılan izolatların kayıt tarihleri ve skorları 43
Şekil 2. *Pseudomonas* spp. izolatlarının Oksitetrasiklin'e karşı MIC dağılımı ve epidemiyolojik eşik değerin EcoFFinder yöntemiyle belirlenmesi. 65
Şekil 3. NRI analizinde oksitetrasikline karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarında MIC değerlerinin dağılımı 65
Şekil 4. EcoFFinder analizinde florfenikole karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve florfenikolün epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi 66
Şekil 5. Florfenikol'e karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarında MIC dağılımı ve COwt hesaplaması (NRI yöntemi). 67
Şekil 6. EcoFFinder analizinde sulfamethoksazol+trimetoprime karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve sulfamethoksazol+trimetoprimin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi 69
Şekil 7. NRI analizinde sulfamethoksazol+trimetoprime karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarında MIC dağılımı ve COwt hesaplaması. 70
Şekil 8. EcoFFinder analizinde eritromisine karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve eritromisinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi 71
Şekil 9. *Pseudomonas* spp. izolatlarının eritromisine karşı NRI analizine göre MIC dağılımı 72
Şekil 10. EcoFFinder analizinde enrofloksasine karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve COwt hesaplaması. 73
Şekil 11. NRI analizinde enrofloksasine karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve eşik değerin belirlenmesi. 73
Şekil 12. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve eşik değerin belirlenmesi. 74
Şekil 13. NRI analizinde doksisikline karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve COwt belirlenmesi. 75
Şekil 14. EcoFFinder analizinde oksitetrasikline karşı *Aeromonas* spp. izolatlarında MIC konsantrasyon dağılımları ve oksitetrasiklinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi 76
Şekil 15. NRI analizinde doksisikline karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve COwt belirlenmesi. 76
Şekil 16. EcoFFinder analizinde florfenikole karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve florfenikolün epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi 78
Şekil 17. NRI analizinde florfenikole karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve COwt belirlenmesi. 78
Şekil 18. EcoFFinder analizinde sulfamethoksazol+trimetoprime karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve sulfamethoksazol+trimetoprimin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV, COwt) belirlenmesi 79
Şekil 19. NRI analizinde sulfamethoksazol+trimetoprime karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve COwt belirlenmesi.....80
Şekil 20. EcoFFinder analizinde eritromisine karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyonlarının dağılımı ve epidemiyolojik eşik değerinin belirlenmesi 80
Şekil 21. NRI analizinde eritromisine karşı *Aeromonas* spp. izolatlarında MIC konsantrasyonlarının dağılımı.....81
Şekil 22. EcoFFinder analizinde enrofoksasine karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve enrofloksasinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi 81
Şekil 23. NRI analizinde enrofloksasine karşı *Aeromonas* spp. izolatlarında MIC değerlerinin dağılımı 82

Şekil 24. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve doksisiklinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi 83
Şekil 25. NRI analizinde doksisikline karşı *Aeromonas* spp. izolatlarında MIC değerlerinin dağılımı 83
Şekil 26. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve doksisiklinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi 84
Şekil 27. NRI analizinde oksitetrasikline karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC değerlerinin dağılımı 85
Şekil 28. EcoFFinder analizinde florfenikole karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve epidemiyolojik eşik değeri (ECV, COwt). 86
Şekil 29. NRI analizinde florfenikole karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve epidemiyolojik eşik değeri (COwt). 86
Şekil 30. EcoFFinder analizinde *Y. ruckeri* izolatlarının sulfametoksazol+trimetoprime karşı MIC konsantrasyon dağılımı ve eşik değerin belirlenememesi. 87
Şekil 31. NRI analizinde sulfametoksazol+trimetoprime karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC dağılımı ve belirlenen COwt değeri. 88
Şekil 32. EcoFFinder analizinde eritromisine karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve belirlenen epidemiyolojik eşik değeri. 89
Şekil 33. NRI analizinde eritromisine karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC değerlerinin dağılımı ve belirlenen COwt değeri. 89
Şekil 34. EcoFFinder analizinde enrofloksasine karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve belirlenen ECV değeri. 90
Şekil 35. NRI analizinde enrofloksasine karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC değerlerinin dağılımı ve belirlenen COwt değeri 90
Şekil 36. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve doksisiklinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV, COwt) belirlenmesi 91
Şekil 37. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve belirlenen ECV değeri. 92
Şekil 38. EcoFFinder analizinde oksitetrasikline karşı *L. petauri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve ECV (COwt) değerinin belirlenmesi. 93
Şekil 39. NRI analizinde oksitetrasikline karşı *L. petauri* izolatlarının MIC konsantrasyonlarının dağılımı ve COwt değerinin belirlenmesi. 93
Şekil 40. EcoFFinder analizinde florfenikole karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımı ve ECV (COwt) değerinin belirlenmesi 94
Şekil 41. NRI analizinde florfenikole karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımları ve COwt değerinin belirlenmesi. 95
Şekil 42. EcoFFinder analizinde sulfamethoksazol + trimetoprime karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımları ve ECV (COwt) değerinin belirlenmesi. 96
Şekil 43. NRI analizinde sulfamethoksazol + trimetoprime karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımları ve COwt değerinin belirlenmesi. 96
Şekil 44. EcoFFinder analizinde eritromisine karşı *L. petauri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve ECV (COwt) değerinin belirlenmesi. 97
Şekil 45. NRI analizinde eritromisine karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımları ve COwt değerinin belirlenmesi. 97
Şekil 46. EcoFFinder analizinde enrofloksasine karşı *L. petauri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve ECV değerinin belirlenmesi 98
Şekil 47. NRI analizinde enrofloksasine karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımı ve COwt değerinin belirlenmesi. 99
Şekil 48. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *L. petauri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve ECV değerinin belirlenmesi. 100
Şekil 49. NRI analizinde *L. petauri* izolatlarının doksisiklin MIC değerinin dağılımı. COwt değerinin belirlenmesi. 100

Şekil 50 ELISA analizi ile *Y. ruckeri* O1 BT1 (NCTC 12266) antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü.....106
Şekil 51 ELISA analizi ile *Y. ruckeri* O1 BT1 (NCTC 12266) antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü 106
Şekil 52. *Y. ruckeri* O1 BT1 ve O1 BT2 suşlarının SDS PAGE protein bantları Şerit 1: NCTC 12266, Şerit 2: Referans BT2. 109
Şekil 53 *Y. ruckeri* İzolatlarının Tüm Hücre Proteinlerinin UPGMA Kümeleme Analizi Dendrogramı 110
Şekil 54. (A): *Y. ruckeri* BT1 antiserumu ile muamele edilen BT1 ve BT2 (Y2022–518) izolatlarının Western Blot analiz sonuçları; (B): *Y. ruckeri* BT2 antiserumu ile muamele edilen BT1 ve BT2 (Y2022–518) İzolatlarının Western Blot analiz sonuçları; (C): *Y. ruckeri* BT1 antiserumu ile muamele edilen NCTC12266 (I) ve Y2022–239 (II) izolatlarının Western Blot analiz sonuçları. 112
Şekil 55. (A): *Y. ruckeri* BT2 antiserumu ile muamele edilen BT2 ve BT1(Y121) şzolatlarının Western Blot analiz sonuçları; (B): *Y. ruckeri* BT2 antiserumu ile muamele edilen BT2 ve temsili BT1(Y121) izolatlarının Western Blot analiz sonuçları. 113
Şekil 56. Gökkuşağı Alabalığından İzole Edilen *Y. ruckeri* Suşlarının Genom Tabanlı Filogenetik Analizi. Mavi işaretli suşlar GenBank'ta kayıtlı Türk serotip O1 CC2 suşlarını, pembe işaretli suşlar GenBank'ta kayıtlı diğer ülkelerden kayıtlı serotip O1 CC2 suşlarını temsil eder.....117
Şekil 57. *Y. ruckeri* serotip O1 BT1 ve BT2 suşlarıyla Gökkuşağı alabalığında yapılan deneysel enfeksiyonda (A): *Y. ruckeri* O1 BT1 ile enfekte gökkuşağı alabalığında renk koyulaşması ve ekzoftalmus ; (B): *Y. ruckeri* O1 BT1 ile enfekte gökkuşağı alabalığında ağız, karın yüzgeçleri ve anüs çevresinde kanamalar ; (C): *Y. ruckeri* O1 BT2 ile enfekte gökkuşağı alabalığında dil ve alt çenede kanamalar. 123
Şekil 58. 21 günlük enfeksiyon periyodunda gökkuşağı alabalıklarının Kaplan–Meier sağkalım eğrileri.(A): BT1 izolatlarına ait sağkalım eğrileri (Y2022–239, Y258, Y2022–266); (B): BT2 izolatlarına ait sağkalım eğrileri (Y248, Y2022–430, Y254); (C): Tüm izolatların toplu sağkalım eğrileri; (D): BT1 ve BT2 grupları arası karşılaştırmalı sağkalım sonuçları ($p<0,05$). Şekillerde grup etiketleri üzerindeki küçük harf farkları, gruplar arası istatistiksel anlamlılıkları ifade etmektedir. 124
Şekil 59. *L. petauri* izolatları L1'de (A), LMG 30040^{T}'de (B) ve *L. garvieae* izolatı L67'de (C) kapsül benzeri yapı veya mikro kapsüllenmişlik (düz kırmızı ok) gösteren seçilmiş *L. garvieae* ve *L. petauri* bakteri hücrelerinin elektron mikroskobu görüntüsü ve *L. garvieae* ATCC 43921^{T}'de (D) bu yapıların yokluğu (noktalı kırmızı ok) 129
Şekil 60. ELISA analizi ile *L. garvieae* (ATCC 43921) antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü.....130
Şekil 61. ELISA analizi ile *L. garvieae* (ATCC 43921) antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü 131
Şekil 62. *L. garvieae* ve *L. petauri* saha suşlarının SDS-PAGE analizine dayalı tüm hücre protein profili dendrogramı. %90 benzerlik indeksine göre iki ana filogrup, %100 benzerliğe göre 12 alt grup belirlenmiştir. 134
Şekil 63. *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatlarının farklı antiserumlarla yapılan Western blot analizlerine ait immunoreaktif protein profilleri. 136
Şekil 64. Gökkuşağı alabalığından izole edilen *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarının Genom Tabanlı Filogenetik Analizi. Kırmızı ile işaretli suşlar Türkiye kökenlidir. 138
Şekil 65. Gökkuşağı alabalıklarında *L. garvieae* ile yapılan eprüvasyonda deride hiperpigmentasyon ve gözlerde egzoftalmus görüntüsü. 146
Şekil 66. Gökkuşağı alabalıklarında *L. petauri* ile deneysel enfeksiyon sonucunda deride hiperpigmentasyon ve gözlerde egzoftalmus (resim A ve B) görüntüsü.....146
Şekil 67. ELISA analizi ile *V. anguillarum* serotip O1 antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü.....149
Şekil 68. ELISA analizi ile *V. anguillarum* serotip O2a antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü.....149

Şekil 69. ELISA analizi ile *V. anguillarum* serotip O2b antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plak görüntüsü 150
Şekil 70. *Y. ruckeri* İzolatlarının Tüm Hücre Proteinlerinin UPGMA Kümeleme Analizi Dendrogramı 153
Şekil 71. A, B: *V. anguillarum* Serotip O1 (NCIMB 2131) antiserumu ile muamele edilen saha ve referans izolatların Westernblot profilleri Tekrarlı analizleri.(M: Moleküler ağırlık belirteci; İzolatlar: V-12, V-18, V-21, V-85, V2022-104 saha suşları; NCIMB 6 Serotip O2a, NCIMB 2130 Serotip O2b, NCIMB 2131 O1 referans suşlar).....155
Şekil 72. *V. anguillarum* Serotip O2a serumu ile muamele edilen *V. anguillarum* İzolatlarının westernblot profilleri (M: Marker, V-12, V-18, V-21, V-85, V-104 saha suşları; NCIMB 6 O2a, NCIMB 2130 O2b, NCIMB 2131 O1 referans suşlar).....156
Şekil 73. *V. anguillarum* serotip O2b serumu ile muamele edilen *V. anguillarum* izolatlarının westernblot profilleri (M: Marker, V12, V18, V21, V85, V104 saha suşları; NCIMB 6 O2a, NCIMB 2130 O2b, NCIMB 2131 O1 referans suşlar).....157
Şekil 74. *V. anguillarum* izolatlarına ait filogenetik ağaç, 3800 tek kopya genin amino asit dizileri kullanılarak BV-BRC sunucusu üzerinden oluşturulmuştur. Kırmızı ile işaretli suşlar Türkiye kökenlidir. 162
Şekil 75. TYGS sunucusunda genom temelli oluşturulan filogenetik analiz.....163
Şekil 76. Gökkuşağı alabalıklarında *V. anguillarum* ile deneysel enfeksiyon sonucunda deride koyulaşma, çift yüzgeçlerin kaidesi ve karın bölgesinde eritem ve hemoraji görüntüsü 166
Şekil 77. *Y. ruckeri* Y-286 BT1 suşunun probit analizi LD60 tahmini değeri (2,5x106). 168
Şekil 78. *Y. ruckeri* Y-286 BT1 suşunun Probit analizi LD60 (tetal doz) doz grafiği (%60 için Probit değeri=0,253).....169
Şekil 79. *Y. ruckeri* Y-2430 BT2 suşunun probit analizi LD60 tahmini değeri (8,4x105). 169
Şekil 80. *Y. ruckeri* Y-430 BT2 suşunun probit analizi LD60 doz grafiği (%60 için probit değeri=0,253).....170
Şekil 81. *L. garvieae* L-67 suşunun probit analizi LD60 tahmini değeri (6,7x106) 170
Şekil 82. *L. garvieae* L-67 suşunun probit analizi LD60 doz grafiği (%60 için probit değeri=0,253).....171
Şekil 83. *L. garvieae* L-296 suşunun probit analizi LD60 tahmini değeri (8,8x105) 172
Şekil 84. *L. garvieae* L-67 suşunun probit analizi LD60 doz grafiği (%60 için probit değeri=0,253).....172
Şekil 85. *V. anguillarum* V-18 suşunun probit analizi LD60 tahmini değeri (1,6x106).....173
Şekil 86. *V. anguillarum* V-18 suşunun probit analizi LD60 doz grafiği (%60 için probit değeri=0,253).....173
Şekil 87. Üretimi yapılan *Y. ruckeri* BT1 monovalan emülsiyon banyo aşı 174
Şekil 88. Üretimi yapılan *Y. ruckeri* BT2 monovalan emülsiyon banyo aşı 175
Şekil 89. Üretimi yapılan *Y. ruckeri* BT1 ve BT2 bivalan emülsiyon banyo aşı 176
Şekil 90. Üretimi yapılan *V. anguillarum* O1 monovalan emülsiyon banyo aşı 176
Şekil 91. Üretimi yapılan *L. garvieae* monovalan emülsiyon enjeksiyon aşı 177
Şekil 92. Üretimi yapılan 2. seri *L. petauri* monovalan emülsiyon enjeksiyon aşı 177
Şekil 93. Proje kapsamında üretimi yapılan ve güvenlik testinden geçen Kombine (pentavalan) emülsiyon enjeksiyon aşı.....178
Şekil 94. Proje kapsamında üretimi yapılan güvenlik deneylerinden geçen 1. seri aşılar 180
Şekil 95. Proje kapsamında üretimi yapılan 2. seri aşılar.....180
Şekil 96. *Y. ruckeri* BT1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşısının heterolog *Y. ruckeri* BT1 suşu ile yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği.....184
Şekil 97. *Y. ruckeri* BT1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşısının heterolog *Y. ruckeri* BT1 suşu ile yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği.....185
Şekil 98. *Y. ruckeri* BT1-BT2 bivalan inaktif emülsiyon banyo aşısının heterolog *Y. ruckeri* BT1 suşu ile yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği.....187
Şekil 99. *Y. ruckeri* BT1-BT2 bivalan inaktif emülsiyon banyo aşının heterolog Y.ruckeri BT2 suşu ile yapılan denemelerine ait Kaplan-Meier sağ kalım analizi grafiği. 189

Şekil 100. *V. anguillarum* inaktif emülsiyon banyo aşının heterolog *V. anguillarum* suşuyla yapılan denemelerine ait Kaplan-Meier sağ kalım analizi grafiği. 191
Şekil 101. *L. petauri* inaktif emülsiyon enjeksiyon banyo aşının heterolog *L. petauri* suşu ile yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier sağ kalım analizi grafiği....193
Şekil 102. *L. garvieae* inaktif emülsiyon enjeksiyon aşısının heterolog *L. garvieae* suşu ile yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği....195
Şekil 103. Beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *Y. ruckeri* BT1 suşuyla yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier Sağ Kalım Analiz grafiği 198
Şekil 104. Beşli Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşısının *Y. ruckeri* BT2 suşuna karşı yapılan eprüvasyon denemesine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği. 200
Şekil 105. Beşli Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşısının heterolog *L. petauri* suşuna karşı etkinliği. 203
Şekil 106. Beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşısının *Y. ruckeri* BT1 suşuna karşı yapılan eprüvasyon denemesine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği. 205
Şekil 107. A İşletmesinde, yaklaşık 100 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarına uygulanan yerli inaktif beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV) ile ithal menşeili enjeksiyon aşının 60 günlük izleme süresine ait sağ kalım verileri 206
Şekil 108. B İşletmesinde, yerli inaktif beşli kombine enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV) uygulanan ve yalancı aşılama yapılan gökkuşağı alabalıklarında (n=1.000) yürütülen 60 günlük saha denemesi sonucunda elde edilen sağ kalım ve mortalite oranlarının grafiksel gösterimi. 207
Şekil 109. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulamasını takiben, TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında zamana bağlı değişimi (4. saat – 14. gün) gösterilmektedir. 209
Şekil 110. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşı uygulaması sonrası, IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında zamana bağlı değişimi (4. saat – 14. gün) gösterilmektedir. 210
Şekil 111. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, IL-10 geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif ekspresyon düzeyleri gösterilmektedir. 211
Şekil 112. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, IgT geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif ekspresyon düzeyleri sunulmaktadır. 212
Şekil 113. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, C3 geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki zamana bağlı relatif ekspresyon düzeyleri (4. saat–14. gün) gösterilmektedir. 212
Şekil 114. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, IL-1β geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki zamana bağlı relatif ekspresyon düzeyleri (4. saat–14. gün) gösterilmektedir. 213
Şekil 115. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, IFN-γ geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı değişimi (4. saat–14. gün) gösterilmektedir. 214
Şekil 116. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, CD4-1 geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki relatif ekspresyon düzeylerinin 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi gösterilmektedir. 215
Şekil 117. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, CD8-α geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki ekspresyon düzeylerinin 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi gösterilmektedir. 216
Şekil 118. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulamasını takiben TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 217
Şekil 119. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulamasını takiben IgT gen ekspresyonunun, solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 218

Şekil 120. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulaması sonrası IL-8 gen ekspresyonunun, solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 219
Şekil 121. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanan grupta IL-10 gen ekspresyonunun, solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 221
Şekil 122. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanan grupta C3 gen ekspresyonunun, solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki 4. saat – 14. gün arasındaki relatif ekspresyon düzeyleri grafiksel olarak sunulmaktadır. 222
Şekil 123. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşı uygulanması sonrasında, C3 gen ekspresyonunun farklı organlarda zamana bağlı değişimi (4. saat – 14. gün) grafiksel olarak sunulmaktadır. 224
Şekil 124. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşı uygulanması sonrasında, CD8-α gen ekspresyonunun farklı organlarda zamana bağlı değişimi (4. saat – 14. gün) grafiksel olarak sunulmaktadır. 225
Şekil 125. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanması sonrasında, IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 226
Şekil 126. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanması sonrasında, IFN-γ gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 227
Şekil 127. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanması sonrasında, CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 229
Şekil 128. *Y. ruckeri* O1 BT1 kombine banyo aşısı uygulanması sonrasında, TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 230
Şekil 129. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulamasını takiben, IgT gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 231
Şekil 130. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulamasını takiben, IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 233
Şekil 131. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulanması sonrasında, IL-10 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 234
Şekil 132. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulanması sonrasında, C3 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 235
Şekil 133. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulanması sonrasında, CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 237
Şekil 134. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulanması sonrasında, CD8-α gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 238
Şekil 135. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı ile aşılama sonrası, IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 240
Şekil 136. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı ile aşılama sonrası IFN-γ gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 241
Şekil 137. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı ile aşılama sonrası IgM gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 242

Şekil 138. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulamasını takiben TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 244
Şekil 139. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulamasını takiben, IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasında zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 246
Şekil 140. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben IL-10 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 247
Şekil 141. *V. anguilarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben. IgT gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 248
Şekil 142. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, IgM gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 249
Şekil 143. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, C3 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 250
Şekil 144. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 251
Şekil 145. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, IFN-γ gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 252
Şekil 146. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 253
Şekil 147. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, CD8-α gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 254
Şekil 148. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasınını takiben C3 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 255
Şekil 149. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasınını takiben IgM gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 257
Şekil 150. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasınını takiben IgT gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 258
Şekil 151. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 260
Şekil 152. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-10 gen ekspresyonunun zamana ve dokuya bağlı dağılımı sunulmaktadır. 261
Şekil 153. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IFN-γ gen ekspresyonunun zamana ve dokuya bağlı dağılımı sunulmaktadır. 261
Şekil 154. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben TLR-2 gen ekspresyonunun zamana ve dokuya bağlı dağılımı sunulmaktadır. 262
Şekil 155. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 263
Şekil 156. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 264

Şekil 157. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben CD8-α gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 265
Şekil 158. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben C3 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 267
Şekil 159. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IgM gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 269
Şekil 160. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IgT gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 270
Şekil 161. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 271
Şekil 162. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-10 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 272
Şekil 163. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IFN-γ gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 273
Şekil 164. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 274
Şekil 165. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 275
Şekil 166. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 276
Şekil 167. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben CD8-α gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 277
Şekil 168. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 279
Şekil 169. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 280
Şekil 170. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IgT gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 282
Şekil 171. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IgM gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 283
Şekil 172. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben C3 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 284
Şekil 173. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IL-10 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 286
Şekil 174. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 287

Şekil 175. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IFN-γ gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 288
Şekil 176. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 289
Şekil 177. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben CD8-α gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır. 290

ÖZET

Bu proje, Türkiye'de ticari olarak yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarında yaygın bakteriyel enfeksiyonların tanı, izleme ve kontrolüne yönelik bütüncül bir strateji geliştirmiştir. Yaklaşım; MALDI-TOF MS tabanlı yerel tanı veri kütüphanesinin oluşturulması, patojenlerin fenotipik, serolojik, moleküler ve genomik düzeyde karakterizasyonu, hedef türlere özgü antimikrobiyal cut-off (ECOFF) değerlerinin belirlenmesi ve bu veriler doğrultusunda inaktif aşı prototiplerinin geliştirilmesini kapsamaktadır.

Türkiye'nin farklı bölgelerindeki işletmelerden izole edilen *Yersinia ruckeri* (BT1, BT2), *Lactococcus garvieae*, *L. petauri* ve *Vibrio anguillarum* suşları üzerinde fenotipik virülens özellikleri (FVÖ), 16S rRNA ve tür-spesifik PCR, SDS-PAGE, Western blot, serotiplendirme ve tüm genom sekanslama yöntemleri uygulanmıştır. MALDI-TOF MS yerli veri kütüphanesi, su ürünleri hastalıklarında tanısal kapasiteyi güçlendiren yenilikçi bir çıktıdır.
Antimikrobiyal direnç (AMR) analizlerinde disk difüzyon ve mikrodilüsyon ile elde edilen MIC verileri, ECOFFinder ve NRI yöntemleriyle değerlendirilerek Türkiye'ye özgü ilk epidemiyolojik eşik değerler (ECOFF/COwt) tanımlanmıştır. Bu veriler, akuakültür kaynaklı AMR izlemelerine bilimsel temel sağlamaktadır.

Patojen özelliklerine göre yedi inaktif aşı formülasyonu geliştirilmiştir: monovalan banyo aşıları (*Y. ruckeri* BT1, BT2; *V. anguillarum* O1), bivalan banyo aşısı (*Y. ruckeri* BT1+BT2), monovalan enjeksiyon aşıları (*L. garvieae*, *L. petauri*) ve pentavalan enjeksiyon aşısı. Aşı etkinlikleri, in vivo enfeksiyon modelleri, Kaplan-Meier sağkalım analizleri, göreceli hayatta kalma oranı (RPS) ve bağışıklıkla ilişkili gen ekspresyonları (TLR-2, IgM, IgT, IL-1β, IL-8, IFN-γ, IL-10, CD4-1, C3, CD8-α) ile değerlendirilmiştir.

Proje çıktılarından "İnaktif Beşli Kombine Konsantre Emülsiyon Enjeksiyon Aşı" için "Gökkuşağı Alabalıklarının Laktokokokkozis, Yersiniozis ve Vibriozis Enfeksiyonlarından Korunmasına Yönelik Yeni Bir İnaktif Beşli Kombine Konsantre Emülsiyon Enjeksiyon Aşı" başlıklı buluş, 06.08.2025 tarihinde TR2025/011035 numarasıyla TÜRKPATENT'e başvurulmuştur. Bu başvuru, özgünlük, uygulanabilirlik ve ticarileşme potansiyelini belgeleyen önemli bir fikrî mülkiyet çıktısıdır.

Anahtar Kelimeler; Gökkuşağı alabalığı, *Y. ruckeri*, *L. petauri*, *L. garvieae, V. anguillarum* İnaktif bakteriyel aşı, Antimikrobiyal direnç, MALDITOF MS, ECOFF, İmmun gen ekspresiyonu.

.

ABSTRACT

This project developed an integrated strategy for the diagnosis, monitoring, and control of common bacterial infections in commercially farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Türkiye. The approach included establishing a local MALDI-TOF MS-based diagnostic database for rapid, reliable, and cost-effective pathogen identification; comprehensive phenotypic, serological, molecular, and genomic characterization; determination of species-specific antimicrobial epidemiological cut-off (ECOFF) values; and development of inactivated vaccine prototypes.

Analyses were conducted on *Yersinia ruckeri* (biotypes 1 and 2), *Lactococcus garvieae*, *L. petauri*, and *Vibrio anguillarum* isolates from aquaculture facilities in different regions. Techniques included phenotypic virulence profiling (PVP), 16S rRNA and species-specific PCR, SDS-PAGE, Western blot, serotyping, and whole-genome sequencing. The MALDI-TOF MS local database represents a significant innovation in diagnostic capacity for fish diseases.

Antimicrobial resistance (AMR) was evaluated using disk diffusion and broth microdilution methods. MIC data analyzed via ECOFFinder and Normalized Resistance Interpretation (NRI) produced the first Türkiye-specific ECOFF/COwt values for these pathogens, providing a scientific basis for aquaculture AMR surveillance.

Seven inactivated vaccine formulations were developed: monovalent bath vaccines (*Y. ruckeri* BT1, BT2; *V. anguillarum* O1), a bivalent bath vaccine (*Y. ruckeri* BT1+BT2), monovalent injection vaccines (*L. garvieae*, *L. petauri*), and a pentavalent injection vaccine. Vaccine efficacy was assessed through in vivo challenge models, Kaplan–Meier survival analysis, relative percent survival (RPS), and immune-related gene expression profiling (TLR-2, IgM, IgT, IL-1β, lL-8, IFN-γ, lL-10, CD4-1, C3, CD8-α).

The “Inactivated Pentavalent Concentrated Emulsion Injection Vaccine” resulted in a national patent application, “A Novel Inactivated Pentavalent Concentrated Emulsion Injection Vaccine for the Prevention of Lactococcosis, Yersiniosis, and Vibriosis in Rainbow Trout,” submitted to the Turkish Patent and Trademark Office (TÜRKPATENT) on August 6, 2025 (TR2025/011035). This patent confirms the originality, applicability, and commercialization potential of the project outputs.

Keywords: Rainbow trout, bacterial vaccine, antimicrobial resistance, *Y. ruckeri*, *L. petauri*, *L. garvieae*, *V. anguillarum*, inactivated vaccine, MALDI-TOF MS, ECOFF, immune gene expression.

1. GİRİŞ

Türkiye, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretiminde dünya çapında ön sıralarda yer alan ülkelerden biridir. Ancak sektörde yaygın olarak görülen bakteriyel hastalıklar, yüksek mortalite oranları ve üretim kayıplarına neden olmakta; bu durum ekonomik sürdürülebilirlik, gıda güvenliği ve hayvan refahı açısından ciddi riskler oluşturmaktadır. *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus petauri*, ve *Vibrio anguillarum* gibi patojenler, hem akut hem de kronik enfeksiyonlarla üretim performansını olumsuz etkileyen başlıca etkenlerdir. Hastalık yönetiminde yaygın olarak kullanılan antibiyotikler ise, hedef patojenlerde direnç gelişimini hızlandırmakta ve **antimikrobiyal direnç (AMR)** sorununu derinleştirmektedir. Bu durum, Avrupa Birliği'nin **Tek Sağlık** yaklaşımı ile uyumlu olarak, akuakültür üretiminde antibiyotik kullanımının sınırlandırılmasını ve alternatif koruma yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Bu bağlamda yürütülen proje, **MALDI-TOF MS tabanlı yerel veri kütüphanesi oluşturulması**, türlere özgü epidemiyolojik eşik değerlerin (ECOFF) belirlenmesi ve **antibiyotik kullanımını azaltmaya yönelik yerli inaktif aşı prototiplerinin geliştirilmesi** hedeflerini bir arada ele alan bütünleşik bir yaklaşıma sahiptir. Türkiye'de ilk kez, tanı, izleme, direnç yönetimi ve koruma stratejileri tek çatı altında uygulanmıştır. Proje kapsamında:

- Türkiye'de gökkuşağı alabalığı kökenli patojen izolatların, protein profilleri belirlenmiş ve ulusal ölçekte hızlı, ekonomik ve yüksek doğrulukta tanı yapılabilmesini sağlayacak **yerel MALDI-TOF MS veri kütüphanesi** geliştirilmiştir.
- Hedef patojenler için türlere özgü **epidemiyolojik eşik değerler (ECOFF)** belirlenerek ulusal direnç izleme programları için bilimsel altyapı oluşturulmuştur.
- *Yersinia ruckeri* BT1 ve BT2, *Lactococcus garvieae*, *L. petauri* ve *Vibrio anguillarum* suşlarına karşı **monovalan, bivalan ve pentavalan formülasyonlarda GMP standartlarında yerli inaktif aşı prototipleri** üretilmiştir.
- Aşıların etkinliği laboratuvar ve saha koşullarında **RPS (Relative Percent Survival)**, **Kaplan-Meier sağkalım analizi** ve **bağışıklık gen ekspresyon analizleri** ile ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

Projenin temel amacı, gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğinde yaygın bakteriyel patojenlere karşı **bütünleşik biyogüvenlik stratejileri** geliştirmek ve uygulamaya aktarmaktır. Bu amaç doğrultusunda;

1. Türkiye'deki gökkuşağı alabalığı işletmelerinden izole edilen bakteriyel patojenlerin MALDI-TOF MS ile hızlı ve doğru şekilde tanılanması,
2. Türlere özgü ECOFF değerlerinin belirlenerek antimikrobiyal direnç yönetiminin bilimsel temellere oturtulması,
3. Yerli inaktif aşı prototiplerinin geliştirilerek üretim kayıplarının azaltılması,
4. Aşıların etkinliğinin hem laboratuvar hem de saha koşullarında kanıtlanması,
5. Tanı, izleme, direnç yönetimi ve aşılama bileşenlerini kapsayan uygulanabilir bir ulusal modelin oluşturulması hedeflenmiştir.

Bu proje ile elde edilen sonuçlar, yalnızca bilimsel literatüre katkı sağlamakla kalmamış; aynı zamanda Türkiye su ürünleri sektöründe **sürdürülebilir üretim, antibiyotik kullanımının azaltılması ve balık sağlığının korunması** konularında doğrudan uygulanabilir stratejiler ortaya koymuştur. Bu kapsamda, projenin en önemli somut çıktılarından biri olarak, **"Gökkuşağı Alabalıklarının Laktokokokkozis, Yersiniozis ve Vibriozis Enfeksiyonlarından Korunmasına Yönelik Yeni Bir İnaktif Beşli Kombine Konsantre Emülsiyon Enjeksiyon Aşı"** başlıklı buluş, **Türk Patent ve Marka Kurumu'na (TÜRKPATENT)** sunulmuştur.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Dünya genelinde hayvansal protein kaynaklarına yönelik artan talep, su ürünleri yetiştiriciliğini (akuakültür) güvenilir ve sürdürülebilir bir alternatif haline getirmiştir. FAO (2018) verilerine göre, son otuz yılda akuakültür üretimi 13.1 milyon tondan 82.1 milyon tona yükselerek altı katlık artış göstermiştir. Türkiye, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) yetiştiriciliği ile Avrupa'da lider konumdadır. Su ürünleri ihracatı 2024 yılında 1 milyar dolara ulaşmış, 2025 yılı hedefi 2 milyar dolar olarak revize edilmiştir.

Ancak bu gelişime paralel olarak ortaya çıkan bakteriyel hastalıklar, sektörde %10-20 oranlarında verim kaybına yol açmakta ve yıllık ekonomik kayıpların 6 milyar doları aştığı bildirilmektedir (Woo ve Bruno, 2011; Erkinharju vd., 2021). Öztürk ve Altınok (2014) yaptıkları derlemede, ülkemizde kültür balıklarından 48 patojen bakteri türünün rapor edildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte 2014-2021 tarihleri arasında yalnızca proje ekibi tarafından, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Citrobacter* ve *Shewanella* genuslarına ait ülkemiz için ilk kayıt olan 58 bakteri türü tanımlanmıştır. Kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında her ne kadar çok fazla sayıda bakteriyel etkenin varlığı bildirilmiş olsa da ülkemizde yetiştiricilik koşullarında yaygın olan ve yüksek mortaliteye neden olan bakteriyel etkenler arasında *L. garvieae*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum* ön sırada yer almaktadır (Öztürk ve Altinok, 2014; Altun vd., 2013; Onuk vd., 2018; Duman vd., 2017, 2018, 2019, 2020a, 2020b, 2021a, 2021b, 2021c; Satıcıoğlu vd., 2021; Mulet vd., 2021).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bakteriyel hastalık etkenleriyle mücadele; hastalık ortaya çıkmadan önce aşılama, hastalık ortaya çıktıktan sonra ise antimikrobiyal tedavi yoluyla yapılmaktadır. Ancak bakteriyel izolatların tür içi fenotipik, genotipik ve serotipik farklılıkları, etkili bir tedavi ya da kontrol önlemleri alınmasını sınırlandırmaktadır. Günümüzde hava sıcaklıklarının ve iklim özelliklerinin normalin dışında seyir göstermesi ve birçok bölgede hava sıcaklıklarının normalde fazla artış göstermesi de gelecekte akuakültür yetiştiriciliğini etkileyeceği öngörülmektedir (Karvonen vd., 2010, FAO 2018).

Su sıcaklıklarında meydana gelen değişiklerle birlikte bakteriler de ortama uyum sağlama yönüyle karakteristik özelliklerini değiştirmekte, böylece balıklarda hastalığa neden olan patojenlerin teşhisleri zorlaşmakta, moleküler yapıları ve gen haritaları değişebilmektedir (Duman vd., 2017). İklim, su sıcaklığı ve ortam koşullarında meydana gelen değişiklikler, yetiştiriciliği yapılan balıklar için stres oluştururken patojenlerin de insidensini arttırmaktadır (Benejam vd., 2009). Bu nedenle balık hastalıkların yayılımının önlenmesi, bilinçli AMK'ın yaygınlaştırılması ve erken kontrol edilmesi için, hastalığa neden olan bakteriyel etkenlerin hızlı ve doğru teşhis edilmesi büyük önem göstermektedir.

Ülkemizde yaygın olarak *L. garvieae*, *L. petauri*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum* gibi bakteriyel patojenlerden kaynaklanan salgınlar hem mortalite hem de antimikrobiyal direnç (AMR) gelişimi açısından önemli risk faktörleridir.

Balık hastalıklarının doğru ve erken tanısı, etkili mücadele stratejileri için kritik öneme sahiptir. Geleneksel tanı yöntemleri (kültür, mikroskopi, biyokimyasal testler) zaman alıcı ve sınırlı duyarlılık sergilemektedir. Son yıllarda kullanımı yaygınlaşan **MALDI-TOF MS** (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) teknolojisi; hızlı, ekonomik ve %98'e varan doğruluk oranlarıyla bakteri tanısında önemli avantajlar sunmaktadır (Janson vd., 2020; Bizzini vd., 2011). Son yıllarda özellikle insan ve veteriner mikrobiyolojisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanan MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) yöntemi hem hız hem de maliyet açısından önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu teknikle mikroorganizmalara ait biyomoleküllerin iyonize edilerek protein ve kütle spektrumlarının çıkarılması ve veri tabanlarıyla karşılaştırılması sonucunda cins, tür ve alt tür düzeyinde tanı yapılabilmektedir (Anhalt vd., 1975; Janson vd., 2020). Yapılan çalışmalarda doğru numune hazırlama tekniklerinin kullanılması durumunda MALDI-TOF MS tekniği ile tür bazında %95–100 doğrulukla teşhis yapılabildiği bildirilmiştir (Bizzini vd., 2011; Perez-Sancho vd., 2016; Assis vd., 2017). Ancak su ürünleri laboratuvarlarında MALDI-TOF MS tekniğinin yaygın kullanımı önünde bazı engeller bulunmaktadır. Mevcut veri tabanlarında birçok balık patojeni yer almamakta, bu da tanımlamada yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Örneğin Shewanella türleri genellikle hatalı şekilde *S. putrefaciens* olarak tanımlanmakta, bu da numune hazırlama tekniklerinin ve veri tabanı içeriğinin yeterince optimize edilmediğini göstermektedir (Jung-Schroers vd., 2017). Bu durum, yerel veri kütüphanelerinin oluşturulmasını ve türlere özgü numune hazırlama yöntemlerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır (Snjezana Zrncic, 2020; Jansson vd., 2020).

Ayrıca özellikle geç üreyen bakteriyel patojenlerin tanısında PCR temelli moleküler teknikler kullanılmakla birlikte, bu yöntemler genellikle daha pahalı, tek hedefli ve rutin teşhis için uygun değildir. Bu bağlamda, MALDI-TOF MS, PCR ile desteklenerek hem doğruluk hem de hız açısından önemli avantajlar sunmaktadır. MALDI-TOF MS teknolojisinin akuakültür patojenlerinin teşhisinde kullanım potansiyeli son yıllarda dikkat çekici şekilde artmıştır. Özellikle *Vibrio spp.* gibi deniz kökenli bakterilerin hızlı tanımlanması amacıyla yürütülen çalışmalarda, bu teknolojinin fenotipik yöntemlere göre daha hızlı ve yüksek doğrulukta sonuçlar verdiği gösterilmiştir Gökdağ ve Çağatay 2024).

Ancak MALDI-TOF MS yönteminin akuakültür patojenleri için güvenilir tanı aracı olabilmesi için, yerel veri kütüphanelerinin geliştirilmesi önemli avantajlar sağlayabilir. 2024 yılında Türkiye'de yayımlanan bir çalışmada, gökkuşağı alabalığında sık görülen *Y. ruckeri*, *L. garvieae* ve *Aeromonas hydrophila* gibi bakteriyel patojenlerin proteomik temelli MALDI-TOF

MS ile %95'in üzerinde doğrulukla teşhis edilebildiği bildirilmiştir. Ayrıca, tanı başarısının yerel suşlara özgü spektrum veri tabanı ile belirgin şekilde arttığı vurgulanmıştır (Çağatay 2024)

Bunun yanı sıra, sucul ortamlarda antimikrobiyal direnç (AMR) sorunları da giderek artmaktadır. AB, 2030 yılına kadar veteriner ve akuakültürde antimikrobiyal kullanımın %50 azaltılmasını hedeflemektedir (Anonymous, 2020). Ancak su hayvanlarında kullanılan bakteriyel patojenlerin psikrofilik karakteri, klasik antimikrobiyal duyarlılık (AD) test protokollerinin doğrudan uygulanmasını engellemekte; sıcaklık, besiyeri ve inkübasyon süresi gibi parametrelerin yeniden uyarlanmasını gerektirmektedir (Miller vd., 2014; CLSI, 2014a, 2014b, 2015, 2016).

Son yıllarda klasik "duyarlı–orta derece–dirençli" sınıflamalar yerine epidemiyolojik eşik değerler (cut-off: ECV/ECOFF) kullanılarak antimikrobiyal duyarlılık analizleri yapılmaktadır. Bu yöntem, klinik sınır değerlerin yetersiz olduğu durumlarda daha doğru yorumlara olanak sağlamakta, özellikle balık patojenleri için tür spesifik ve coğrafi farklılıkları dikkate alan yeni analiz stratejileri sunmaktadır (Kronvall ve Smith, 2016; Smith, 2017). Akuakültürde antimikrobiyallerin bilinçsiz kullanımı, su ortamında dirençli suşların yayılmasına zemin hazırlamaktadır. Avrupa Birliği, 2030 yılına kadar antimikrobiyal kullanımın %50 azaltılmasını hedeflemektedir (FAO, 2020). Akuakültür sektöründe antibiyotik kullanımı, hastalıkların kontrol altına alınmasında önemli bir araç olsa da yaygın ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı antimikrobiyal direnç (AMR) gelişimine neden olmakta ve hem hayvan hem de insan sağlığı açısından ciddi riskler yaratmaktadır. Bu bağlamda, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi kuruluşlar, su ürünlerinde antibiyotiklerin sadece klinik endikasyonlar ve duyarlılık testleri ile yönlendirilmiş şekilde kullanılmasını önermektedir (WHO, 2017; EMA & EFSA, 2017).

Akılcı Antimikrobiyal Kullanım (AAK), doğru ilacın, doğru dozda, uygun sürede ve sadece gerektiğinde kullanılmasını ifade eder. Bu yaklaşım tedavi başarısını artırmakla kalmaz, direnç gelişimini de önleyerek çevresel ve zoonotik riskleri azaltır (Prestinaci et al., 2015). ECOFF (Epidemiological Cut-Off Value), belirli bir patojen türüne ait doğal (duyarlı) suşlarla dirençli varyantları ayıran fenotipik eşik değerdir. CLSI ve EUCAST gibi kuruluşlar tarafından belirlenen bu değerler, antibiyogram sonuçlarının güvenilir yorumlanması için temel teşkil etmektedir (EUCAST, 2022).

Türkiye'de su ürünleri patojenlerine ait ulusal ECOFF değerlerinin belirlenmemiş olması, sahadaki antibiyotik duyarlılık verilerinin standardize edilmesini zorlaştırmakta ve tedavi stratejilerinde kararsızlıklara neden olmaktadır (Altun et al., 2024). Bu nedenle, yerli patojen suşlarından elde edilecek fenotipik verilerle oluşturulacak ulusal ECOFF değerleri, hem antibiyotiklerin rasyonel kullanımını teşvik edecek hem de AB mevzuatlarıyla uyumlu bir ilaç kullanım altyapısı sunacaktır. Ancak sucul bakteriler psikrofilik yapıda olduğu için, **AMK/AMR**

testlerinin karasal hayvan protokollerinden farklı şartlarda (sıcaklık, besiyeri vb.) uygulanması gerekmektedir (CLSI 2014a-b). Bu kapsamda *Aeromonas spp.* ve *Flavobacterium psychrophilum* için ülkemize özgü **cut-off (ECOFF)** değerleri belirlenmiştir (Satıcıoğlu vd., 2019; Duman vd., 2020c).

Balık yetiştiriciliğinde hastalıkların kontrolünde aşılamalar temel koruyucu hekimlik aracıdır. Norveç'te başarılı aşı stratejileri antibiyotik kullanımını 47 tondan 523.4 kg'a indirmiş, 10 katlık üretim artışı sağlamıştır (Misund vd., 2016).

Ülkemizde *Y. ruckeri*, *L. garvieae* ve *V. anguillarum* gibi patojenlere karşı yerli aşı geliştirme çalışmaları yürütülmekte; bu bakterilerin serotip/biyotip ve genotipik farklılıklarının aşı etkinliğine etkisi özellikle incelenmektedir (Altun vd., 2010; Duman vd., 2020).

Akuakültür sektöründe bakteriyel hastalıklar hem ekonomik kayıplara hem de yoğun antibiyotik kullanımına neden olan en kritik sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) başta olmak üzere, çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) üretiminde ***Y. ruckeri*, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum*** enfeksiyonları ülkemizde yaygın olarak rapor edilmektedir (Altun et al., 2024; Duman et al., 2023).

Bu patojenlere karşı **etkin, yerli ve kombine aşıların geliştirilmesi**, antimikrobiyal dirençle mücadelede önleyici stratejilerin temelini oluşturmakta; aynı zamanda AB ve WOAH gibi kuruluşların önerdiği **antibiyotik kullanımını azaltmaya yönelik sürdürülebilir sağlık uygulamalarıyla** da örtüşmektedir.

Gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss) yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan başlıca bakteriyel hastalıklar arasında *Y. ruckeri*, *L. garvieae* ve *V. anguillarum* enfeksiyonları yer almaktadır. Bu patojenlere karşı ülkemizde ithal lisanslı aşılarla koruyucu önlemler alınmaktadır.

Y. ruckeri, yersiniozis hastalığının etkeni olup, serotip ve biyotip çeşitliliği göstermektedir. Serotiplendirme genellikle lipopolisakkarit (LPS) veya O antijenlerine dayalı olarak yapılmakta ve temelde 5 farklı serotip tanımlanmaktadır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada, 19 izolatın 18'inin serotip 1, 1'inin ise serotip 2 olduğu bildirilmiştir (Altun vd., 2010). Suşlar ayrıca biyotip 1 (hareketli ve lipaz pozitif) ve biyotip 2 (hareketsiz, lipaz negatif) olarak ikiye ayrılmaktadır (Horn ve Barnes, 1999; Tobback vd., 2007; Evenhuis vd., 2009). Ancak ülkemizde biyotip II suşlarının varlığına ilişkin henüz kesin bir rapor bulunmamaktadır. Yersiniozise karşı aşı geliştirme çalışmaları 1960'lı yıllarda başlamış, 1980'lerde serotip 1'den (Hagerman suşu) hazırlanan aşılarla yüksek koruma sağlanmıştır (Erdal, 1990). Ancak son yıllarda yapılan araştırmalar, serotip ve biyotip farklılıklarının aşı etkinliğini sınırladığına işaret etmektedir (Austin ve Austin, 2016). Ticari olarak kullanılan banyo aşıları biyotip 1 ve 2 suşlarını içermektedir. Biyotip 1'den hazırlanan aşı, biyotip 2'ye karşı %47 RPS sağlarken, Hagerman

suşunda bu oran %95'tir. Kombine aşıların her iki biyotipe karşı yüksek etkinlik gösterdiği belirtilmiştir (Deshmukh vd., 2012; Ferguson et al., 2021).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada, 2013–2023 yılları arasında Türkiye'de yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarından izole edilen 69 *Y. ruckeri* suşunun kapsamlı analizleri yapılmış, Proteomik, serolojik, antijenik, genomik ve virulens özellikleri detaylı biçimde incelenmiş; biyotip 1 ile 2 arasındaki farklılıklar netleştirilmiştir. Bu çalışma, yerli suşlara dayanan aşı geliştirme ve patojen biyolojisi konusunda zengin veri sağlamaktadır (Altun vd.2025a)

Vibriozis; Tuzlu ve acısu ortamlarında yetiştirilen çipura ve levreklerde sıklıkla görülmekle birlikte gökkuşağı alabalıklarında da yüksek mortaliteye neden olur...*V. anguillarum* suşları somatik O antijenlerine göre 23 serotipe ayrılmış olup, bu serotiplerden yalnızca ilk dördü balıklarda patojen karakterdedir (Pedersen vd., 1999; Santos vd., 1995). Alabalıklarda en sık salgın yapan serotipler O1, O2 ve O3'tür. O2 serotipi ayrıca O2a ve O2b alt gruplarına ayrılmaktadır (Olsen ve Larsen, 1993). Türkiye'de gökkuşağı alabalıklarından izole edilen suşların büyük çoğunluğunun serotip O1 özellikte olduğu bildirilmiştir (Tanrıkul, 2007). Patogenezde hemolizin, proteaz ve tek polar flagella gibi virülens faktörleri önemli rol oynamaktadır (Spanggaard vd., 2000). Vibriozis aşıları genellikle formalin ile inaktive edilmiş tam hücre suşları ya da antijenik bileşenlerden hazırlanmaktadır. Ticari aşılar çoğunlukla serotip 1 ya da serotip 1 ve 2a kombinasyonunu içermektedir. Ayrıca serotip 1, 2a ve 2b suşlarının kombinasyonuyla hazırlanan aşıların yüksek koruma sağladığı raporlanmıştır (Toranzo vd., 2005; Aly vd., 2021). Son yıllarda yapılan çalışmalar, *V. anguillarum*'un genetik çeşitliliğini ve virülans mekanizmalarını anlamak için genom analizlerinin büyük önem taşıdığını göstermektedir. Hansen ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışmada, 44 farklı *V. anguillarum* suşu genetik olarak incelenmiş ve bu suşların yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğu ortaya konmuştur. Çalışma, özellikle serotip O1 suşlarının genetik olarak birbirine oldukça benzer olduğunu, ancak O2A serotipindeki suşların önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu durum, mevcut aşıların bazı suşlara karşı etkili olmasına rağmen diğerlerine karşı yeterli koruma sağlayamamasının nedeni olarak gösterilmektedir (Hansen et al., 2020). Proje ekibimizce yapılan diğer bir çalışmada ise *V. anguillarum* suşlarının(n=23) önemli bir kısmında demir alımı ve taşınımına ilişkin genlerin (örneğin *vabA–E*, *tonB*, *exbB/D*, *feoABC*, *fbpABC*) eksiksiz bulunduğu ve bu sistemlerin konak içinde demir sınırlı ortamlarda bakterinin enfektif potansiyelini artırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, flagellar hareketlilik, Tip IV ve Msh tipi pilus yapıları ile quorum sensing sistemlerine ait genlerin de tüm suşlarda büyük ölçüde korunduğu görülmüştür. Bu sistemlerin korunmuş olması, konak hücrelere tutunma, kolonizasyon ve enfeksiyon başlatma sürecinde suşların ortak bir strateji izlediğini göstermiştir (yayınlanmadı). Sonuç olarak *V. anguillarum* suşlarının yüksek düzeyde korunan bir virülans

çekirdek genomu yanında, belirgin ölçüde değişken aksesuar genetik bileşenlere sahip olduğunu ortaya koymuştur.

L. garvieae ve *L. petauri* enfeksiyonlarında; ekzotoksinler, sitolizin, kapsül polisakkarit, streptolizin S, M-like protein ve polisakarit deasetilaz gibi çeşitli virülens faktörleri tanımlanmıştır (Kimura ve Kusuda, 1979; Fuller vd., 2002; Shutou vd., 2007; Locke vd., 2007b). Her iki tür de hem tatlı hem de tuzlu su balıklarında yüksek mortaliteye neden olan zoonotik patojenlerdir. *L. petauri,* son yıllarda *L. garvieae*'ye fenotipik olarak benzerlik göstermesi nedeniyle tanıdan kaçabilmekte, ancak genomik analizlerle ayrılabilmektedir (Mata et al., 2022). Türkiye'deki vakalar yüksek mortalite oranları ile seyrettiğinden, bu etkenlere karşı geliştirilecek ikili kombine aşılar, sektörel ihtiyaç açısından kritiktir (Altun vd. 2025b).

İki temel serotipten kapsüllü (KG−) suşların kapsülsüz (KG+) suşlara kıyasla daha yüksek virülens gösterdiği belirtilmektedir (Ravelo vd., 2001; Kang vd., 2004). Türe ve Altınok (2014), Karadeniz bölgesinden izole edilen suşların virülens genlerine sahip olduğunu ancak kapsül gen bölgesi içermediklerini bildirmiştir. Duman vd. (2020) ise Türkiye'nin 6 farklı bölgesinden izole edilen 137 suşun yüksek mortaliteye yol açtığını göstermiştir. Aynı proje kapsamında, bazı izolatların kapsül formasyonu gösterdiği, bu nedenle daha ileri düzeyde genomik ve mikroskobik analizlerin gerekli olduğu belirtilmiştir. Altun vd. (2017), Türkiye'den izole edilen 137 *L. garvieae* izolatını genetik olarak gruplandırmış ve A (%72,2), B (%23,3), C (%2,1), D ve E (%0,7) olmak üzere 5 farklı genotipe ayırmıştır. Referans suşlarla karşılaştırıldığında <%90 genetik benzerlik saptanmıştır (Duman vd., 2020). *L. garvieae*'ye karşı geliştirilen ilk ticari aşı 2004 yılında üretilmiş, sonrasında periton içi enjeksiyon (i.p.) ile yapılan adjuvanssız aşıların 3 ay süresince koruma sağladığı belirtilmiştir (Ghittino vd., 1995; Romalde vd., 2004). Yağ adjuvanlı emülsiyon formülasyonlarının ise 6. ve 8. aylarda sırasıyla %90 ve %83 RPS değerine ulaştığı raporlanmıştır (Ravelo vd., 2006). Ancak ülkemizde yürütülen saha çalışmaları, bu aşıların koruyuculuğunun 120. günden sonra azaldığını göstermektedir. İnaktif emülsiyon aşılar, **uzun süreli bağışıklık** sağlar ve ticari uygulamada pratik avantajlara sahiptir. Kombine aşılar sayesinde, birden fazla patojene karşı **tek dozda bağışıklık** sağlanarak enjeksiyon stresleri ve operasyonel maliyetler azaltılır (Adams & Thompson, 2010). Özellikle **Montanide ISA serisi adjuvanlar** ile hazırlanan su içinde yağ emülsiyon aşılar, balıklarda yüksek antikor düzeyi ve koruyuculuk sağlar (Leal et al., 2020). Türkiye'de izole edilen *L. garvieae* ve yeni tanımlanan *L. petauri* suşlarının proteomik ve genomik karakterizasyonunun karşılaştırmalı olarak ele alandığı çalışmada, her iki türün belirleyici moleküler profillerine dair özgün veri sunulmuş; özellikle aşı hedeflerinin belirlenmesi açısından değerli sonuçlar rapor edilmiştir (Altun vd 2025b). *L. garvieae* ve *L. petauri*ı izolatlarında ilk kez mikrokapsül oluşumu gösterilmiş, İki tür arasındaki tüm hücre protein profillerinde yüksek bir benzerlik oranı gözlenmiş, antijenik proteinler arasında ise önemli

farklılıklar belirlenmiştir. *L. garvieae* ve *L. petauri* saha izolatlarının lam aglütinasyon ve kantitatif aglütinasyon testleriyle türler arasındaki varyasyonları gösterilmiştir.

Türkiye'deki ticari su ürünleri aşılarının büyük kısmı ithal olup, **yerel patojen suşlarını kapsamadığı için etkinlikleri düşüktür**. Yerli suşlara dayalı kombine inaktif aşılar, **daha hedefe yönelik bağışıklık yanıtı** oluşturur (Ma vd. 2019). Bu yaklaşım, sadece balık sağlığını değil, **antibiyotik kullanımını azaltarak halk sağlığını da destekler**. Ayrıca, yerli aşıların geliştirilmesi **ihracat belgelerinde izlenebilirlik, sürdürülebilirlik ve AB mevzuatlarıyla uyumluluk** açısından avantaj sağlar.

Yukarıda sunulan veriler ışığında, *Y. ruckeri*, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum*'a karşı yerli suşlardan üretilecek kombine inaktif enjeksiyon aşıları:

- **Saha etkili koruyuculuk** sağlar,
- **Antibiyotik kullanımını azaltır**,
- **İthal aşı bağımlılığını ortadan kaldırır**,
- Ve Türkiye'nin **akuakültür biyogüvenliği stratejilerine** katkı sunar.

Bu çerçevede önerilen TÜBİTAK 1001 projesi, bilimsel, sektörel ve stratejik açılardan **ulusal aşı bağımsızlığına katkı sağlayan kritik bir Ar-Ge ihtiyacını karşılamayı** hedeflemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Proje kapsamında kültür balığı işletmelerinde akılcı antimikrobiyal kullanım ve koruyucu hekimlik yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik olarak entegre üretim yapan iki farklı bölgede (Batı Karadeniz/Marmara, İç Anadolu) yer alan gökkuşağı alabalığı işletmesi, pilot işletme olarak belirlenmiştir. Belirlenen işletmelerden bakteriyel hastalıkların belirlenmesi, bakteriyel hastalıkların tedavisinde akılcı antimikrobiyal kullanım ve koruyucu hekimlik yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik olarak aylık örnekleme yapılmıştır.

3.1.1 Bakteriyolojik Örnekleme

3.1.1.1 Pilot Gökkuşağı Alabalığı İşletmelerinin Özellikleri

Proje çalışmasında pilot işletme olarak İç Anadolu ve Batı Karadeniz Bölgesinde yer alan iki farklı Gökkuşağı alabalığı işletmesi pilot işletme olarak belirlenmiş ve İç Anadolu Bölgesinde yer alan Gökkuşağı alabalığı İşletmesi A İşletmesi, Batı Karadeniz/Marmara Bölgesinde yer alan Gökkuşağı alabalığı işletmesi ise B işletmesi olarak isimlendirilmiştir.

A İşletmesinin Özellikleri

A İşletmesi farklı lokasyonda yer alan ve AY (kafes tesisi), AK (kuluçkahane tesisi) ve AS (kafes tesisi) olarak isimlendirilen 3 farklı tesiste Gökkuşağı alabalığı üretimi yapmaktadır. AK tesisi 60 milyon adet/yıl kapasitede yumurta üreten bir kuluçkahanedir. Bu tesis, kuluçkahaneye 3 km mesafede uzaklıkta yer alan bir kaynak suyu kullanmaktadır. AY tesisi bölgede yer alan bir barajda kurulan kafeslerde (20 m çap) 1.9 bin ton/yıl üretim kapasitesine sahiptir. AS tesisi ise aynı bölgedeki farklı bir barajda kurulan ağ kafeslerde (20 m çap) yaklaşık 4 bin ton/yıl kapasitede üretim yapabilmektedir.

B İşletmesinin Özellikleri

B İşletmesinde 2 milyon adet/yıl yumurta kuluçkalamakta ve 500 ton/yıl kapasitede büyük alabalık (Türk somonu) üretilmektedir. Bu işletmenin kuluçkahanesinde artezyen suyu kullanılmakta olup, üretim havuzlarında artezyen suyun yansıra ihtiyaç duyulan dönemlerde dere suyu kullanılmaktadır. B İşletmesinde her bir havuzun, havuz su girişinden çözünmüş oksijen seviyesinin 7 mg/L'nin altına düşmemesi için sıvı oksijen takviyesi yapılmaktadır.

3.1.2 Su Kalitesi Parametreleri

Balık işletmelerinde aylık olarak her örnekleme döneminde su kalitesi parametreleri (çözünmüş oksijen, sıcaklık, pH, iletkenlik) oksijenmetre cihazı (SI Analytics Handylab Multi 12 Set, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir.

3.1.3 Bakteri Suşları

Pilot alabalık işletmelerinde yapılan örneklemelerden izole edilen (izolatların serotipleri, tüm hücre ve antijenik protein profilleri, genotipleri ve virülens özellikleri) izolatların yanı sıra kültür koleksiyonumuzda yer alan ve daha önceki çalışmalarımızda (Batı Karadeniz/Marmara, İç Anadolu, Doğu Anadolu, Akdeniz, Ege ve Karadeniz bölgeleri işletmeleri) izole edilen ve moleküler tekniklerle (PCR, dizi analizi) identifikasyonu ve genotiplendirilmesi yapılmış olan *Y. ruckeri*, *L. garvieae, L. petauri* ve *V. anguillarum* suşları ve Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonunda yer alan standart ve tip suşlar proje çalışmasında kullanılmıştır.

3.1.4 Deneme Ünitesi

Gökkuşağı alabalıklarında yapılacak aşı etkinlik denemeleri Çanakkale On sekiz Mart Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi Canlı Kaynaklar Ünitesi'nde gerçekleştirilmiştir. Denemelerde 15-25 g ağırlıkta jüvenil balıklar kullanılmıştır.

3.1.5 Aşı Geliştirme Çalışmalarında Kullanılan Gökkuşağı Alabalıklarının Temini ve Balık Grupları

Denemelerde; spesifik patojen içermeyen 10.000 adet sertifikalı gökkuşağı alabalığı yumurtasından (yurt dışından temin edilen) çıkarılan ve özel bir kuluçkahanede kaliteli ticari yemler verilerek beslenen balıklar kullanılmıştır. Gökkuşağı alabalıklarında deneme çalışmaları sırasında önce; aşı suşlarının seçiminde kullanılan bakteri suşlarının virulens, LD_{60} dozları, daha sonra ise güvenlik ve aşı etkinliklerinin belirlenmesine (eprüvasyon) yönelik çalışmalaryürütülmüştür. Sertifikalı gözlenmiş gökkuşağı alabalığı yumurtaları işletmeye konulmadan önce bakteriyel/viral incelemeye yapılmıştır. Prototip aşı geliştirme çalışmalarında kullanılacak Gökkuşağı Alabalıklarına ilişkin bilgiler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Prototip aşı geliştirme denemesinde (*Y. ruckeri* O1, *L. garvieae*, *V. anguillarum* O1) balık ağırlıkları ve sayıları*

Kullanım Amacı	**Balık türü**	**Balık sayısı**
Virülens denemeleri	Gökkuşağı alabalığı (~ 15-20 g)	450
LD_{60} dozunun belirlenmesi	Gökkuşağı alabalığı (~ 15-20 g)	450
Güvenlik (Toksisite) denemeleri	Gökkuşağı alabalığı (~ 15-20 g)	1520
Etkinlik (Eprüvasyon) denemeleri	Gökkuşağı alabalığı (~ 15-20 g)	2160
Toplam	Gökkuşağı alabalığı	4580

Değerlendirme ve Sonuç:

1. **Virulens Denemeleri**: Virülens deneyleri kapsamında, ***Yersinia ruckeri*** serotip O1 Biyotip (BT) 1 ve BT2, ***Lactococcus garvieae***, ***Lactococcus petauri*** ve ***Vibrio anguillarum*** serotip O1 suşlarının her birinden seçilen **üçer adet saha izolatı** kullanılmıştır. Toplamda 5 patojene ait 15 izolat için, her biri 30 balıktan oluşan 15 ayrı deney grubu oluşturulmuştur (15 grup × 30 balık = 450 balık). Balıklar, izolatlara göre gruplandırılarak, eşit sayıda ve rastgele olacak şekilde deney tanklarına yerleştirilmiştir. Her bir izolat, **1×10^{7} cfu/mL** dozunda olacak şekilde peritoneal enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır. Enfeksiyon uygulamalarından önce, her bir deney grubundan rastgele seçilen 3 balık, spesifik patojen varlığı açısından **mikrobiyolojik muayene** ve **kültür izolasyonu** yoluyla kontrol edilmiştir.
2. **LD_{60} dozunun belirlenmesi denemeleri;**
3. **Güvenlik testleri denemeleri;**

a. ***Yersinia ruckeri*** *serotip O1 Biyotip (BT) 1 ve BT2,* ***Lactococcus garvieae****,* ***Lactococcus petauri*** *ve* ***Vibrio anguillarum*** *serotip O1 suşlarının her birinden seçilen ve* ***çalışma tohumu (working seed)*** *suşu olarak belirlenen izolatlar, farklı doz gruplarında (1×10^{5}, 1×10^{7} ve 1×10^{9} cfu/mL) olmak üzere deneysel enfeksiyon uygulamaları için kullanılmıştır. Her doz seviyesi için 30'ar balıktan oluşan gruplar halinde, uygulaması planlanmıştır. Toplamda, 5 farklı patojen türüne ait 15 izolatın her biri, üç farklı dozda uygulanmış olup, her tekrar grubunda 30 balık yer alacak şekilde toplam* ***4500 adet gökkuşağı alabalığı*** *deney tanklarına yerleştirilmiştir (15 izolat × 30 balık =* ***450 balık****).*

b. *V. anguillarum* O1 emülsiyon banyo aşının iki kat doz içeren miktarı, 1/5 onaranda sulandırılarak (1 L aşı, 4 L ortam suyu) 2 dk. süreyle 30 adet gökkuşağı alabalığına uygulandı,

c. *V. anguillarum* emülsiyon enjeksiyon aşı iki doz aşı içeren miktarı, 0,2 ml periton içi olarak 70 adet gökkuşağı alabalığına enjekte edildi

d. *L. garvieae* ve *L. petauri* kombine emülsiyon enjeksiyon aşı iki doz aşı içeren miktarı, 0,2 ml periton içi olarak 70 adet gökkuşağı alabalığına enjekte edildi.

e. Beşli kombine inaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşı iki doz aşı içeren miktarı, 0,2 mL periton içi olarak 70 adet gökkuşağı alabalığına enjekte edildi.

Güvenlik Deneylerinde toplam 1520 adet balık kullanıldı

4. **Etkinlik (Eprüvasyon) denenemleri**

a. ***Y. ruckeri*** BT1 ve BT2 **bivalan emülsiyon banyo aşı, 1/10 onaranda sulandırılarak** (1 L aşı, 9 L ortam suyu) 1 **dk. süreyle 45** adet (30'u aşı etkinlik deneyleri, 15'i immun gen ekspresyon deneyleri (4. saat, 24. saat, 48. saat, 7. gün ve 14. gün) her bir gruptan 3'er adet balık alındı) **gökkuşağı alabalığına uygulandı.**

b. ***Y. ruckeri*** BT1 ve BT2 **bivalan emülsiyon enjeksiyon aşı, 0,1 mL miktarda periton içi (i.p.) olarak 45 adet** (30'u aşı etkinik deneyleri, 15'i immun gen ekspresyon deneyleri (4. saat, 24. saat, 48. saat, 7. gün ve 14. gün) her bir gruptan 3'er adet balık alındı) **gökkuşağı alabalığına uygulandı.**

c. ***V. anguillarum*** **emülsiyon banyo aşı, 1/10 oaranda sullandırilarak** (1 L aşı, 9 L ortam suyu) 1 **dk. süreyle 4oaranda sL ortam**0'u aşı etkinik deneyleri, 15'i immun gen ekspresyon deneyleri (4. saat, 24. saat, 48. ssuyu) 1gün ve 14. gün) her bir gruptan 3'er adet balık alındı) **gökkuşağı alabalığına uygulandı.**

d. *V. anguillarum* O1 emülsiyon enjeksiyon aşı, **0,1 mL miktarda periton içi (i.p.) olarak 45 adet** (30'u aşı etkinik deneyleri, 15'i immun gen ekspresyon deneyleri (4. saat, 24. saat, 48. saat, 7. gün ve 14. gün) her bir gruptan 3'er adet balık alındı) **gökkuşağı alabalığına uygulandı.**

e. *L. garvieae* ve *L. petauri* emülsiyon enjeksiyon aşı, **0,1 mL miktarda periton içi (i.p.) olarak 45 adet** (30'u aşı etkinik deneyleri, 15'i immun gen ekspresyon deneyleri (4. saat, 24. saat, 48. saat, 7. gün ve 14. gün) her bir gruptan 3'er adet balık alındı) **gökkuşağı alabalığına uygulandı.**

f. **Beşli kombine inaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşı**, **0,1 mL miktarda periton içi (i.p.) olarak 45 adet** (30'u aşı etkinik deneyleri, 15'i immun gen ekspresyon deneyleri (4. saat, 24. saat, 48. saat, 7. gün ve 14. gün) her bir gruptan 3'er adet balık alındı) **gökkuşağı alabalığına uygulandı.**

İnaktif monovalan/bivalan/kombine emülsiyon banyo ve enjeksiyon aşıların etkinlik deneylerinde gökkuşağı alabalıkları aşılandıktan sonra**, eprüvasyon testlerinde kullanılmak üzere**; her bir etken için **3 deney ve bir kontrol grubu** (kontrol gruplarına enjeksiyon aşılarda 0,1 mL fizyolojik tuzlu ile yalancı aşılama yapıldı) **oluşturuldu.**

Aşı etkinlik deneylerinde balıklar toplam 20 gruba (her bir grupta 30 balık, 15 balık immun gen ekspresyonlarının belirlenmesinde kullanılmak üzere) ayrıldı. Toplam 2160 gökkuşağı alabalığı aşı etkinlik deneylerinde kullanıldı

3.1.6 Tavşan Materyali ve Deneme Grupları

Araştırmada kullanılan *Y. ruckeri* O1 BT1 ve BT2*, L. garvieae, L. petauri ve V. anguillarum* suşlarının serotiplendirilmesinde kullanılmak üzere hiperimmun serum elde etmek için, ATAFEN'in Deney Hayvan Ünitesinde bulunan 3 aylık yaştaki Yeni Zelanda tavşanları (toplam 18 tavşan) kullanıldı. Bu amaçla tavşanlar her bir grupta 3'er adet olacak şekilde, 6 Gruba (3 adet Hiperimmun, 1 adet Kontrol) ayrıldı. Bu tavşan Gruplarına *Y. ruckeri* BT1-BT2, *L. garvieae, L. petauri* ve *V. anguillarum* (O1) standart (ATCC, NCIMB, NCTC, LMG vb) suşlar ile inokule edildi. Kontrol grubuna PBS (fosfat tampon solüsyonu) inokule edildi. Deneme

süresince tavşanlar ad libitum olarak beslendi.

3.1.7 Aşılama Sonrası İmmun Gen ekspresyonlarının Belirlenmesi için Doku Örneklemesi

Aşılama sonrası 4. saat, 2. ve 7. 14 ve 21. günlerde her bir gruptan 5'er balıktan alınan doku örnekleri (solungaç, bağırsağın son kısmı, ön böbrek ve dalak) RNAlater'a alınarak +4 ºC'de bir gece bekletildi. Daha sonra dokulardan RNAlater uzaklaştırılarak -70 ºC'de saklandı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteriyel İzolasyon

Örneklemelerde balıkların (yumurta, larva, yavru, genç ve anaç); ovaryum, ovaryum sıvıları ve iç organlarından (böbrek, karaciğer, dalak, kalp, beyin) ve/veya spesifik semptom görülen organlarından, bakteriyel izolasyon yapıldı. İzolasyonda Triptik Soy Agar (TSA), Kalp Beyin İnfüzyon Agar (BHIA), tripton Maya Ekstraktı Tuz (TYES) Agar, Columbia agar (%5 koyun kanlı, CA), EMB (Eosin Methylene Blue) Agar, TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) Agar, Anacker-Ordal Agar (AO), *Pseudomonas* İzolasyon Agar besiyerleri kullanılacaktır. Her bir örneklemede kullanılan besiyerleri zorunlu psikrofil bakterilerin izole edilebilmesi için 18-20ºC'de 96- 120 saat, psikrofil ve/veya mezofil bakterilerin izole edilebilmesi için ise 25-28ºC'de 24-48 saat inkübe edilecektir. Bakterilerin izolasyonları yapıldıktan sonra elde edilen saf koloniler %15-20 gliserol içeren stok kültürlere alınarak- 80ºC saklanacaktır (Buller, 2004; Austin ve Austin 2016).

3.2.2 Bakteriyel İdentifikasyon Çalışmaları

Besiyerlerinde üreyen koloniler klasik biyokimyasal testler (Gram boyama, oksidaz, katalaz, hareketlilik, oksdasyon/fermantasyon (O/F), vibriostat (O/129), fleksirubin pigment) ve tür spesifik selektif besi yerlerinde üreme özellikleri identifikasyon çalışmalarına kullanıldı (Buller 2004; Austin ve Austin 2016).

3.2.2.1 Bakteriyel İzolatların MALDI-TOF MS ile identifikasyonu

Fenotipik mikrobiyolojik özellikleri belirlenerek ön teşhisi yapılan bakteriyel izolatların MALDI-TOF MS ile teşhisinde, kültüre edilen izolatların saf kolonileri elde edildi. Saf kolonileri elde edilen izolatların, matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS, Bruker Almanya) formik asit-asetonitril bazlı protein-peptit ekstraksiyonu protokolüne (Bruker Daltonik, Bremen, Almanya) tabi tutuldu (Pérez-Sancho et al 2017; Calderaro, and Chezzi, 2024) ve MALDI Biotyper kullanılarak tanımlamaları yapıldı. Tanımlamaların güvenilirliği, üreticinin önerdiği parametrelere göre Biotyper yazılımı (sürüm 4.2; 4613 kayıt) ile hesaplanan log (skor) değerlerine göre belirlendi. Skorları ≤2.000 olan her

izolat için, MALDI-TOF MS analizi ve ekstraksiyon protokolü en az iki bağımsız çalışmada tekrarlandı. Sokor sonuç değeri 2.0'den daha düşük olması durumunda, üreticinin önerdiği protokol doğrultusunda etanol-formik asit yöntemi kullanıldı (Schulthess vd., 2013; Randall vd., 2015). Kısaca bu yöntemde; bakteri kolonilerinin bir halkası proteinlerin formik asit ekstraksiyonu için %75 etanolde süspanse edildi, sonra peletlendi, hava ile kurutulduduktan sonra v 20 µL %70 formik asitle yeniden süspanse edildi ve 2 dakika sonra 20 µL hacimde asetonitril eklendi. Bu karışımın santrifüjlenmesinin ardından, üstteki sıvı hedef plakaya damlatıldı (Jansson et al 2020).

MALDI-TOF veri kütüphanesinde yer alan türlere ait m/z değerleri, UniProtKB/Swiss-Prot ve UniProtKB/TrEMBL **veritabanları kullanılarak, akuatik bakterilerin türe özgü ve karakteristik protein spektrumları ile karşılaştırıldı** (Fernandez-´Alvarez vd., 2017) (Expasy, SIB Swiss Institute of Bioinfomatics). **Protein Spektrumları karşılaştırılması BioTyper yazılımına** (V. 3.1, Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) aktarılarak yapıldı. Bakteri tanımlaması, standart veri tabanıyla eşleştirilmek suretiyle analiz edildi. Tanımlama sonrası elde edilen skor değeri 2'den büyük ise tür düzeyinde tanımlama güvenilir kabul edildi eğer 2'den küçük ise tanımlamanın güvenilir olmadığı değerlendirildi.

Veri işlemede ise, IBM SPSS Statistics (V. 22) ve Mass-Up yazılımı (Lopez-Fernandez vd., 2015) kullanıldı. Küme (Cluster) analizi ve benzerlik katsayıları, bant tabanlı (Jaccard) skorlar (ölçüm) ve eğri tabanlı (Pearson Ürün hareket Korelasyon Katsayısı, PPMCC) skorlar temel alınarak belirlendi. (Fernandez-´Alvarez vd., 2017). Küme analizi önce tüm referans ve tip suşlar üzerinde yapıldı. Daha sonra balıklardan izole edilen suşların teşhis skor değerleri referans suşların skor değerleriyle karşılaştırıldı. Yüksek skor değeri elde edilen ve PCR tabanlı (dizi analizleri) analizlerle ile doğrulamaları yapılan, mass spektrumları belirlenen izolatlara ait tür ve/veya alt tür spesifik protein spektrumları veri kütüphanesine kaydedildi.

3.2.2.2 İzolatların Moleküler İdentifikasyon ve Karakterizasyonu

3.2.2.2.1 DNA Ekstraksiyonu

Bakteriyel izolatların DNA ekstraksiyonları, spin kolon ile filtrasyon sistemine dayanan ekstraksiyon kiti kullanılalarak gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen DNA'ların konsantrasyonları 260 nm'de spektrofotometre (MultiScan Go, Thermo) ile ölçüldü.

3.2.2.2.2 İzolatların PCR ile identifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu

Her örnekleme döneminde izole edilen bakteriyel izolatlar, fenotipik identifikasyon sonuçları temelinde genus düzeyinde gruplandırıldı, daha sonra genus tabanlı moleküler analizlere tabi tutuldu. Tür identifikasyonunda çoklu gen bölgesi sekans analizi yöntemi (multilocus sequence analysis, MLSA) kullanıldı. Bu amaçla izolatların 16S rRNA, *gyr*B ve *rpo*B gen bölgeleri PCR

ile çoğaltıldı ve sekans analizleri yapıldı. Her bir sekans analiz verisi, NCBI veri tabanında (referans sekans temsilci genomları, RefSeq Representative genomes) en yakın referans tür ile benzerliğine göre analiz edildi. En yakın referans tür benzerliği gösteren genbanka kayıtlı izolatların 16S rRNA, gyrB ve rpoB gen bölgeleri alınarak Bioumerics 7.6 analiz yazılımı ile çoklu gen bölgesi analizi ile tüm izolatların birbirlerine olan genetik yakınlıkları belirlendi (Austin 2016; Shikongo-Nambabi vd., 2012; Glaeser ve Kampfer 2015; Pérez-Cataluña vd., 2016; Duman vd., 2021c).

İzolatların PCR ile idenfikasyonunda 16S ribozomal RNA bölgesini amplifiye eden 27F (5′-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3′) ve 1387R 5′-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3 universal primerler kullanıldı. gyrB ve rpoB gen bölgeleri için 16S rRNA sekans analizi ile izolatlara ait genuslar belirlendi, sonra her bir genusa yönelik korunmuş gen bölgelerinin çoğaltılması ile elde edilen ürünler, OLIGO primer analiz veritabanı (Molecular Biology International), Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) ve BLAST (Anonymous, 2021b) veri tabanı kullanılarak spesifik primerler belirlendi ve bu primerler ile PCR amplifikasyonları yapıldı (Rong ve Huang, 2014). PCR amplifikasyonu için DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 3.0 mM of MgCl2, her bir dNTP'den 0.2 mM, 1.0 U Taq polymerase, 1µM, spesifik primer ve 5 µl template DNA içeren 25 µl PCR master mix'i oluşturuldu. Oluşturulan karışım 95°C 'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 95°C 'de 30 sn denatürasyon, primer bağlanma, 72°C 'de 1 dk uzama olmak üzere 32 siklus ve 72°C 'de 7 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu (Biorad T100). PCR ürünleri etidium bromid (2mg/ml) içeren % 1-3 agaroz jel elektroforezi (50 V, 30 dk) sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi (Shikongo-Nambabi vd., 2012; Glaeser ve Kampfer 2015; Pérez-Cataluña vd., 2016; Duman vd., 2021c). PCR ürünlerinin pürifikasyonu ve Sanger metoduna göre çift yönlü sekans analizi hizmet alımı yoluyla yapıldı.

3.2.3 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ve Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin (cut-off:EcoFF) Belirlenmesi

İzole edilen suşların 10 adet farklı antimikrobiyale karşı (Gentamisin (10 µg), Siprofloksasin (5µg), Oksitetrasiklin (30µg), Sulfamethoksazol/Trimethoprim (25µg), Tetrasiklin (30µg), Enrofloksasin (5µg), Eritromsin (15µg), Amoksisillin/Klavulanik Asit (30µg), Florfenikol (30µg) ve Doksisiklin (30 µg) olan duyarlılıklarının saptanması, Müeller Hinton agar besiyerinde oxoid firmasının diskleri kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıldı (CLSI 2006). Bu amaçla bakteri suşları 4 ml Müeller-Hinton broth bulunan tüplere ekilerek 18, 22 ve 28°C'de inkübe edildi. Tüplerin yoğunluğu 0,5 McFarland standart (bioMerieux sa, 69280, Marcy l'Etoile, Fransa) yoğunluğa ulaştığında Müeller-Hinton Agara 0,1 ml aktarıldı aktarıldı. Daha sonra petrilere diskler yerleştirilerek 18, 22 ve 28 °C'de 24–72 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkubasyon sonrasında inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçüldü. Sonuçlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve EUCAST'in geliştirdiği yorum ölçütlerine dayanılarak duyarlı (S) orta derecede duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak yorumlandı.

Diğer izolatlardan farklı olarak *F. psychrophilum* suşlarının disk difüzyon duyarlılığı daha önce yapılan çalışmamızda (Satıcıoğlu 2018; Satıcıoğlu et al. 2019) belirtildiği şekilde, kültür ortamının agar yüzdesinde değişiklik yapılarak CLSI 2014 document VET03/VET04-S2(Miller et al.,2014; Van Vliet 2017; Park et al 2023) kılavuzunda önerilen protokol ile, %1,5 agar (Antibiotic Agar No. 1, 105272, Merck, MHA) ve %5 fetal dana serumu içeren seyreltilmiş Mueller-Hinton medyumda (Sigma-Aldrich, 3 g/L) gerçekleştirildi ve plakalar 15°C de 68-72 saat inkübe edildi. Kısaca test, %1,5 agar ve %5 fetal dana serumu (FCS; Merck) içeren 1:5 seyreltilmiş Mueller-Hinton mediumda (Sigma-Aldrich/Merck; 3 g L -1) gerçekleştirildi ve plakalar 15 °C de 68- 72 saat inkübe edildi. Disk difüzyon testinde Türkiye'de lisanslı olan, amoksisilin (AML10;10 µg), enrofloksasin (ENR5; 5 µg), florfenikol (FFC30; 30 µg) ve oksitetrasiklin (OTC30; 30 µg) antimikrobiyal diskler (Oxoid, Thermo-Fisher) tercih edildi. Kontrol suşları 18°C de 48 saat (*Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 ve *E. coli* ATCC 25922) ve 72 saat (*F. psychrophilum* NCIMB 1947^{T}) inkübe edildi.

Disk difüzyon testine ilave olarak izolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının broth mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmesinde her bir bakteri türü için spesifik olan CLSI standartları kullanıldı (CLSI 2006; CLSI 2014; CLSI 2020; CLSI 2021). Bu metoda göre izolatların saf ve taze kültürlerinden bakteri süspansiyonu hazırlandı ve daha önce farklı dilüsyonlarda hazırlanmış antimikrobiyalleri içeren 96 kuyucuklu plakalara inokule edildi. İzolatların antimikrobiyal sonuçlarının değerlendirilmesinde ise yine türe spesifik CLSI metodu kullanılarak ve her bir türün duyarlılık konsantrasyonları 24-48 saat süre zarfında belirlendi. Deneysel (tentative) Epidemiyolojik cut-off değerlerinin belirlenmesinde ise ticari olarak lisanslı olan Kronvall metodu (Kronvall, 2010) kullanıldı. http://www.bioscand.se/nri/ websitesinde yer alan excel datasheet'i kullanılarak ECOFFinder XL 210v2.0.xism. yazılımı ile izolatların epidemiyolojik cut-off değerleri belirlendi. Türe özgü deneysel epidemiyolojik cut-off-EcoFF değerinin altında kalan izolatlar wild-type (WT), cut-off değerinin üzerinde kalan izolatlar ise non-wild-type (NWT) olarak değerlendirildi. Türe özgü yapılan çalışmalarda her bir türden en az 30 izolat olması durumunda tür düzeyinde, olmaması durumunda ise genus düzeyinde **cut-off-EcoFF değerleri belirlendi.**

3.2.4 Prototip Aşı Üretiminde Kullanılacak Aşı Suşlarının Belirlenmesi

3.2.4.1 İzolatların fenotipik virülens özelliklerinin (FVÖ) belirlenmesi (Jelatinaz, lipaz, hemolizin, proteaz ve DNase üretimi)

İzolatlarının fenotipik virulens özellikleri, kazeinaz, jelatinaz hidrolizi, DNAase, lipaz (tributirin,

Tween 80 hidrolizi) ve hemolizin tetleri kullanıarak yapıldı.

Kazeinaz ve jelatinaz hidrolizinin belirlenmesinde daha önceki çalışmamızda (Satıcıoğlu et al 2024) açıklanan yöntemler kullanıldı ve her izolatın virulens analizleri dört/beş bağımsız deneyde tekrar edildi. Kısaca izolatlar, kazein ve jelatin hidrolizinin belirlenmesi için sırasıyla yağsız süt (%5ve jelatin (%3) ile desteklenmiş TSA agarında yetiştirildi. Her izolattan 10^9 cfu mL^{-1} içeren broth süspansiyonu (1 µL), dört tekrar halinde agar yüzeyine eklendi. Her izolatın proteolitik aktivitesini tahmin etmek için berrak bölge oranı (clearing zone/colony diameter) 22-25°C'de 48 saat süre ile inkübe edildi (Romalde ve Toranzo 1993; Younes vd. 2021).

Lipaz aktivitesi için izolatların 24 saatlik saf kolonileri tributrin agar (Merck, Almanya) ve Tween 80 ilave edilen TSA Agara inokule edilerek. 22 ºC'de 24-48 saat inkübe edildi . inkübasyon sonrasında kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşması ile lipaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirildi. (Huang vd. 2013; Frans vd. 2013).

Hemolizin aktivitesinin belirlenmesinde %5 koyun kanı ilave edilmiş Kanlı Agar (KA) kullanılacaktır. KA inokule edilen izolatlar 22 ºC 24-48 saat inkübasyon sonunda gelişen kolonilerin etrafında berrak zon oluşumu β, bulanık yeşilimsi zon oluşumu α, zon oluşmaması ise γ-hemolitik reaksiyon olarak değerlendirilecektir (Farrar ve Reboli, 2006; Austin ve Austin, 2016).

DNase aktivitesinin belirlenmesi için test edilecek olan izolatın saf kültüründen DNase agara (Merck) ekim yapılarak, 22°C'de 24-48 saat inkübe edildi. inkübasyon sonrasında oluşan koloniler üzerine 1 damla 1N HCL uygulanır. Şeffaf zon oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Gao vd. 2018).

3.2.4.2 *L. garvieae* (LG) İzolatlarında Kapsül Tespiti:

3.2.4.2.1 *L. garvieae* İzolatlarında Fenotipik (spesifik besi yeri, kapsül boyama) olarak Kapsül Tespiti:

***L. garvieae* ve *L. petauri* izolatlarının fenotipik kapsül formasyunu;** bileşiminde Oxgall ve potasyum tellurite nutrientlerini içeren **LG Agar (*L. garvieae* kapsül formasyonu belirlenmesi için selektif olan bir besiyeri)** kullanılarak incelendi (Chang vd., 2014). **Bunun için bir litre LG Agar besiyerine;** besiyeri bileşenleri homojen olarak karıştırılıp, 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edildikten sonra petrilere dökülmeden önce (55**°C), membran filtre ile sterilize edilen, %1'lik tetrazolium** (9:1 oranında; 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride/tetrazolium blue chloride) **1 mL ilave edildi**. FTS (0.85% NaCl) ile süspanse edilen taze bakteri kültürleri, son konsantrasyonları, spektrofotometrede (MultiScan Go, Thermo) 590 nm dalga boyunda 0,60 optik dansiteye ayarlanarak standardize edildi. Standardize edilmiş bakteri kültürleri LG agar üzerine yayılarak 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. TSA besiyeri negatif kontrol olarak kullanıldı. LG Agar besiyerinde üreyen koloniler incelenerek,

kapsüllü ***L. garvieae*** izolatlarının oluşturduğu spesifik kolonilerin görünümleri ve negatif kapsül boyama (Türe ve Atlinok, 2016; Rao vd., 2021) sonrası görülen kapsül veya kapsül benzeri yapıların fotoğrafları çekilerek kayıt altına alındı (Chang vd., 2014). Ayrıca fenotipik olarak kapsüllü olduğu belirlenen *L. garvieae* izolatlarında, kapsül varlığını teyit etmek amacıyla elektron mikroskop kullanıldı (Chang vd., 2014).

3.2.4.2.2 Elektron Mikroskobu ile *L. garvieae* ve *L. petauri* İzolatlarının Kapsül Formasyonunun Görüntülemesi

Yapılan ön çalışmalarda negatif kapsül boyamada (negatif nigrosin boyama ve %1 kristal viole, Türe ve Atlinok, 2016; Rao vd., 2021) kapsül şüpheli olan *L. garvieae* izolatlarında, kapsül formasyonunun varlığı elektron mikroskop (scanning ve transmission) ile incelendi. Bu amaçla *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatları Todd-Heiwth agarda inokule edilerek elektron mikroskopta görüntülenmek için hazırlandı. Elektron mikroskop ile kapsülün görüntülenmesi, hizmet alımı yoluyla yapıldı. Bu amaçla şuşlar, Todd-Hewitt agar (Becton Dickinson and Company) agarındaki kapsül oluşumuna (Chang ve ark., 2013) dayanarak seçildi. Hücre boyutu, morfolojisi ve kamçı yerleşimi, 28 °C'de 20 saat inkübasyonun ardından Todd-Hewitt agarında (Becton Dickinson and Company, İngiltere) büyüme fazı sırasında bakteriyel hücrelerin (*L. garvieae* ve *L. petauri*) transmisyon elektron mikroskobu ile belirlendi. Kapsül formasyonunun belirlenmesi için 75 Kv Hitachi model H600 bir elektron mikroskobu kullanıldı. Örnekler, daha önce açıklandığı gibi fosfotungstik asitle (%1, pH 7,0) negatif boyandı (Ooyama vd. 2004).

Ayrıca fenotipik olarak kapsüllü olduğu belirlenen izolatlarda genom analizi ile kapsül gen bölgesinin formasyonu incelendi.

3.2.4.2.3 *L. garvieae* ve *L. petauri* İzolatlarının Genom Analizi ile Kapsül Gen Bölgesi Formasyonun Belirlenmesi

Miyauchi vd., (2012) ve Ture ve Altinok (2016) tarafından önerilen gen bölgeleri (*capsule gene cluster, Haemolysin, NADH oxidase, Superoxide dismutase, Phosphoglucomutase, Adhesin Pav, Adhesin PsaA, Enolase, LPxTG-containing surface protein, Adhesin, Adhesin cluster*) ***L. garvieae* ve *L. petauri* suşlarında** incelendi (Ture ve Atlinok, 2016; Rao vd., 2021). Bunun yanısıra Rao vd., (2021) tarafından tanımlanan yöntemle kapsül benzeri hücre-yüzey proteinleri ve hiyaluronik asit varlığı da analiz edildi.

3.2.4.3 Hiperimmun Serum Eldesi

Tavşanlardan hiperimmun serum eldesinde *Y. ruckeri* O1 BT 1 (NCTC 12266), *Y. ruckeri* O1 BT 2 (Türkiye saha izolatı), *L. garvieae* (ATCC 43921), *L. petauri* (LMG30040^T), *V. anguillarum*

O1 (NCIMB 2131) , O2a (NCIMB 6^T) ve O2b (NCIMB 2130) standart suşları kullanılarak hiperimmunizasyon yapıldı. *Y.ruckeri* O1 BT 1 ve BT 2, ***L. garvieae*** **ve** ***L. petauri*** **ve** ***V. anguillarum*** **O1** suşlarının antikor düzeylerini belirlemek ve serotiplendirmesini yapmak için, yerel etik kurul onayı (17.05.2023, karar numarası 2023-01) sonrasında ATAFEN A.Ş.'nin deney hayvanları ünitesinde hiperimmün serum üretimi gerçekleştirildi.

3.2.4.3.1 *Y. ruckeri* ile Yeni Zellanda Tavşanlarının Hiperimmunizasyonu

Y. ruckeri'ye ait (BT1 ve BT 2) referans suşlar, tripton soy buyyon (TSB) (Oxoid) içinde 22 ºC'de 24 saat büyütüldü. Daha sonra %0.5'e (v/v) formalin (% 37) eklenerek 24 saat süreyle +4 ºC'de bekletilerek inaktive edildi. Formalinle öldürülmüş hücreler 1000 devir/sn(g)'de santrifüjlenerek 3 kez yıkandı ve %0.85 NaCl ilave edilerek spektrofotometrede (Multican Go, Thermo, Amerika) 610 nm'de 1.0 optik yoğunlukta (OD) olacak şekilde (~109 bakteri süspansiyonu) yeniden süspanse edildi.

Hazırlanan süspansiyonlar (~10^9 cfu/mL bakteri süspansiyonu) 1. gün, 0.25 ml; 4. gün, 0.5 ml; 8. gün, 1.0 ml; 11. gün, 2.0 ml dozlarında Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına kulak venasından enjekte edildi. Aynı optik yoğunluğa (610 nm'de 1.0 OD) ayarlanan (~10^9 cfu/mL bakteri süspansiyonu) bakteri süspansiyonları 15. gün, 0.5 ml; 18. gün, 1.0 ml; 22. gün, 2.0 ml dozda intravenöz olarak yavaşça enjekte edildi. Son enjeksiyondan 2 hafta sonra(36. gün) tavşanların marjinal kulak venasından kan alındı. Alınan kan örnekleri, oda sıcaklığında 1 saat pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra ve gece boyunca 4°C'de muhafaza edildi. 1000Xg'de 5 dk santrifüj edildikten sonra serumları ayrıldı, 0.45 µm Millipore filtreden geçirililerek sterilize edildi ve çalışmalarda kullanılmak üzere -70 °C'de saklandı (Davies 1990).

3.2.4.3.2 *V. anguillarum* ile Yeni Zellanda Tavşanlarının Hiperimmunizasyonu

V. anguillarum'a ait (O1, O2a ve O2b) referans suşlar, tripton soy buyyon (TSB) (Oxoid) içinde 22 ºC'de 24 saat büyütüldü. Daha sonra %0.5'e (v/v) formalin (% 37) eklenerek 24 saat süreyle +4 ºC'de bekletilerek inaktive edildi. Formalinle öldürülmüş hücreler 1000 devir/sn(g)'de santrifüjlenerek 3 kez yıkandı ve %0.85 NaCl ilave edilerek 610 nm'de 1.0 optik yoğunlukta (~10^9 cfu/mL bakteri süspansiyonu) olacak şekilde yeniden süspanse edildi. Hazırlanan süspansiyonlar (~10^9 cfu/mL bakteri süspansiyonu) 1. gün, 0.20 ml; 4. gün, 0.40 ml; 8. gün, 0.80 ml; 11. gün, 1.0 ml dozlarında Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına kulak venasından enjekte edildi. Aynı optik yoğunluğa (610 nm'de 1.0 OD) ayarlanan (~10^9 bakteri süspansiyonu) aktif bakteri süspansiyonları 15. gün, 1.0 ml; 18. gün, 1.0 ml; 22. gün ve 25. Gün de 1.0 intravenöz olarak yavaşça enjekte edildi. Son enjeksiyondan bir hafta sonra (32. gün) tavşanların marjinal kulak venasından kan alındı. Kan örnekleri oda sıcaklığında 1 saat pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra gece boyunca 4°C'de bekletildi. 1000Xg'de 5 dk santrifüj edildikten sonra serumları 0.45

µm Millipore filtreden geçirilerek sterilize edildi ve uygun hacimlere bölünerek -70 °C'de saklandı (Sorensen ve Larensen 1986).

3.2.4.4 *L. garvieae* ve *L. petauri* ile Yeni Zellanda Tavşanlarının Hiperimmunizasyonu

L. garvieae ve *L. petauri* referans suşları, tripton soy buyyon (TSB) (Oxoid) içinde 22 ºC'de 24 saat büyütüldü. Daha sonra %0.5'e (v/v) formalin (% 37) eklenerek 24 saat süreyle +4 ºC'de bekletilerek inaktive edildi. Formalinle öldürülmüş hücreler 1000 devir/sn(g)'de santrifüjlenerek 3 kez yıkandı ve %0.85 NaCl ilave edilerek 610 nm'de 1.0 optik yoğunlukta (~10^9 cfu/mL bakteri süspansiyonu) olacak şekilde yeniden süspanse edildi.

Hazırlanan bakteriyel süspansiyonlar (~10^9 cfu/mL bakteri süspansiyonu) eşit hacimde Freund complete adjuvan (FCA) ile karıştırılarak (0,5 ml bakterin+ 0,5 ml FCA) Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına 1'er ml dozda 2 hafta aralıklarla 3 kez kas içi enjekte edildi. Son enjeksiyondan iki hafta sonra (50. gün) tavşanların marjinal kulak venasından kan alındı. Kan örnekleri oda sıcaklığında 1 saat pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra gece boyunca 4°C'de bekletildi. 1000Xg'de 5 dk santrifüj edildikten sonra serumları 0.45 µm Millipore filtreden geçirilerek sterilize edildi ve uygun hacimlere bölünerek -70 °C'de saklandı (Barnes ve Ellis 2004).

3.2.4.5 *Y. ruckeri, L. garvieae, L. petauri* ve *V. anguillarum* Suşlarının Serotiplendirilmesi

İzolasyon ve identifikasyonu yapılan bakteri suşlarının serotiplendirilmesi mikroplak aglutinasyon yöntemi ile Roberson, (1993), Lorenzen ve Olesen (1997), Arkoosh, Kaattari (1993) ve Jaramillo vd. (2017)'nin önerdiği yöntemler modifiye edilerek yapıldı Bu amaçla standart suşların serotiplerine karşı hazırlanmış olan antiserumlar saha suşlarının serotiplerinin belirlenmesinde kullanıldı. Her suş her bir antiserum ile teste tabi tutuldu ve pozitif reaksiyon veren antiserum antikor titrelerine göre serotipleri belirlendi.

3.2.4.6 Lam ve Mikroplak (Microwell Plate, Kantitaif) Aglutinasyon

Suşlar arasındaki serolojik ilişkiler, lam aglütinasyon ve mikroplaka aglütinasyon testleri ile belirlendi. Aglütinasyon reaksiyonları, antijen (10^9 hücre/ml, McFarland standart no. 3) ve absorbe edilmiş/absorbe edilmemiş tavşan tüm hücre antiserumları kullanılarak belirlendi (Stevenson and Daly 1982).

Lam aglütinasyon testleri, Toranzo ve ark. (1987) tarafından daha önce açıklandığı gibi, her bir türe ait O-antijen süspansiyonundan bir damla alınarak, 1:10 oranında seyreltilmiş tür spesifik antiserumun bir damlasıyla temiz bir lam üzerinde karıştırılmasıyla gerçekleştirildi. Güçlü ve hızlı aglütinasyon pozitif sonuç olarak kaydedildi..

Mikroplaka aglütinasyon testleri, her antiserumun 1:10'dan 1:1280'e kadar on defa 2 kat seri seyreltmesi ile 2 tekrarlı olarak 96 kuyucuklu mikroplakalarda (Thermo Scientific™ NC-

446612) gerçekleştirildi. Plakalar 37°C'de 2 saat süreyle oda sıcaklığında ve ardından gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. Koyu bir arka planda görsel olarak kaydedilen antikor titreleri, makroskobik olarak görünür bir aglütinasyonu gösteren en yüksek serum dilüsyon değeri kaydedilerek belirlendi.

Y. ruckeri (serotip O1, biotip 2), *L. garvieae, L. petauri*, *V. anguillarum* (O1, O2a, O2b) suşlarının serotiplendirilmesi mikroplak aglutinasyon testi kullanılarak yapıldı. Bu amaçla, kullanılan polyester mikroplaklara (U tabanlı, Greiner) 1:10 oranında PBS ile sulandırılan antiserum (75 µl PBS + 25 µl antiserum) solusyonuna daha sonra 25 µl antijen solüsyonu eklenerek karıştırıcı (vorteks) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra tür/biyotip spesifik antijen ve antiserum dilusyon eşit hacimdeki karışımlarının 1:10'dan 1:1280'e kadar titre değerleri kaydedildi.

3.2.4.7 SDS-PAGE ile Tüm Hücre Protein Profilleri

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), Laemmli (Laemmli, 1970) tarafından açıklanan yönteme göre gerçekleştirildi. Kısaca, SDS-PAGE analizi, üreticinin protokolüne uygun olarak Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer (Biorad 1704150, Hercules, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri) sistemi kullanılarak gerçekleştirildi (%12 TGX Stain-Free™ FastCast™ kiti, 1610175; Laemli Numune Tamponu, Bio-Rad 1610747; 2-Merkaptoetanol, Bio-Rad 1610710; TEMED, Bio-Rad; 10x Tris/Glisin/SDS 1610772; Precision Plus Protein Dual ColorStandards, 1610374). Tüm hücre protein bantları, Bio-Rad Chemidoc MP görüntüleme sistemi (ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi) kullanılarak görüntülendi. Protein bantları, QuantityOne Yazılımı (V. 4.6.5, Bio-Rad, ABD) ile analiz edildi.

Protein bantlarının boyutu ve çeşitliliği, BioNumerics v. 7.6 yazılımı (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) kullanılarak belirlendi.

İkili moleküler mesafeler, bant bazlı Dice benzerlik katsayısı kullanılarak hesaplandı. Dendrogramlar, aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi (UPGMA) kullanılarak oluşturuldu. En az %70 benzerlik indeksi gösteren suşlar ayırt edilemez kabul edildi ve analiz edilen suşlar, benzerlik indekslerine göre kümeler içinde gruplandırıldı.

3.2.4.8 Antijenik Profillerinin Belirlenmesi

Proteinler, %5-12 SDS-PAGE jellerinde ayrıştırıldı. Her şerit için 15 µL örnek yüklendi. Elektroforezden sonra proteinler, 35 V'da (500 mA, 150 W) 1 saat boyunca nitroselüloz membranlara (0,45 µm gözenek boyutlu, Bio-Rad, Hercules, ABD) aktarıldı. Membranlar, dikey bir çalkalayıcıda %5 blokaj tamponu ECL (Bio-Rad, ABD) ile 5 dakika boyunca bloke edildi. Membranlar daha sonra oda sıcaklığında 1:200 oranında seyreltilmiş hiperimmün tavşan serumu (primer antikorlar) ile 1 saat boyunca inkübe edildi. Üç kez TBST ile yıkandıktan

sonra, membranlar keçi anti-tavşan IgG-HRP sekonder antikoru (1:10000; Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, ABD) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve üç kez TBST ile yıkandı. Protein bantları, ChemiDoc görüntüleme sistemi (Bio-Rad, Hercules, ABD) ve Clarity Max Subs kiti (Bio-Rad, Hercules, ABD) kullanılarak görüntülendi.
Negatif kontroller için primer antikor olarak immün olmayan tavşan serumu kullanıldı.
Y. ruckeri serotip O1 BT1, BT2 ve *V. anguillarum* suşlarına maruz bırakılan tavşanlardan elde edilen antikorların veya serumların özgüllüğünü belirlemek için, *E. coli*'nin tam hücre proteinleri ile Western blot analizi yapıldı.

3.2.4.9 Aday Aşı Suşların Tüm Genom Analizi ile Biyoinformatik Analizi

Çalışmada; *Y. ruckeri* (O1, O2), *V. anguillarum* (O1, O2a, O2b), *L. garvieae* (mikrokapsüllü ve kapsülsüz) bakterilerinin referans suşları ile saha çalışmalarından izole ve identifiye edilen izolatların mikroplak aglütinasyon testiyle serotipleri SDS-PAGE ve İmmunoblot analizleriyle antijenik özellik gösteren proteinleri belirlendi. Gerek SDS-PAGE gerekse İmmunoblot analizlerinde elde edilen her bir bakteri türüne ait (*Y. ruckeri, V. anguillarum, L. garvieae, L. petauri*) protein bantları, kendi içlerinde ayrı ayrı değerlendirilerek aşı suşlarının ön seçimleri yapıldı. Ön seçimleri yapılan her bir bakteri türünün kendi içinde serotipleri, genotipleri, virulens genleri, **koruyucu antijenlerin işlevsellikleri** ve invivo virulens denemelerine ilişkin elde edilen veriler bir bütün olarak değerlendirilerek **her bir türe ait aşı suş/suşları** belirlendi. *Y. ruckeri, V. anguillarum, L. garvieae, L. petauri* türlerinde aşı suşlarının yanı sıra eprüvasyon çalışmalarında kullanılan (genotip serotip ve virulens özellikleri değerlendirilerek) **eprüvasyon** suşları (çalışma tohum suşu)'da belirlendi.

3.2.4.9.1 İzolatların Tüm Genom Sekans Analizi ile Genom Özellikleri ve Virülens Genlerinin Belirlenmesi

Bakteriyel izolatlar arasında yapılan gruplama analizleri sonucunda seçilen aday suşlar, tüm genom sekanslama (Whole Genome Sequencing, WGS) yöntemiyle genomik düzeyde incelenmiştir. Bu amaçla, her bir izolat için 50 ng genomik DNA kullanılarak tüm genom shotgun sekanslama yapılmıştır. Sekanslama işlemi, hibrit okuma stratejisiyle gerçekleştirilmiştir. Bu stratejide, Illumina platformuna ait yüksek doğruluklu kısa okumalar (short reads) ile Oxford Nanopore platformuna ait uzun okumalar (long reads) birleştirilmiştir. Sekanslama hizmeti, dış kaynak kullanımı ile sağlanmıştır.
Elde edilen FASTQ formatındaki ham veriler, Geneious yazılımına yüklenerek aşağıdaki kalite kontrol analizleri gerçekleştirilmiştir:

- Basit istatistiksel özetler (okuma sayısı, baz sayısı, ortalama okuma uzunluğu),
- Baz düzeyinde kalite analizi (Phred skor dağılımı),

- Genel kalite dağılımı,
- GC içeriği (%GC),
- Okunamayan baz oranı (ambiguous base content, “N” oranı),
- Sekans uzunluğu dağılımı,
- Tekrarlı sekans oranı,
- K-mer içeriği analizi.

Kalite kontrol sonrası, düşük kaliteli okumalar (Phred skoru < Q20) ile adaptör kontaminasyonları Geneious Prime yazılımı içinde yer alan BBDuk algoritması kullanılarak temizlenmiştir (trimming).

Temizlenen veriler, SPAdes v3.13.0 ile de novo olarak birleştirilmiştir (assembly). Elde edilen kontiglerden 1000 bp’nin üzerindeki birleşmeler, NCBI Prokaryotik Genom Açıklama Platformu (PGAP) aracılığıyla biyolojik olarak anotlanmıştır.

Virülens genlerinin belirlenmesi amacıyla, Virulence Factor Database (VFDB) kullanılmıştır. Tanımlama işlemleri, BLAST algoritması ile gerçekleştirilmiş (McArthur vd., 2013; Liu vd., 2019; Alcock vd., 2020, Lo vd., 2020) ve aşağıdaki eşik değerler uygulanmıştır:

- E-değeri < 1e−5,
- Kimlik oranı (identity) ≥ %70,
- Örtüşme oranı (coverage) ≥ %80.

Aynı lokusta birden fazla virülens geni eşleştiğinde, sadece en yüksek skorla hizalanan gen dikkate alınmıştır (Lee vd., 2019; Saticioglu vd., 2021). .

Tanımlanan tüm olası virülens genleri için subsellüler lokalizasyon analizi, PSORTb v3.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde lokalizasyon puanı > 7.5 olan proteinler değerlendirmeye alınmıştır. Hem hücre dışı hem de dış membranda lokalize olan proteinler, SignalP sunucusuna aktarılmış ve varsa sinyal peptitleri ile bunların dahil olduğu salgılama/binding yolları (%90 güven eşiğiyle) analiz edilmiştir.

Virülens genlerinin olası adezyon özellikleri, SPAAN yazılımı ile test edilmiştir. Ayrıca, bu proteinlerin üç boyutlu yapısı ve katlanma özellikleri, %97 üzeri güvenilirlik sağlayan Phyre2 platformu kullanılarak modellenmiştir.

Yatay gen transferi ile kazanılmış olabilecek genetik bölgeler (Genomik Adalar, GIs), IslandViewer 4 yazılımı ile tanımlanmıştır. İndüklenebilir profaj bölgeleri, PHASTER aracı kullanılarak saptanmış; bu profajlar arasında bozulmamış olanlar ise VIRFAM yazılımı ile sınıflandırılmıştır.

Elde edilen tüm genomik veriler, aşı tasarımı açısından değerlendirilmiş ve potansiyel aşı adaylarının belirlenmesinde Vaxign yazılım platformu kullanılmıştır. Ayrıca, belirlenen antijenlerin koruyucu potansiyelinin doğrulanması amacıyla VaxiJen analizleri gerçekleştirilmiştir (Naz vd., 2019; Marie Ellul vd., 2021).

3.2.5 Aşı Geliştirme Çalışmaları

3.2.5.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılacak Balıkların Mikrobiyolojik Muayenesi ve Sakinleştirilmesi

Aşı geliştirme çalışmaları sırasında deneylerde kullanılan balıklar üzerinde yapılan manipülasyon, enjeksiyon uygulamaları (virulens, LD_{60}, aşılama, güvenlik ve eprüvasyon) sırasında balıklar hayvan refahı uygulamalarına uygun olarak fenoksietanol (0,32 mL/L) ile anestezi altına alınarak sakinleştirildi (Bagni vd., 2005; Mirzargar vd., 2011). Gökkuşağı alabalıklarında aşı geliştirme çalışmalarında virülens denemeleri, LD_{60} dozunun belirleme ve eprüvasyon çalışmalarından önce balıkların iç organlarından (karaciğer, böbrek, dalak) mikrobiyolojik incelemeler yapıldı, patojen taşımadığı belirlenen balıklar çalışmada kullanıldı.

3.2.5.2 Gökkuşağı Alabalıklarında Virulens Denemeleri

Balık Deney Ünitesi, Su Kalitesi Parametreleri ve Deney Grupları Gökkuşağı alabalığı üzerinde in vivo virülans deneyleri, yerel etik kurul onayı (onay numarası 2022-01/12) ile Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (ÇOMÜ) Deniz Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi balık deney ünitesinde yürütülmüştür.

İthal sertifikalı yumurtalardan elde edilen ve daha önce hastalık öyküsü bulunmayan, ortalama ağırlıkları 15,2 ± 0,3 g olan toplam 450 gökkuşağı alabalığı, balık refahı prensiplerine uygun olarak deney ünitesine nakledildikten sonra 15 gün boyunca aklimatize edilmiştir.

Deneylerde her biri 500 L'lik 30 fiberglas tank kullanılmıştır. Fiberglas tanklara su, kapalı bir sirkülasyon sisteminden günlük %30 su değişimi ile sağlanmıştır.

Deney süresince ortalama su sıcaklığı 16,6 ºC ± 0,2, ortalama çözünmüş O_2, 8,5 ± 0,4 mg/L ve ortalama pH 7,8 ± 0,0 olarak hesaplanmıştır.

Deney başlamadan önce, her gruptan 3 balık olmak üzere 90 balıkta mikrobiyolojik inceleme yapılmıştır.

Y. ruckeri O1 BT1 ve BT2, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* O1 suşlarıyla yapılan virülans deneylerinde, 15 deney grubu oluşturulmuştur. Her grupta 30 gökkuşağı alabalığı yer almıştır.

3.2.5.2.1 Eprüvasyon Deneyleri

Virülans deneylerinde kullanılan *Y. ruckeri* serotipi O1 BT1 ve BT2, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* O1 suşları, farklı coğrafi bölgelerde yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir. Bu izolatların hareketlilik, mikrokapsül formasyonu, koyun kanında hemoliz, Tween 80, Jelatin ve Kazein hidroliz, tam hücre protein profilleri ve antijenik özelliklerine göre fenotipik virülansları belirlenmiş ve her bir tür/biyotipten üç izolat**, in vivo** virülans testleri için seçilmiştir.

Virülans testleri için seçilen *Y. ruckeri* serotip O1 BT1 (Ch1: Y2022 -239; Ch2: Y258; Ch3: Y2022 -266) ve BT2 (Ch4: Y248; Ch5: Y2022 -430; Ch6: Y254), *L. garvieae* (Ch7:L-18; Ch8: L-67 ve Ch9: L-89), *L. petauri* (Ch10: L-1; Ch11: L2022-296 ve Ch12: L-152) ve *V. anguillarum* (Ch13: V-12; Ch14: V-15 ve Ch15: V-18) suşları saflık kontrollerine tabi tutulmuş ve ardından %5 koyun kanlı agar (BA) üzerinde 22°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Koloniler seçilmiş ve TSB besiyerine aktarılmıştır. 22°C'de 220 rpm'de 24 saat çalkalandıktan sonra, her bakteri izolatı canlı bakteri sayımlarını (cfu/mL) belirlemek için TSA üzerinde üç kez büyütüldü. Eş zamanlı olarak, eprüvasyon deneylerinde kullanılacak bakteriyel suşların TSB kültürleri optik yoğunluğu (OD), spektrofotometre (Multiscan GO Thermo Fisher Scientific) kullanılarak 620 nm'de ölçüldü ve tüm bakteri süspansiyonları 620 nm dalga boyunda 0,1 olarak ayarlandı (Khimmakthong ve ark., 2013; Scott, 2012).

Deney gruplarında, yaklaşık 10^6 cfu/balık canlı bakteri (LD60) içeren süspansiyonlar, fenoksietanol (0,32 mL/L) ile anestezi uygulandıktan sonra, grup başına 30 gökkuşağı alabalığının her birine 0,1 mL hacimde intraperitoneal (ip) olarak uygulandı.

Kontrol gruplarına 0,1 mL %0,85 NaCl (fizyolojik tuzlu su) verildi. Tüm gruplardaki balıklar 21 gün boyunca gözlemlendi ve ölen balıkların böbreklerinden TSA kültürleri alındı. Virülans deneylerinde kullanılan izolatlar, biyotipleri, kökenleri, uygulama dozları, yöntemleri ve miktarları ile ilgili bilgiler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Virülans çalışmasında kullanılan izolatlarının kökenleri, serotipik/biyotipik (BT) özellikleri, uygulama yolu, bakteri dozu ve enjeksiyon dozu ile ilgili bilgiler.

Deney grubu (n=30)	**İzolat kodu**	**Köken**	**Serotip/BT**	**Bakteri dozu cfu/mL**	**Uygulama yolu**	**Enjeksiyon Dozu (mL)**
Ch1	Y2022 -239	Sivas	O1 BT1	~ 10^7	Periton içi	0,1
Ch2	Y-258	Trabzon	O1 BT1	~ 10^7	Periton içi	0,1
Ch3	Y2022-266	Düzce	O1 BT1	~ 10^7	Periton içi	0,1,
Ch4	Y-248	Muğla	O1 BT2	~ 10^7	Periton içi	0,1
Ch5	Y-254	Sakarya	O1 BT2	~ 10^7	Periton içi	0,1
Ch6	Y2022-430	Kayseri	O1 BT2	~ 10^7	Periton içi	0,1
Ch7	L-18	Muğla	Kapsülsüz	~ 10^7	Periton içi	0,1,
Ch8	L-67	Kayseri	Mikrokapsül	~ 10^7	Periton içi	0,1
Ch9	L-89	Muğla	Mikrokapsül	~ 10^7	Periton içi	0,1
Ch10	L-1	Muğla	Mikrokapsül	~ 10^7	Periton içi	0,1

Ch11	L-152	Gümüşhane	Mikrokapsül	~ 10^7	Periton içi	0,1,
Ch12	L2022-296	Sivas	Kapsülsüz	~ 10^7	Periton içi	0,1
Ch13	V-12	Muğla	O1	~ 10^7	Periton içi	0,1
Ch14	V-15	Muğla	O1	~ 10^7	Periton içi	0,1,
Ch15	V18	Tunceli	O1	~ 10^7	Periton içi	0,1

3.2.5.3 İnaktif Aşıların Hazırlanması

3.2.5.3.1 Etken İzolasyonu ve Saflaştırılması

Yapılan çalışmalar sonucunda aşı üretiminde kullanılmak üzere seçimi yapılan bakteri suşları, stok kültürden TSA (Triptik Soy Agar), CA (Colombia Agar) besi yerlerine alınarak 22 °C'de 22-48 saat inkübe edildi. İnkubasyon sonucunda üreyen bakterilerin saflık kontrolleri yapılarak (Maldı Tof MS ve lam aglütinasyon) saf bakteri kültürleri elde edildi. (Buller, 2004; Austin ve Austin, 2016).

3.2.5.3.2 İnaktif Banyo ve Enjeksiyon Monovalan, Bivalan, Kombine Emülsiyon Aşı/Aşıların(*Y. ruckeri* BT 1, *Y. ruckeri* BT 2, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum*) Hazırlanması

3.2.5.3.2.1 Ana tohum suşu (master seed) ve çalışma tohum suşu (working seed) stoklarının oluşturulması.

Y. ruckeri O1 BT 1*, Y. ruckeri* O1 BT 2, *L. garvieae, L. petauri* ve *V. anguillarum* suşları uygun besiyerlerine (%5 koyun kanı içeren Columbia Agar) açılarak en çok iki kez pasaj ile ana tohum kültürleri elde edildi. Suşların saflık, identifikasyon, serotip gibi tüm testleri yapıldıktan sonra liyofilize edilerek veya %50 glycerin içeren besiyeri içinde -80°C'de muhafaza edildi. Çalışma Tohum Suşları ise uygun besiyerlerine pasaj yapılarak elde edildi ve tüm testleri yapılarak aynı şekilde %50 glycerin içeren besiyeri içinde -80°C'de muhafaza edildi.

a) **Antijen balklarının üretimi:** Belirlenen aşı suşlarından antijen balklarının üretimi için seçilen aşı suşlarından hazırlanan ana tohum suşu (master seed) ve çalışma tohum suşu (working seed) stoklarından suşlar açılarak balk üretimleri yapıldı. Üretimler; Çalışma Kültürü-1 (ÇK-1), Çalışma Kültürü-2 (ÇK-2) ve ana kültür olmak üzere maksimum 3 pasaj olarak yapıldı. Bu amaçla Aşı Suşu olarak seçilen ve %20 gliserol içeren TSB içinde – 80 °C'de saklanmış olan ***Y. ruckeri* (Yr) O1 BT 1*, Y. ruckeri* O1 BT 2, *L. garvieae (Lg), L. petauri* (Lp) ve *V. anguillarum* (Va)** suş/suşları açılıp standart BHIB ve BHIA besiyerleri ile TSB ve TSA agar besiyerlerine ekim yapıldı ve 22 °C'de 48 saat inkübe edildi. İlk kültürlerin yani Çalışma Kültürü-1 (ÇK-1) saflık kontrolü yapıldıktan sonra, BHIB ve TSB'ye pasaj yapıldı ve besi yerleri 22 °C'de 48 saat inkübe edildi ve böylece Çalışma Kültürü-2 (ÇK-2) elde edildi. Elde edilen ÇK-2 kültürünün saflık kontrolünden sonra fermentörlerde

hazırlanan BHIB ve TSB'ye pasaj yapılarak ve 22 °C'de 48 saat inkube edildi (Ana kültür). İnkubasyon süresinin sonunda kültür son saat örneklerinden bakteri sayımı yapılarak cfu/ml sayısı belirlendi. Her üretim aşamasında besiyeri hacimleri üretim amacına göre belirlenerek, pasaj oranları %3-5 aralığında olacak şekilde ayarlandı. Küçük hacim laboratuvar üretimleri ile hazırlanan Prototip aşıların antijen üretimleri 5 L hacminde yapıldı. Üreme süresince sıcaklık derecesi, inkübasyon süresi, pH, karıştırma hızı ve üreme eğrisi gibi parametreler değerlendirilerek üreme optimizasyonları yapıldı.

b) İnaktivasyon: Ana kültürler elde edildikten sonra kültürlere %0.5 oranında formaldehit eklenerek önce oda sıcaklığında 2 saat, sonra +4 °C'de 24 saat süreyle karıştırılarak inaktivasyon işlemi yapıldı. Sürenin sonunda inaktivasyon testleri ile kültürlerde canlılık ve toksisite testleri yapıldı. Bu aşamada inaktivasyon kinetiği ve hızı belirlenerek her aşı suşu için inaktivasyon prosesi optimize(sıcaklık/zaman) edildi.

c) Filtrasyon ve konsantrasyon: İnaktif antijen balklarında sıvı proses filtreleri ve kaset filtreler kullanılarak bakteriler ayrıldı, elde edilen süpernatant cross flow cihazında kaset filtreler ile konsantre edildi. 15-20 kat arası konsantre edilen antijen balklarının sterilite testleri yapılarak formülasyon işlemine kadar 4+C'de muhafaza edildi.

d) Formülasyon işlemi ve prototip aşıların üretimi: İnaktif ve konsantre antijen balkları kullanılarak *L. garvieae ve L. petauri* içeren ikili kombine emülsiyon aşı formülasyonu yapıldı. Prototip aşı formülasyon işlemi için balklarda hesaplanan cfu/mL değerleri ile final ürün için Avrupa Farmakope'de belirtilen kriterler esas alındı. Proje kapsamında aynı antijen balkları ile banyo/immersiyon ve enjeksiyon yöntemi aşılama için yağ adjuvantlı emülsiyon aşılar olmak üzere 2 ayrı formda aşı formüle edildi. Aşıda her dozda bulunması gereken cfu/mL miktarının daldırma aşıda minimum 10^{10}, enjeksiyon aşı da ise 10^{9} cfu/ml olacak şekilde hesaplanması; ayrıca aşı etkinlik deneylerinde daldırma aşıda %60'ın, enjeksiyon aşıda %75-85'in üzerinde koruma sağlanması temel alındı. (European Pharmacopoeıa 11.0, 01/2022:1581 Vıbrıosıs Vaccıne (Inactıvated) For Salmonids; European Pharmacopoeıa 11.0, 01/2022:1950 Yersiniosis Vaccıne (Inactıvated) For Salmonids). Banyo/ immersiyon aşı %50 oranında Montanid (IMS-1312) yağ adjuvantı olarak emülsiyon formda hazırlandı. Enjeksiyon amaçlı emülsiyon aşı ise %70 Montanid [ISA-763 A, W/O, (%70 adjuvan ve %30 antijen)] yağ adjuvant kullanılarak aynı şekilde emülsiyon aşı olarak hazırlandı. Yağ adjuvantlı aşılar yüksek hızlı homojenizatörler kullanılarak emülsiyon aşı olarak hazırlandı. Formülasyon işlemi küçük hacim üretilen balklar ile yapılan prototip aşı formülasyonu yapıldı.

e) Dolum, etiketleme ve depolama: Proje kapsamında daldırma ve enjeksiyon aşıları için 5'er L prototip aşı üretildi. Hazırlanan aşılar 250 ml hacminde propilen şişelere doldurularak etiketlendi ve testleri yapılmak üzere +4-8°C'de muhafaza edildi.

f)

3.2.5.3.3 Final Ürün Testleri

3.2.5.3.3.1 Aşılarda Sterilite Kontrolü

Sterilite Testi, “European Pharmacopoeia 11.0 01/2014:20601 Biological Tests 2.6.1-Sterility” referansında belirtilen Sterilite testleriyle uygunluk gösterdi. Üretim basamaklarında meydana gelebilecek herhangi bir kontaminasyonu tespit etmek amacıyla uygulanır. Bu amaçla aerobik ve anaerobik bakterilerin tespiti için, Fluid Thioglycollate Medium ve aerobik bakterilerle birlikte fungusların tespiti için Soya-Bean Casein Digest Broth kullanıldı. Söz konusu besiyerleri imalatçı firmanın tavsiyesi doğrultusunda hazırlandı ve sterilize edildi. Sterilize edilen besiyerleri 22 ve 37°C’de 24 saat inkube edilerek, sterilite kontrollerinden geçirildi. Sterilite kontrolünden başarıyla geçen besiyerleri çalışmada kullanıldı.

20 ml Fluid Thioglycollate Besiyeri içeren bir adet tüp ile 20 ml Soybean Casein Digest Besiyeri içeren bir tüpe, besiyeri hacimlerinin %10’nu geçmeyecek miktarda, konsantre inaktif bulk ürün örnekleri inokule edildi. İnokulasyon sonrası, Fluid Thioglycollate Besiyerleri içeren tüp, 35 ^{o}C’de; Soybean Casein Digest Besiyeri içeren tüp ise, 22 ^{o}C’de aerobik koşullar altında, 14 gün süreyle inkube edildi. İnkubasyon süreleri sonunda, söz konusu besiyerlerinde, herhangi bir mikrobiyal üreme olmaması, üretimi yapılan bulk ürünlerin, steril olduğunu gösterdi.

3.2.5.3.3.2 İnaktif Aşılarda Güvenlik (Zararsızlık) Deneyleri

Steril TSB kontrol olmak üzere, vibriozis ve yersiniozis (BT 1 ve BT 2 kombine) emülsiyon banyo ve *Y. ruckeri* O1 BT 1*, Y. ruckeri* O1 BT 2 *L. garvieae (Lg), L. petauri* (Lp) ve *V. anguillarum* (Va) enjeksiyon aşıdan alınan örneklerde güvenlik deneyleri yapıldı. Güvenlik deneylerinde tüm balık gruplarına inaktif banyo aşılar iki kat dozda (1/5 oranında sulandırılarak, (immersion aşı normal aşılamalarda 1/10 sulandırılarak kullanılır) önerilen süreden iki kat daha fazla süre (120 sn) banyo tarzında; enjeksiyon aşılar ise 0,2 ml periton içi inokule edilerek uygulandı (enjeksiyon aşı normal aşılamalarda 0,1 mL kullanılır). Kontrol grubu balıklar steril PBS (Tamponlanmış Fosfat Solusyonu 0,2 ml) ile aynı şekilde teste tabi tutuldu (Tablo 3-6). Balıklar deneme tankları içerisinde 21 gün boyunca izlendi (European Pharmacopoeıa 11.0, 01/2022:1581 Vıbrıosıs Vaccıne (Inactıvated) For Salmonids; European Pharmacopoeıa 11.0, 01/2022:1950 Yersiniosis Vaccıne (Inactıvated) For Salmonids). Bu sürenin sonunda 20 balığa otopsi yapılarak emülsiyon enjeksiyon aşıda kullanılan adjuvan nedeniyle oluşabilecek lokal reaksiyonların değerlendirildi. Öte yandan 20 balığa, 200 gr ağırlığa ulaşıncaya kadar güvenlik testleri için deneye devam edildi. Otopsi bulgularının değerlendirilmesinde Speilberg skorlama yöntemi kullanıldı (Midtlyng, 1996).

Tablo 3. Gökkuşağı Alabalığı *Y. ruckeri* BT1 ve *Y. ruckeri* BT2 İnaktif Kombine Emülsiyon Daldırma/Enjeksiyon Aşı Güvenlik Testleri Deney Planı

Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı	Balık Sayısı		Deney Süresi	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
Daldırma aşı YrBT1-BT2	Alabalık	İmmersion**	~15-20 g	50+50+50	50	21 gün	3
Enjeksiyon aşı YrBT1-BT2	Alabalık	Enjeksiyon***	~15-20 g	70+70+70	70	21 gün	3
Değerlendirme ve Sonuç	*:Deney gruplarında deneme üç tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmadı. **: İmmersion aşının güvenlik testleri için balıklar belirtilen doz ve sürede aşı uygulamasına maruz bırakıldıktan sonra 50 balık 21 gün süreyle izlendi. ***: Enjeksiyon (periton içi) yöntemi ile aşı uygulandıktan sonra 70 balık güvenlik testi için 21 gün süreyle izlendi. Enjeksiyon aşı uygulamasından 24 saat sonra 20 balığa lokal reaksiyonların değerlendirilmesi için otopsi yapıldı. Geriye kalan 50 balıktan 20'si, 200 gr ağırlığa ulaşıncaya kadar deneye devam edildi. Deney sonunda lokal reaksiyonların değerlendirilmesi için otopsi yapıldı. Aşı güvenlik deneylerinde toplam 480 balık kullanıldı.						

Tablo 4. Gökkuşağı Alabalığı *V. anguillarum* O1 İnaktif Emülsiyon Daldırma/Enjeksiyon Aşı Güvenlik Testleri Deney Planı

Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı	Balık Sayısı		Deney Süresi	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
Daldırma aşı Va	Alabalık	İmmersion*	15-20 g	50 +50+50	50	21 gün	3
Enjeksiyon aşı Va	Alabalık	Enjeksiyon**	15-20 g	70+70+70	70	21 gün	3
Değerlendirme ve Sonuç	Deney gruplarında deneme üç tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmadı. *: İmmersion aşının güvenlik testleri için balıklar belirtilen doz ve sürede aşı uygulamasına maruz bırakıldıktan sonra 50 balık 21 gün süreyle izlendi.						

	* *: Enjeksiyon (periton içi) yöntemi ile aşı uygulandıktan sonra 70 balık güvenlik testi için 21 gün süreyle izlendi. Enjeksiyon aşı uygulamasından 24 saat sonra 20 balığa lokal reaksiyonların değerlendirilmesi için otopsi yapıldı. Geriye kalan 50 balıktan 20'si, 200 gr ağırlığa ulaşıncaya kadar deneye devam edildi. Deney sonunda lokal reaksiyonların değerlendirilmesi için otopsi yapıldı. Aşı güvenlik deneylerinde toplam 480 balık kullanıldı.

Tablo 5. Gökkuşağı Alabalığı *L. garvieae* ve *L. petauri* İnaktif Bivalan Enjeksiyon Emülsiyon Aşı (İBEEA) Güvenlik Testleri Deney Planı

Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı	Balık Sayısı		Deney Süresi	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
Lg-Lp İBEEA Aşı	Alabalık	Enjeksiyon**	15-20 g	70+70+70	70	21 gün	3
Değerlendirme ve Sonuç	*:Deney gruplarında deneme üç tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmadı. * * : Enjeksiyon (peritoniçi) yöntemi ile aşı uygulandıktan sonra 70 balık güvenlik testi için 21 gün süreyle izlendi. Enjeksiyon aşı uygulamasından 24 saat sonra 20 balığa lokal reaksiyonların değerlendirilmesi için otopsi yapıldı. Geriye kalan 50 balıktan 20'si, 200 gr ağırlığa ulaşıncaya kadar deneye devam edildi. Deney sonunda lokal reaksiyonların değerlendirilmesi için otopsi yapıldı. Aşı güvenlik deneylerinde toplam 280 balık kullanıldı.						

Tablo 6. Gökkuşağı Alabalığı *Y. ruckeri* O1 BT1, *Y. ruckeri* O1 BT2, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* O1 İnaktif Beşli Kombine Konsante Emülsiyon Enjeksiyon Aşı (YLV5 ICIEV) Güvenlik Testleri Deney Planı

Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı	Balık Sayısı		Deney Süresi	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
YLV5 ICIEV Aşı	Alabalık	Enjeksiyon **	15-20 g	70 +70+70	280	21 gün	3
Değerlendirme ve Sonuç	*:Deney gruplarında deneme üç tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmadı. **: Enjeksiyon (peritoniçi) yöntemi ile aşı uygulandıktan sonra 70 balık güvenlik testi için izlendi. Enjeksiyon aşı uygulamasından 24 saat sonra 20 balığa lokal reaksiyonların değerlendirilmesi için otopsi yapıldı. Geriye kalan 50 balıktan 20'si, 200 gr ağırlığa ulaşıncaya kadar deneye devam edildi. Deney sonunda lokal reaksiyonların değerlendirilmesi için otopsi yapıldı. Aşı güvenlik deneylerinde toplam 280 balık kullanıldı.						

3.2.5.4 Aşı Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Balıklarla ilgili çalışmalarda, aşılama sonrası antikor düzeyine bakılarak bağışıklık durumunun saptanması güvenilir sonuçlar vermemektedir. Bu nedenle balık aşılarının sağladığı bağışıklık seviyesinin belirlenmesinde, eprüvasyon (challenge) uygulamaları sonucunda elde edilen RPS değerleri, aşının etkinliğinde ölçü alınmaktadır (Anderson ve Nelson, 1974; Cipriano ve Ruphental, 1986; Whyte, 1989, Gudding vd., 2014).

Aşının etkinliğinin değerlendirilmesinde eprüvasyon uygulanmadan veya enjeksiyon yöntemiyle i.p. yolla aşılama yapılmadan önce balıklar, 1/40.000 dozda MS-222 ilave edilen plastik kovalara konularak 45 saniye içerisinde hareketsiz duruma getirildi (Bagni vd., 2005; Mirzargar vd., 2013).

3.2.5.4.1 Eprüvasyon Denemeleri

Aşılanan balıklarda oluşan bağışıklığın tespitine geçmeden önce, test yapılacak balık popülasyonunda % 60 mortaliteye neden olan bakteri sayısı (LD_{60}) belirlendi. LD_{60} dozunun belirlenmesinde her bir bakteri için (10^5, 10^7 ve10^9 cfu/ml) miktarında inokulum periton içi (i.p.) yolla ortalama ağırlığı 15-20 g (enjeksiyon aşı) olan gökkuşağı alabalıklarına periton içi enjekte edildi. Denemelerde her bir grupta 30'ar balık olacak şekilde bir denemede toplam 90 balık kullanıldı. Çalışmada aşı bileşenlerini oluşturan 5 farklı etkenin (*Y. ruckeri* O1 BT1; *Y. ruckeri O1* BT2; *V. anguillarum* O1, *L. garvieae* ve *L. petauri*) her biri için LD_{60} dozu belirlendi ve deney

planı Tablo 7'de verildi.

Tablo 7. Eprüvasyon Deneylerinde Kullanılan Suşlarının LD60 Dozlarının (cfu/mL) Belirlenmesi Deney Planı

Deney Grupları	Balık Türü	Uygulama Yolu	Uygulama Dozu (cfu/ml)	Balık Ağırlığı	Balık Sayısı	Deney Süresi	Tekrar sayısı
Y. ruckeri O1 BT1	Alabalık	Periton içi	10^5	15-20 g	30	21 gün	2
			10^7		30		
			10^9		30		
Y. ruckeri O1 BT1	Alabalık	Periton içi	10^5	15-20 g	30	21 gün	2
			10^7		30		
			10^9		30		
L. garvieae	Alabalık	Periton içi	10^5	15-20 g	30	21 gün	2
			10^7		30		
			10^9		30		
L. petauri	Alabalık	Periton içi	10^5	15-20 g	30	21 gün	2
			10^7		30		
			10^9		30		
V.anguillarum O1	Alabalık	Periton içi	10^5	15-20 g	30	21 gün	2
			10^7		30		
			10^9		30		
Değerlendirme ve Sonuç	LD_{60} dozlarının belirlenmesi sırasında toplam 900 balık kullanıldı.						

İmmersion ve enjeksiyon aşılarla aşılanan balık grupları 30'ar adetlik 3 tekerrürlü gruplar halinde denemeye alındı. Aşısız (kontrol) gruplarında ise tekerrür kullanılmadı. Eprüvasyon uygulanan balıklar Cardella ve Eimers (1994)'in önerdiği gibi 21 gün boyunca izlendi, ölen balıkların iç organlarından reizolasyon için ekimler yapıldı. Böbreklerinden *Y. ruckeri, V. anguillarum, L. garvieae, L. petauri* izole edilen balıklar spesifik mortalite olarak kaydedildi (Johnson ve Amend, 1983a, 1983b; Erdal, 1989, Gudding vd., 2014, European Pharmacopoeıa 11.0, 01/2022:1581 Vıbrıosıs Vaccıne (Inactıvated) For Salmonids; European Pharmacopoeıa 11.0, 01/2022:1950 Yersiniosis Vaccıne (Inactıvated) For Salmonids).

3.2.5.4.2 Aşıların Uygulanması

Y. ruckeri (Yr), V. anguillarum (Va), L. garvieae (Lg) suşlarından üretilen prototip aşılar kullanıldı. Prototip monovalan inaktif emülsiyon banyo aşılar (5 L Yr, 5 L Va, monovalan/kombine) 1:10 oranında sulandırılarak 1 dk süreyle banyo yaptırılmak suretiyle, inaktif polivalan emülsiyon enjeksiyon aşı (5 litre YrBT1+TrBT2+Va+Lg+Lp) ise i.p. olarak 0.1 ml dozda enjekte edilerek aşılama yapıldı (Johnson ve Amend, 1983; Amend vd., 1983; Tatner ve Horne, 1985; Altun, 2001). Aşı denemelerinde kullanılan balıklara ilişkin deney planı Tablo 8-11' de verildi.

Tablo 8. Gökkuşağı Alabalığı (GA) *Y. ruckeri* (BT1 ve BT2) İnaktif Bivalan Emülsiyon Daldırma ve Enjeksiyon Aşı (Yr O1 Bivalan Daldırma/Enjeksiyon Aşı) Etkinlik Testleri Deney Planı

Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı	Balık Sayısı		Deney Süresi	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
Yr O1 Bivalan Daldırma aşı Yr O1 BT1 Eprüvasyon¥	GA	Daldırma**	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
Yr O1 Bivalan Daldırma aşı Yr O1 BT2 Eprüvasyon¥	GA	Daldırma**	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
Yr O1 Bivalan Enjeksiyon aşı Yr O1 BT1 Eprüvasyon¥	GA	Enjeksiyon***	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
Yr O1 Bivalan Enjeksiyon aşı Yr O1 BT2 Eprüvasyon¥	GA	Enjeksiyon***	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
Değerlendirme ve Sonuç	*:Deney gruplarında deneme üç tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmadı. **: İmmersion aşının etkinlik testleri için balıklar belirtilen doz ve sürede aşı uygulamasına maruz bırakıldıktan sonra her bir aşı grubunda yer alan 45'er balık 21 gün süreyle izlendi. *** : Enjeksiyon aşının etkinlik testleri için balıklar belirtilen doz ve yöntemle aşı uygulamasına maruz birakıldıktan sonra her bir deney grubunda yer alan 45'er adet balık 21 gün süre ile gözlemlendi. ¥: Eprüvasyon; Aşılama yapılan tüm balık grupları aşılamadan 28 gün sonra, aşının bileşenlerini oluşturan her bir ana tohum suşunun						

	balıklar üzerindeki etkinliğini belirlemek için, heterolog çalışma tohum suşları, ile (i.p. yolla enjekte edilerek) test edidi (eprüvasyon). Yr O1 BT1-BT2 bivalan banyo ve enjeksiyon aşıların etkinlik deneylerinde toplam 720 balık kullanıldı.

Tablo 9. Gökkuşağı Alabalığı *V. anguillarum* O1 İnaktif Emülsiyon Daldırma/Enjeksiyon Aşı Etkinlik Testleri Deney Planı

Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı	Balık Sayısı		Deney Süresi	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
Va O1 Daldırma aşı Va O1 Eprüvasyon¥	GA	Daldırma**	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
Va O1 Enjeksiyon aşı Va O1 Eprüvasyon¥	Alabalık	Enjeksiyon**	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
Değerlendirme ve Sonuç	*:Deney gruplarında deneme üç tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmadı. **: İmmersion aşının etkinlik testleri için balıklar belirtilen doz ve sürede aşı uygulamasına maruz bırakıldıktan sonra her bir deney grubunda yer alan 45'er adet balık 21 gün süreyle izlendi. **: Enjeksiyon aşının etkinlik testleri için balıklar belirtilen doz ve yöntemle aşı uygulamasına maruz birakıldıktan sonra her bir deney grubunda yer alan 45'er adet balık 21 gün süre ile gözlemlendi. ¥: Eprüvasyon; Aşılama yapılan tüm balık grupları aşılamadan 28 gün sonra, aşının bileşenlerini oluşturan her bir ana tohum suşunun balıklar üzerindeki etkinliğini belirlemek için, heterolog çalışma tohum suşları, ile (i.p. yolla enjekte edilerek) test edidi (eprüvasyon). Va O1 banyo ve enjeksiyon aşıların etkinlik deneylerinde toplam 180 balık kullanıldı.						

Tablo 10. Gökkuşağı Alabalığı *L. garvieae* ve *L. petauri* İnaktif Bivalan Enjeksiyon Emülsiyon Aşı (Bivalan Enjeksiyon Aşı) Etkinlik Testler Deney Planı

Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı	Balık Sayısı		Deney Süresi	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
Lg-Lp Bivalan Enjeksiyon aşı Lg Eprüvasyon¥	GA	Enjeksiyon **	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
Lg-Lp Bivalan Enjeksiyon aşı Lp Eprüvasyon¥	GA	Enjeksiyon **	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
Değerlendirme ve Sonuç	*:Deney gruplarında deneme üç tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmadı. **: Lg-Lp bivalan enjeksiyon aşının etkinlik testleri için balıklar belirtilen doz ve yöntemle aşı uygulamasına maruz birakıldıktan sonra her bir grupta yer alan 45'er adet balık 21 gün süre ile gözlemlendi. ¥: Eprüvasyon; Aşılama yapılan tüm balık grupları aşılamadan 28 gün sonra, aşının bileşenlerini oluşturan her bir ana tohum suşunun balıklar üzerindeki etkinliğini belirlemek için, heterolog çalışma tohum suşları, ile (i.p. yolla enjekte edilerek) test edidi (eprüvasyon). Lg-Lp bivalan banyo ve enjeksiyon aşıların etkinlik deneylerinde toplam 360 balık kullanıldı..							

Tablo 11. Gökkuşağı Alabalığı *Y. ruckeri* O1 BT1, *Y. ruckeri* O1 BT2, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* O1 İnaktif Beşli Kombine Konsante Emülsiyon Enjeksiyon Aşı (YLV5 ICIEV) Etkinlik (Potens) Testleri Deney Planı

Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı	Balık Sayısı		Deney Süresi	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
YLV5 ICIEV Aşı Yr O1 BT1 Eprüvasyon¥	GA	Enjeksiyon**	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
YLV5 ICIEV Aşı Yr O1 BT2 Eprüvasyon¥	GA	Enjeksiyon**	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
YLV5 ICIEV Aşı Lg Eprüvasyon¥	GA	Enjeksiyon**	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3

YLV5 ICIEV Aşı Lp Eprüvasyon¥	GA	Enjeksiyon**	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
YLV5 ICIEV Aşı Va O1 Eprüvasyon	GA	Enjeksiyon**	15-20 g	45 +45+45	45	21 gün	3
Değerlendirme ve Sonuç	* : Deney gruplarında deneme üç tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmadı. **: YLV5 ICIEV aşının etkinlik testleri için balıklar belirtilen doz ve yöntemle aşı uygulamasına maruz birakıldıktan sonra her bir deney grubunda yer alan 45'er adet balık 21 gün süre ile gözlemlendi ¥: Eprüvasyon; Aşılama yapılan tüm balık grupları aşılamadan 28 gün sonra, aşının bileşenlerini oluşturan her bir ana tohum suşunun balıklar üzerindeki etkinliğini belirlemek için, heterolog çalışma tohum suşları, ile (i.p. yolla enjekte edilerek) test edidi (eprüvasyon). İnaktif Beşli Kombine enjeksiyon aşının etkinlik testlerinde toplam 900 balık kullanıldı.						

3.2.6 Bağışıklığın Değerlendirilmesi

Aşının sağladığı bağışıklık, nispi hayatta kalma yüzdesi (RPS) temel alınarak değerlendirildi (Amend, 1981; (European Pharmacopoeıa 11.0, 01/2022:1581 Vıbrıosıs Vaccıne (Inactıvated) For Salmonids; European Pharmacopoeıa 11.0, 01/2022:1950 Yersiniosis Vaccıne (Inactıvated) For Salmonids).

$$RPS = \left(1 - \frac{\text{Aşılılardaki ölüm miktarı \%}}{\text{Aşısızlardaki ölüm miktarı \%}}\right) \times 100$$

3.2.7 İnaktif Aşılarda Etkinlik Kabul Kriterleri

Y. ruckeri'ye karşı üretilecek inaktif emülsiyon banyo (daldırma) aşıda %60, inaktif emülsiyon enjeksiyon aşıda %85 hayatta kalma(RPS); diğer üretilecek aşılarda (*V. anguillarum, L. garvieae*) ise inaktif emülsiyon daldırma aşıda %60 ve inaktif emülsiyon enjeksiyon aşıda %75 hayatta kalma (RPS)'in üzerinde elde edilecek koruma başarı ölçütü olarak belirlendi (Inactıvated) For Salmonids; European Pharmacopoeıa 11.0, 01/2022:1950 Yersiniosis Vaccıne (Inactıvated) For Salmonids).

3.2.8 İnaktif Aşılarda Saha Etkinlik Araştırılması

Laboratuvar etkinlik testlerinden sonra en etkili olan aşı formulasyonu, ticari Alabalık

işletmelerinde saha şartlarında işletmeye özel aşılama programları doğrultusunda aşı denemelerine tabi tutulacaktır. Aşılama sonrasında 4. Saat, 2. , 7. ve 14. günlerde balık dokularındaki immun gen ekspresyon düzeyleri belirlenerek, balıklarda immun sistemin etkinliği takip edildi. Daha sonra ise aşılanan balıklar pazar boyuna ulaşıncaya kadar aşıların koruma süreleri izlendi (Inactıvated) For Salmonids; European Pharmacopoeıa 11.0, 01/2022:1950 Yersiniosis Vaccıne (Inactıvated) For Salmonids).

3.2.9 qPCR ile Dokuda İmmun gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

3.2.9.1 RNA izolasyonu ve cDNA Sentezi

Üretici firmanın protokolüne uygun olarak her bir dokudan 30-40 mg örnek alınarak TRI reagent (Sigma, Almanya) kullanarak RNA izolasyonu yapılacaktır. İzolasyondan sonra RNA pelleti 30 µL nuclease-free su ile dilüe edilerek nanodrop spektrofotometre ile konsantrasyonları belirlendi. Elde edilen RNA kalitesini belirlemek için agaroz jelde yürütülerek kontrol edildikten sonra çalışmalarda kullanılmak üzere -70ºC'de saklandı. RNA'lardan cDNA hazırlamak için high-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda uygulandı. cDNA sentezi için 10 µl 2X RT master mix (10X RT buffer, 25X dNTP Mix 100 mM, 10XRT Random Primers ve oligo-dT mix, Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, nuclease-free su) ve 10 µl RNA eklenerek 25°C'de 10 dakika, ardından 37°C'de 2 saat inkübe edilecek ve son olarak reaksiyon 85°C'de 5 dakika sürdürülerek döngü sonlandırıldı ve cDNA Sentezi tamamlandı. Hazırlanan cDNA'lar kullanılmak üzere -70°C'de muhafaza edildi (Hoare vd., 2017).

3.2.9.2 Eş Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)

RT-qPCR ile aşılama sonrası 4. saat, 2. ve 7. günlerde alınan doku örneklerinde (solungaç, bağırsağın son kısmı, ön böbrek ve dalak) immun gen ve sitokinlerin (*IgT, IgM, CD4-1, CD8α, IL-1β, IL-8, IL-10, C3, IFN-γ, TLR-2*) expresyonlarına bakılacaktır. RT-qPCR analizinde SYBR® Green I (Thermo Scientific) master mix ve proje başvuru dosyasında belirtilen spesifik primerler kullanıldı. Kısaca amplifikasyon için, 10 µl SYBR® Green I master mix, 3 µl of nuclease free su,1 µl forward ve reverse primerleri (0.3 µM), 5 µl template cDNA (0.5ng) karışımından 20 µl hacminde master mix oluşturuldu. Oluşturulan karışım RotorGene (Qiagene, Almanya) cihazında 95°C'de 15 sn ön denatürasyonu takiben 95°C'de 30 sn denatürasyon, her bir immun gen ve sitokin primerleri için optimal sıcaklıkta 30 sn primer bağlanma ve 72 C'de 120 saniye uzama olmak üzere 40 siklus yapılarak amplifikasyon tamamlandı. Amplifikasyondan sonra 1:5'den başlayacak şekilde nükleazfree su ile seri dilüsyonlar yapılarak ve eşik döngüsü (Ct) değerleri belirlendi. Standart eğrinin kalitesi, Q-Rex Softwareyazılımı ile eğrinin eğimi ve korelasyon katsayısı (r) baz alınarak değerlendirildi.

Ekspresyonunun sonuçları $2^{-\Delta\Delta}$ Ct yöntemi kullanılarak analiz edildi Referans genler (elongation factor-α ve β-aktin) baz alınarak; aşılanmış balıkların gen ekspersyonları ile kontrol grubu balıkların gen ekspersyon verileri karşılaştırılarak normalize edildi. (Chettri vd., 2012, Hoare vd., 2017, Dixon vd., 2018).

3.2.10 İstatistiksel analizler

Virulens, $LD6_0$ doz ve Aşı etkinlik testlerinde eprüvasyondan sonra gökkuşağı alabalığının hayatta kalma oranını tahmin etmek için Kaplan-Meier analizi, deney grupları arasındaki farklılıkları belirlemek için ise Mantel-Cox (log-rank) testi uygulandı. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS Statistics yazılımı (Sürüm 20; IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR (qPCR) analizleri, Rotor-Gene Q cihazı (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon döngüsüne ait Cycle threshold (Ct) değerleri ile Melt Curve (eritme eğrisi) analizleri, Rotor-Gene Q Series Software (Sürüm 2.3.5; Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen Ct değerleri, gen ekspresyon düzeylerinin nicel karşılaştırmalı analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplanmış ve yorumlanmıştır (Livak & Schmittgen, 2001).

4. BULGULAR

4.1 Pilot İşletmeler

Proje kapsamında İç Anadolu ve Batı Karadeniz Bölgelerinde pilot işletme olarak belirlenen ve sırasıyla A ve B İşletmeleri olarak isimlendirilen işletmelerde bir yıl süreyle aylık olarak (Mart 2022-Şubat 2023) bakteriyolojik örneklemeler yapıldı ve su kalitesi (çözünmüş O_2 (ÇO), su sıcaklığı (sT), pH) parametreleri belirlendi.

A İşletmesinin Özellikleri

A İşletmesi farklı lokasyonda yer alan ve AY(kafes tesisi), AK (kuluçkahane tesisi) ve AS (kafes tesisi) olarak isimlendirilen 3 farklı tesiste Gökkuşağı alabalığı üretimi yapmaktadır. AK tesisi 60 milyon adet/yıl kapasitede yumurta üreten bir kuluçkahanedir. Bu tesis, kuluçkahaneye 3 km mesafede uzaklıkta yer alan bir kaynak suyu kullanmaktadır. AY tesisi bölgede yer alan bir barajda kurulan kafeslerde (20 m çap) 1.9 bin ton/yıl üretim kapasitesine sahiptir. AS tesisi ise aynı bölgedeki farklı bir barajda kurulan ağ kafeslerde (20 m çap) yaklaşık 4 bin ton/yıl kapasitede üretim yapabilmektedir.

B İşletmesinin Özellikleri

B İşletmesinde 2 milyon adet/yıl yumurta kuluçkalamakta ve 500 ton/yıl kapasitede büyük alabalık (Türk somonu) üretilmektedir. Bu işletmenin kuluçkahanesinde artezyen suyu kullanılmakta olup, üretim havuzlarında artezyen suyun yansıra ihtiyaç duyulan dönemlerde

dere suyu kullanılmaktadır. B işletmesinde kullanılan artezyen suyun su sıcaklığı (sT) ve çözünmüş oksijen (ÇO) değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. B İşletmesinde her bir havuzun, havuz su girişinden çözünmüş oksijen seviyesinin 7 mg/L'nin altına düşmemesi için sıvı O_2 takviyesi yapılmaktadır. Örnekleme periyodunda A ve B İşletmelerinde ölçülen su kalitesi parametreleri Tablo 12'de verildi.

Tablo 12. Proje kapsamında örnekleme yapılan pilot işletme ve/veye tesislere ait su sıcaklık (sT) ve çözünmüş O2 (ÇO) değerleri

İşletme	**A İşletmesi**						**B İşletmesi**	
	AY Tesisi		**AK Tesisi**		**AS Tesisi**			
Su Kalitesi Parametreleri	**sT** (°C)	**ÇO** (mg/lt)	**sT** (°C)	**ÇO** (mg/lt)	**sT** (°C)	**ÇO** (mg/lt)	**sT** (°C)	**ÇO** (mg/lt)
2022-Mart	5,5	8,97	8,1	8,5	7,3	10,0	12,21	8,2
2022-Nisan	9,3	13	11,5	9	10	10,5	13,35	7,1
2022-Mayıs	15,2	10,96	15	9	14	10,0	14,46	7,5
2022-Haziran	22	8,63	17	9	15	8,3	14,87	7,2
2022-Temmuz	-	-	14	9,5	16	8,3	15,28	6.9
2022-Ağustos	-	-	13	10,5	18,5	8,1	15,79	6,7
2022-Eylül	-	-	13	9	18,0	8.9	15,56	7,1
2022-Ekim	17	8,75	13	9	15,7	6,5	14,51	7,2
2022-Kasım	15	9,39	11	8,5	13,5	6,5	13,59	7,1
2022-Aralık	9	9,87	10	8,5	11,4	8,0	13.12	7,6
2023-Ocak	7,1	10,5	9.2	8,5	9,4	8,2	7,51*	8,1
2023-Şubat	6.2	9,57	8	8,5	6,6	9,5	12,78	8,7

4.2 Bakteriyel İzolasyon Sonuçları

4.2.1 Fenotipik Testler ve MALDI TOF MS (Bruker) İdentifikasyon

Proje kapsamında pilot işletme olarak belirlenen A ve B gökkuşağı alabalığı işletmelerine ait farklı üretim ve kuluçkahane tesislerinden 12 aylık periyotta gerçekleştirilen örnekleme çalışmaları sonucunda izolasyonları yapılan bakteriyel izolatlar Gram boyama, hareket, oksidaz, katalaz, O/F, O/129, fleksirubin pigment vb. fenotipik testlerle ön tanımlanları yapıldı. Daha sonra MALDI TOF MS tanımlama skoru ≥2 olan 40 farklı türe ait toplam 399 izolat tespit edildi ve tespit edilen bu türlerin yüzde dağılımları Tablo 13'de verildi.

Tablo 13. Pilot İşletmelerde MALDI TOF MS ile Tanımlanan Bakteri Türlerinin Dağılımı

Bakteri Türü	Farklı ağırlıktaki balıklardan izole edilen izolat Sayısı	Aynı boydaki balıklardan aynı dönemde izole edilen toplam izolat sayısı	Bakteri türlerinin dağılım yüzdesi (%)
A. bestiarum	2	9	2,2556391
A. caviae	1	2	0,50125313
A. eucrenophila	3	12	3,0075188
A. hydrophila	3	6	1,5037594
A. media	2	7	1,75438596
A. salmonicida	3	6	1,5037594
A. sobria	25	44	11,0275689
A. veronii	1	10	2,50626566
C. balastinum	1	1	0,25062657
C. greenlandense	1	1	0,25062657
C. piscium	1	2	0,50125313
C. scophthalmum	1	1	0,25062657
Chryseobacterium spp.	1	5	1,25313283
F. onchorynchi	1	1	0,25062657
F. psychrophilum	16	36	9,02255639
F. saccharophilum	1	1	0,25062657
F. sinopsychrotolerans	1	1	0,25062657
F. spartansii	1	1	0,25062657
Flavobacterium spp.	2	3	0,7518797
L. garvieae	26	123	30,8270677
Listonella anguillarum	1	3	0,7518797
P. antarctica	1	1	0,25062657
P. anguilliseptica	1	1	0,25062657
P. corrugata	2	2	0,50125313
P. extremorientalis	1	1	0,25062657
P. fluorescens	5	9	2,2556391
P. gessardii	4	8	2,00501253
P. iridis	2	5	1,25313283
P. grimontii	1	3	0,7518797
P. koreensis	7	10	2,50626566
P. luteola	1	1	0,25062657

P. marginalis	1	2	0,50125313
P. migulae	1	1	0,25062657
P. mucoides	1	3	0,7518797
P. neuropathica	1	1	0,25062657
P. putida	2	2	0,50125313
P. synxantha	2	3	0,7518797
S. baltica	2	9	2,2556391
V. salmoninarum	7	7	1,75438596
Y. ruckeri	18	55	13,7844612
Toplam izolat sayısı	154	399	*100*

İzolatların tür dağılımları incelendiğinde ise, öne çıkan türler ise Tablo 14'de sunulmuştur.

Tablo 14. Gökkuşağı Alabalığı İşletmelerinde Yaygın Olan Bakteriyel Etkenler

Bakteri Türü	**İzolat Sayısı**	**Toplamdaki Yüzdesi**
L. garvieae/petauri	123	**%30,82**
Y. ruckeri	55	%13,78
Aeromonas sobria	44	%11,02
F. psychrophilum	36	%9,02

En fazla tespit edilen etken olan *L. petauri*, başta AS ve AY kafes tesisleri olmak üzere, yüksek su sıcaklık aralığında (14,9–18,5 °C) izole edildi. Bu durum, bu türün yüksek çevresel toleransa sahip olduğunu ve farklı üretim basamaklarında enfeksiyon oluşturma potansiyeli gösterdiğini ortaya koydu.

Tanımlanan bakteriyel izolatlar, balıkların klinik bulguları, izolasyon yapıldığı dönemler, balık ağırlıkları ve çevresel su parametreleri ile birlikte bütüncül olarak değerlendirildi. Gökkuşağı alabalığı işletmelerinde (A ve B) tespit edilen 9 farklı genusa ait (*Aeromonas, Chryseobacterium, Flavobacterium, Lactococcus, Listonella, Pseudomonas, Shewanella, Vagococcus* ve *Yersinia*) 40 farklı bakteri türü içinden en yaygın olanın, , *L. garvieae* (n=123) olduğu, onu sırasıyla, *Y. ruckeri* (n=55), *A. sobria* (n=44) ve *F. psychrophilum*'un (n=36) izlediği belirlendi. En yaygın izole edilen *L. garvieae*'nin genel olarak 16 °C ve daha yüksek su sıcaklıklarda izole edildiği, *F. psychrophilum* 'un ise daha düşük sıcaklıklarda (7,2 °C) ortaya çıktığı tespit edildi.

Her iki işletmede de hastalık çıkış dönemlerinin genellikle su sıcaklıklarının değişim gösterdiği bahar aylarına denk geldiği saptandı. Bu dönemlerde stres nedeniyle balıkların bağışıklık

sisteminin baskılandığı ve hastalık etkenlerine karşı daha duyarlı hale geldiği gözlemlendi. Özellikle yavru ve genç (0,1–20 g) balıklarda izolat yoğunluğunun daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu bulgular, bağışıklık sisteminin henüz tam olarak gelişmediği yavru balıkların enfeksiyonlara daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Örnekleme yapılan işletmelerde ayrıca ülkemizde bildirimi yapılmamış olası yeni bakteriyel türler de identifiye edildi. Bu türlerin tanımlamaları MALDI-TOF MS sisteminin yanı sıra filogenetik analizlerle desteklendi. Pilot işletme olarak belirlenen gökkuşağı alabalığı işletmelerinde aylık olarak yapılan örnekleme çalışmalarında tespit edilen bakteriyel etkenlere yönelik etkili antimikrobiyal ajanlar belirlendi ve her örnekleme dönemine ait tedavi ve yöntemleri aylık olarak rapor düzenlenerek işletme yetkililerine gönderildi. Aylık olarak gerçekleştirilen örnekleme çalışmaları sonucunda,

her bir işletmede tespit edilen fırsatçı etkenler (*Aeromonas* spp, *Pseudomonas* spp, vb*)*,

obligat *(L. petauri, Y. ruckeri* vb.) patojenlerin ortaya çıkışında rol oynayan hazırlayıcı faktörler (kötü su kalitesi , balık nakli vb.),

- hastalıkların kontrolüne yönelik aşılama program/programları,
- akılcı antimikrobiyal kullanımı ve antibiyotik kullanımın azaltılması
- yönelik ayrıntılı teknik rapor hazırlandı. A işletmesinde 21 Mart-22 Mart 2023, B işletmesi 23 Mart 2023 tarihinde işletme sahipleri ve sorumlu müdülerine ayrıntılı sunum yapıldı. Bu sunumlarda her işletme/tesise özel olarak hazırlanan **"** Gökkuşağı Alabalığı İşletmelerinde Bakteriyel Hastalıkların Kontrolü ve Akılcı Antimikrobiyal Kullanımı" konusunda interaktif olarak eğitim verildi (Ek dosya 1).

Sonuç olarak, proje kapsamında izolasyon çalışmalarında tanımlanan bakteriyel patojenlerin mevsimsel dağılımları, balık ağırlığı ve su sıcaklığı ilişkileri, bütüncül olarak değerlendirildi,

Bu verilerden hareketle işletmelere özel olarak, kontrol, aşılama programları ve akılcı antimikrobiyal kullanımına ilişkin eğitimler verildi.

4.2.1.1 MALDI-TOF MS (Bruker) İdentifikasyon ve Yerel Veri Kütüphanesi Oluşturulması

Proje kapsamında, Türkiye'de kültür balıkçılığı açısından önemli olan ve birçoğu literatürde bildirilmemiş olan bakteriyel patojenlere yönelik **ulusal düzeyde ilk kapsamlı MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry)** tabanlı **yerel veri kütüphanesi** oluşturuldu. Bu veri kütüphanesi ile:

- Balık patojenlerinin **hızlı, maliyet-etkin ve güvenilir şekilde tanımlanması**,
- Türkiye kökenli izolatların **MALDI-TOF sistemine dahil edilmesi**,
- Türkiyeden izole edilen uluslararası yeni bakteriyel türlerin tanımlanması ve **filogenetik doğrulamalarının yapılması** amaçlandı.

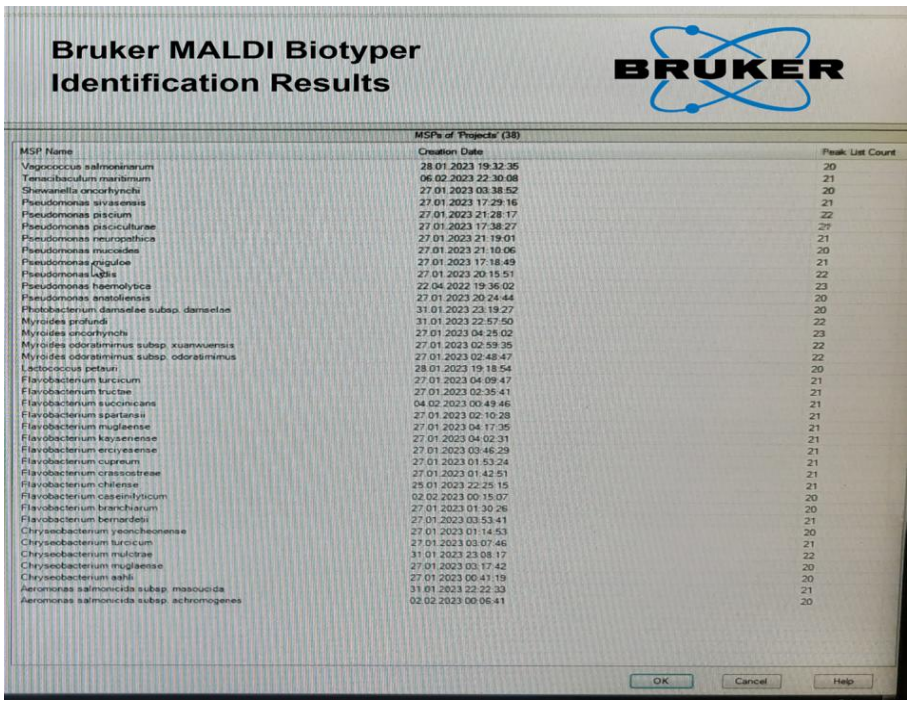
Mart 2022- Şubat 2022 tarihleri arasında 12 aylık süre boyunca A işletmesine ait 3 tesis (AY, AK, AS) ve B işletmesinde bakteriyel izolasyon yapıldı. İzole edilen tüm bakteriyel etken ve bu etkenlere ait izotların formik asit ekstraksiyonu ile MALDI TOF MS identifikasyon sonuçları ve identifikasyon skorları Ek dosya 2'de sunuldu. MALDI-TOF veri kütüphanesinde yer alan türlere ait m/z değerleri, UniProtKB/Swiss-Prot ve UniProtKB/TrEMBL veritabanları kullanılarak, akuatik bakterilerin türe özgü ve karakteristik protein spektrumları ile karşılaştırıldı (Expasy, SIB Swiss Institute of Bioinfomatics). Protein Spektrumları karşılaştırılması BioTyper yazılımı (V. 3.1, Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanılarak yapıldı. Bakteriyel tür tanımlaması, standart veri tabanıyla eşleştirilmek suretiyle gerçekleştirildi. Tanımlama sonrası elde edilen identifikasyon eşleşmesi (skor değeri) 2'den büyük ise tür düzeyinde tanımlama güvenilir kabul edildi, eğer 2'den küçük ise tanımlamanın güvenilir olmadığı değerlendirildi.Veri işlemede ise, IBM SPSS Statistics (V. 22) ve Mass-Up yazılımı kullanıldı. Küme (Cluster) analizi ve benzerlik katsayıları, bant tabanlı (Jaccard) eşleşmeler ve eğri tabanlı (Pearson Ürün hareket Korelasyon Katsayısı, PPMCC) skorlar temel alınarak belirlendi Balıklarda olası hastalık etkeni olarak belirlenen ve Tablo 14'de verilen bakteriyel etkenlerin sekans analizleri ile doğrulamaları yapıldı ve filogenetik ağaçları ek dosya 3'de sunuldu. Yapılan filogenetik analizlerde proje çalışmasında tespit edilen *A. bestiarum* izolatının filogenetik analizinde, *A. salmonicida subps. smithia, A. salmonicida subsp. masoucida, A. salmonicida subsp. achromogenes, A. bestiarum* ve *A. piscicola* ile yakın benzerlik gösterdiği belirlendi. Ayrıca *A. salmonicida, A. sobria, A. caviae, A. eucrenophila, A. hydrophila, A. media, A. salmonicida, A. sobria* ve *A. veronii*'nin aynı türe ait referans/tip suşlarla yakın genetik benzerlik gösterdiği görüldü. MALDI TOF MS analizi ile *Chryseobacterium* sp. olarak tanımlanan etkenin filogenetik analizinde, C. piscium olarak identifiye edildiği ve *C. balastinum, C. greenlandense*, *C. piscium* ve *C. scophthalmum* türlerine ait referans/tip suşlarla yakın genetik benzerlik gösterdiği belirlendi. *F. onchorynchi, F. psychrophilum, F. saccharophilum* ve *F. sinopsychrotolerans* türlerinin filogenetik analizinde aynı türe ait referans/tip suşlarla yakın genetik benzerlik sergilediği tespit edildi. *L. garvieae* türüne yönelik olarak yapılan filogenetik analizde, referans/tip suşlar ve *L. petauri* ile yakın genetik benzerlik gösterdiği saptandı (Ek dosya 3). *Listonella* (Vibrio) *anguillarum*, *Vagococcus salmoninarum* ve *Y. ruckeri* izolatının filogenetik analizinde her bir türe ait referans/tip suşlarla çok yakın filogenetik ilişki gösterdiği tespit edildi. Proje çalışmasında izole edilen izolatlar arasında en yaygın genusun *Pseudomonas* genusu olduğu belirlendi. Bu genus içerisinde *P. antarctica, P. anguilliseptica, P. corrugata, P. extremorientalis, P. fluorescens, P. gessardii, P. iridis, P. grimontii, P. koreensis, P. luteola, P. marginalis, P. migulae, P. mucoides, P. neuropathica, P. putida* türlerinin, kendi türüne ait referans ve/veya tip suşlarla aynı genogrupta yer aldığı belirlendi (Ek dosya 3).

MALDITOF MS veri kütüphanesinde yer almayan *L. petauri, V. salmoninarum, A. salmonicida subsp. salmonicida, A. salmonicida subsp. masoucida, A. salmonicida subsp. achromogenes, Photobacterium damselae subsp. damselae ve Tenacibaculum maritimum* gibi kültür balıkçılığı açısından önemli 7 tür/alt türün bu çalışmada yerel veri kütüphanesine kayıtları tamamlandı. Ayrıca *Pseudomonas* genusunda yer alan*, P. miguloe, P. haemolytica, P. iridis, P. arcuscaelestis, P. mucoides, P. neurophathica, P. piscium, P. sivasensis, P. pisciculturae, P. anatoliensis*;

Flavobacterium genusunda yer alan *F. erciyesense, F. bernardetii, F. kayseriense, F. turcicum, F. muglaense, F. branchiarum, F. chilense, F. crassostreae, F. cupreum, F. spartansii, F. tructae, F. caseinilyticum ve F. succinians*;

Chryseobacterium genusunda yer alan *C. turcicum, C. mulctrae, C. muglaense ve C. scophthalmum*;

Myroides genusunda yer alan *M. oncorhynchi, M. odoratimimus, M. profundi, M. odoratimimus subsp. xuanwuensisi* ve *M. odoratimimus subsp. odoratimimus* olmak üzere toplam 32 farklı türün de kayıtları da başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Kayıtları yapılmış olan tür/tip suşların MALDI TOF MS identifikasyon skorları ve tür kaydı ekran görüntü/görüntüleri Şekil 1'de verildi.



Şekil 1. Bruker kütüphanesine kaydı yapılan izolatların kayıt tarihleri ve skorları

MALDI TOF MS yerel veri kütüphanesine kaydedilen her bir türün protein profilleri ile, MALDI TOF MS sisteminde kayıtlı protein profillerinin karşılaştırılmaları yapılarak filogenetik ilişkileri

incelendi. İnceleme sonucunda kayıtları yapılan her bir türün, yer aldığı genus içerisindeki diğer türler ile yakınlık ilişkilerini ortaya koyan dendrogramlar oluşturuldu (Ek dosya 4.).

Bu proje kapsamında oluşturulan MALDI TOF MS (Bruker) yerel veri kütüphanesinde kayıtlı olan 9 farklı genusa ait 39 türün, Bruker veri kütüphanesinde yer alan diğer türlerle filogenetik ilişkilerinin karşılaştırılması (Ek Dosya 4.) ile elde edilen sonuçlar aşağıda özetlendi.

1. Yapılan filogenetik analizlerde Bruker sistemine kaydedilen *L. petauri* izolatlarının, *L. garvieae* izolatları ile yüksek protein benzerliğine sahip olduğu,
2. Bruker'e kayıtlı *V. salmoninarum* izolatlarının, ülkemizden izole edilmiş olan *V. salmoninarum* izolatları ile yakın ilişki gösterdiği, ancak kayıtlı olan diğer *Vagococcus* türleri ile uzak filogenetik ilişki gösterdiği,
3. Yeni tür olarak kaydı yapılan *Pseudomonas* tip suşların, yedi farklı filogenetik grupa ayrıldığı, P*. miguloe, P. haemolytica, P. iridis, P. arcuscaelestis, P. mucoides, P. neurophathica, P. piscium* türlerinin Bruker veri kütüphanesinde yer alan diğer *Pseudomonas* türleri ile uzak bir ilişkiye sahip olduğu, *P. sivasensis, P. pisciculturae, P. anatoliensis* türlerinin ise Bruker veri kütüphanesinde yer alan *P. gessardii* ve *P. brenneri* türleri ile yakın filogenetik ilişkiye sahip olduğu,
4. Bruker veri tabanında beş farklı filogenetik gruba ayrılan *Chryseobacterium* türleri ile yerel veri kütüphaneye eklenen ***C. turcicum, C. mulctrae ve C. muglaense*** türlerinin *C. scophthalmum* türleri arasında yakın bir ilişki görüldüğü, ancak ***C. yeoncheonense*** *ve* ***C. aahli*** türleri ile çok uzak ilişkili olduğu,
5. Yerel veri kütüphanesine kaydedilen *Shewanella oncorhynchi* izolatının Bruker veri tabanında yer alan *S. glacialipiscicola* türü ile yakın filogenetik ilişki gösterdiği
6. Yerel veri kütüphanesine kaydedilen *Flavobacterium* tip suşlardan olan *F. erciyesense, F. bernardetii, F. kayseriense, F. turcicum, F. muglaense, F. branchiarum, F. chilense, F. crassostreae, F. cupreum, F. spartansii, F. tructae, F. caseinilyticum ve F. succinians* türlerinin, Bruker veri kütüphenisinde yer alan diğer *Flavobacterium* türleri ile yakın **ilişkili olmadığı**,
7. Yerel veri kütüphanesinde yer alan Myroides tip suşların, iki farklı filogenetik gruba ayrıldığı, tip suşlardan *M. oncorhynchi* izolatı ile,*M. odoratimimus ve M. profundi* türlerinin uzak ilişkili olduğu; yerel veri kütüphanesine kayıtları yapılan *M. odoratimimus subsp. xuanwuensis, M. profundi* ve M. odoratimimus subsp. odoratimimus türlerinin ise birbirleriyle yakın ilişkli olduğu,
8. Yerel veri kütüphanesine kaydedilen *A. salmonicida subsp. salmonicida, A. salmonicida subsp. masoucida* ve *A. salmonicida subsp. achromogenes* türlerinin yerel veri kütüphanesinde kayıtlı *Aeromonas* sp. türü ile yakın ilişkili olduğu,

9. *Photobacterium damselae subsp. damselae* standart suşun yerel veri kütüphanesine kaydı yapıldıktan sonra *P. damselae subsp. piscicida suşu* ile yapılan filogenetik analizde bu iki tür/alttürün aynı filogenetik grupta yer aldığı,.ve bu iki tür/alttürün birbiriyle %100 ilişkili olduğu,
10. Yerel veri kütüphanesinde yer alan *Tenacibaculum maritimum* suşunun, Bruker veri kütüphanesinde kayıtlı olan diğer Tenacibaculum türleri ile uzak filogenetik ilişki gösterdiği belirlendi

4.2.1.2 MALDI-TOF MS (Bruker) Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Proje kapsamında yürütülen bakteri tanımlama çalışmaları, MALDI-TOF MS (Bruker) veri kütüphanesini ile entegre olabilen, fakat MALDI TOF MS veri kütüphanesinden bağımsız kullanılabilen yerel referans kütüphane oluşturulmasını ve bu sistemin tanısal etkinliğinin ölçülmesini kapsayacak şekilde üç aşamada yapılandırıldı. Süreç boyunca yöntemsel iyileştirmeler ve veri kütüphanesi güncellemeleriyle birlikte tanılamada doğruluk ve başarı oranı anlamlı düzeyde artırıldı.

I. Aşama: Formik Asit Yöntemi ile Tanılama

Projenin ilk yılında, pilot işletmelerden elde edilen örneklerden izole edilen bakteriyel suşlar, **Bruker MALDI-TOF MS** cihazı ile **formik asit ekstraksiyon yöntemi** kullanılarak analiz edilmiştir. Bu yöntemde toplam **399 izolat** değerlendirilmiş, ancak tanımlama başarı oranlarının sınırlı olduğu görülmüştür:

- Yalnızca %85,6'sı tür düzeyinde yüksek güvenilirlikle tanımlanabilmiş (skor ≥ 2.00),
- %12,8'i cins düzeyinde kalmış (skor 1.70–1.99),
- %1,6'sı tanımlanamamıştır (skor < 1.70).

Bu sonuçlar, Bruker'in ticari veri kütüphanesinin veri kütüphanesinde yer almayan bakteri türleri ile Türkiye'de balıklardan izole edilen uluslararası alanda yeni tip suşların (yerel suşların), formik asit protokolüyle verdikleri protein spektrumlarının, bakteriyel balık patojenleri için yeterli çözünürlük sunmadığını göstermiştir.

II. Aşama: Yerel Veri Kütüphanesi (YVK) Oluşturulması ve Protokol İyileştirmesi

Tanılamadaki sınırlılıkları aşmak amacıyla, formik asit protokolü yerine **etanol-formik asit ekstraksiyon yöntemi** kullanılmış ve paralel olarak MALDI TOF MS veri kütüphanesinde yer almayan Türkiye'den izole edilen 32 yeni tip suş ve 7 balık patojeni bakteri türü (*L. petauri, V. salmoninarum, A. salmonicida subsp. salmonicida, A. salmonicida subsp. masoucida, A. salmonicida subsp. achromogenes, Photobacterium damselae subsp. damselae ve Tenacibaculum maritimum*) **yerel veri kütüphanesine (YVK)** entegre edilmiştir.

III. Aşama: Yerel Kütüphanenin Uygulama Etkinliği ve Tanımlama Performansı

YVK'nin oluşturulmasının ardından, **2022–2023 dönemine ait tüm izolatlar (n=399)** yeniden analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda:

- Bruker sisteminde tanımlanamayan bazı izolatlar artık yüksek skorla tür düzeyinde tanımlanabilir hâle gelmiş,
- Böylece toplam tanımlanmış izolat sayısı **399'dan 412'ye yükselmiştir**

Bu durum, oluşturulan yerel veri kütüphanesinin, tanımlama kapasitesine doğrudan katkısını ortaya koymuştur. Özellikle Bruker sisteminde yer almayan *L. petauri*, *Chryseobacterium muglaense*, *Flavobacterium pectinovorum*, *Pseudomonas anatoliensis* gibi türler artık yüksek doğrulukla identifiye edilebilmiştir. Ayrıca birinci aşamada *L. garvieae* olarak tanımlanan 72 izolat, YVK ile birlikte yapılan yeniden analiz ve PCR doğrulaması sonucunda **fenotipik ve moleküler olarak *L. petauri* olarak doğrulanmıştır.** Bu ayrım, ticari veri kütüphanesinde mümkün olmamış; ancak YVK sayesinde hem tanısal hem de epidemiyolojik doğruluk sağlanmıştır. YVK'de tanımlanan izolatlarda görülen identifikasyon farklılıklarıyla ilgili veriler Tablo 15'de sunulmuştur.

Tablo 15. Doğrudan formik asit ekstraksiyonu (FAE) ile tanımlanan (I. Aşama) izotlar ile yerel veri kütüphanesinde etanal-formik asit ekstraksiyonu (EFAE) yöntemi (III aşama) uygulanarak tanımlanan izolatlar arasındaki identifikasyon değişimleri

Bakteri Türü	**Proje örnekleme dönemlerinde FAE ile (I aşama) tanımlanan toplam izolat sayısı***	**YVK oluşturularak EFAE (II. Aşama) sonrasında izolatların tekrar tanımlanması sonrası FAE ile (I. Aşama) tanımlanan izolatların yakın ilişki gösterdiği tür/türler**	**YVK oluşturularak EFAE sonrasında (III aşama) tanımlanan izolat sayısı**	**YVK oluşturularak EFAE ile tanımlanma sonrasında tür identifikasyon sayılarındaki değişimler**
A. bestiarum	9	*A. salmonicida*	1	8 eksik
A. caviae	2	*A. sobria*	-	Tespit edilemedi
A. eucrenophila	12	*A. sobria* ve *A. salmonicida*	1	11 eksik
A. hydrophila	6	*A. sobria*	3	3 eksik

A. media	7	*A. sobria*	2	5 eksik
A. salmonicida	6	-	25	19 fazla
A. sobria	44	-	58	14 fazla
A. veronii	10	-	10	Değişm yok
C. balastinum	1	-		Tespit edilemedi
C. greenlandense	1	-		Tespit edilemedi
C. muglaense		-	2	2 fazla
C. piscicola		-	1	1 fazla
C. piscium	2	*C. scophthalmum*	2	Değişm yok
C. scophthalmum	1	*C. piscium*	1	Değişm yok
***Chryseobacterium* spp.**	5	*F. psychrophilum*	-	Tespit edilemedi
F. onchorynchi	1	-	-	Tespit edilemedi
F. pectinovorum	-	*F. saccharophilum*	1	1 fazla
F. psychrophilum	36	-	38	2 fazla
F. saccharophilum	1	-	2	1 fazla
F. sinopsychrotolerans	1	-		Tespit edilemedi
F. spartansii/tructae	1	-	1	Değişm yok
***Flavobacterium* spp.**	3	*F. psychrophilum*	-	Tespit edilemedi
L. garvieae	120	-	72	72
L. petauri	-	-	48	48
Listonella (Vibrio) anguillarum	3	-	5	2 fazla
P. antarctica	1	-	2	1 fazla
P. anguilliseptica	1	-		1 eksik
P. brassicacearum		-	1	1 fazla
P. corrugata	2	-	2	Değişm yok
P. anatoliensis		-	7	7 fazla
P. arcuscaelestis		-	2	2 fazla
P. chlororaphis		-	1	1 fazla
P. extremorientalis	1	-	1	Değişm yok
P. fluorescens	9	-	2	7 eksik

P. gessardii	8	-	1	7 eksik
P. iridis $^{T+}$	5	-	16	11 fazla
P. grimontii $^{YVK-}$	3	-		Tespit edilemedi
P. koreensis	10	-	7	3 eksik
P. luteola	1	-		Tespit edilemedi
P. mandelii $^{+}$	-	-	2	2 fazla
P. marginalis $^{+}$	2	-	4	2 fazla
P. migulae $^{YVK-}$	1	-		Tespit edilemedi
P. mucoides $^{YVK-}$	3	-		Tespit edilemedi
P. neuropathica $^{T+}$	1	-	3	2 fazla
P. proteolytica $^{+}$	-	-	2	2 fazla
P. putida $^{YVK-}$	2	-		Tespit edilemedi
P. synxantha $^{YVK-}$	3	-		Tespit edilemedi
S. putrefaciens	9	-	9	Değişm yok
V. salmoninarum $^{P+}$	7	-	8	1 fazla
Y. ruckeri $^{P+}$	55	-	69	14 fazla
Toplam izolat sayısı	399		412	48 izolatın tür identifikasyonunda, azalma olmuş toplam 59 izolatın tür identifkasyon sonuçlarında artış görülmüştür.

‡: Yerel veri kütüphanesi; *: FAE ile tanımlanan izolat sayısı; -: Tespit edilemedi; 48 izolat eksik teşhis edilmiş veya başka bir türe ait profil gösterdi; ^{T}: Veri kütüphanesine eklenen tip suşlar; ^{P}: Gökkuşağı alabalıklarında yaygın görülen patojenler

Bu üç aşamalı süreç, proje kapsamında kullanılan MALDI-TOF MS teknolojisinin sahaya özgü koşullara nasıl uyarlanabileceğini somut olarak göstermektedir. Bruker sisteminin sınırlı tanımlama gücü, oluşturulan yerel veri kütüphanesi ile desteklenerek büyük oranda aşılmış; tanımlanamayan izolat oranı %20'den %5'in altına düşürülmüştür. Aynı zamanda formik asit yerine etanol-formik asit ekstraksiyon protokolünün kullanılmasıyla protein spektrum kalitesi iyileştirilmiş, tanımlama skorları belirgin şekilde artırılmıştır. Yerel veri kütüphanesinin oluşturulması, yalnızca tanı başarısını artırmakla kalmamış, **Türkiye kökenli bakteriyel suşların küresel tanı sistemlerine entegre edilmesi için temel bir adım** olmuştur. Bu süreç,

hem tanı teknolojilerinde yerelleştirme potansiyelini göstermekte hem de su ürünleri hastalık kontrol stratejileri için güvenilir altyapı oluşturmaktadır.

4.2.2 Moleküler İdentifikasyon

Bakteriyel izolasyon çalışmaları sonrasında MALDI TOF MS ile identifikasyonu yapılan tüm izolatlar çalışma kapsamında değerlendirilmiş ve balıklarda görülen hastalık bulguları ve teşhis edilen etkenlere ait patojenite verileri literatür araştırması yapılarak karşılaştırılmıştır. Yapılan bu değerlendirme neticesinde işletmelerdeki olası hastalık etkenleri belirlenmiş ve bu etkenlere yönelik sonuçlar Tablo 15'de sunulmuştur.

Balıklarda olası hastalık etkeni olarak belirlenen ve Tablo 15'de verilen bakteriyel etkenlerin sekans analizleri ile doğrulamaları yapılmış olup, bu proje önerisinde belirtilen yöntemlere uygun olarak bu etkenlere yönelik filogenetik ağaçları Ek dosya 3 ve 4'de sunulmuştur. Yapılan filogenetik analizlerde proje çalışmasında tespit edilen *A. bestiarum* izolatının filogenetik analizinde, *A. salmonicida* subps. *smithia*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. bestiarum* ve *A. piscicola* ile yakın benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. salmonicida*, *A. sobria* ve *A. veronii*'nin aynı türe ait referans/tip suşlarla yakın genetik benzerlik gösterdiği görülmüştür (Ek dosya 4). MALDI TOF MS analizi ile *Chryseobacterium* sp. olarak tanımlanan etkenin filogenetik analizinde, *C. piscium* olarak identifiye edildiği ve *C. balastinum*, *C. greenlandense*, *C. piscium* ve *C. scophthalmum* türlerine ait referans/tip suşlarla yakın genetik benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Ek dosya 4). *F. onchorynchi*, *F. psychrophilum*, *F. saccharophilum* ve *F. sinopsychrotolerans* türlerinin filogenetik analizinde aynı türe ait referans/tip suşlarla yakın genetik benzerlik sergilediği tespit edilmiştir (Ek dosya 3 ve ek dosya 4). *L. garvieae* türüne yönelik olarak yapılan filogenetik analizde, *L. garvieae*'nin bu türe ait referans/tip suşlarla yakın genetik benzerlik gösterdiği, ancak 2020 yılında tanımlanan *L. petauri* ile de yakın filogenetik ilişki gösterdiği saptanmıştır (Ek dosya 3 ve Ek dosya 4). L. anguillarum, *V. salmoninarum* ve *Y. ruckeri* izolatının filogenetik analizinde her bir türe ait referans/tip suşlarla çok yakın filogenetik ilişki gösterdiği tespit edilmiştir (Ek dosya 3).

4.3 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ve Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin (cut-off:EcoFF) Belirlenmesine İlişkin Sonuçlar

Bu proje kapsamında, ülkemizde gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğinde sıkça karşılaşılan bakteriyel patojenlerin (*Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Y. ruckeri, L. garvieae/petauri, V. anguillarum, F. psychrophilum* ve *V. salmoninarum*) fenotipik antimikrobiyal duyarlılık profilleri hem disk difüzyon hem de broth mikrodilüsyon yöntemleriyle belirlenmiş; elde edilen minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) verileri ve inhibisyon zon çapları, CLSI ve EUCAST standartlarına uygun olarak değerlendirilerek, türlere özgü epidemiyolojik eşik değerler (cut-

off: EcoFF) Kronvall metoduna dayalı olarak hesaplanmış ve doğal (WT) ile dirençli (NWT) fenotipler arasında epidemiyolojik ayrım yapılmıştır.

4.3.1 *Aeromonas* spp. İzolatlarının Disk Difüzyon Tekniği ile Antimikrobiyal Duyarlılığın Değerlendirilmesi

Proje kapsamında gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss) yetiştiriciliğinde sıkça karşılaşılan bakteriyel enfeksiyonlara neden olan ***Aeromonas* spp.**, ***Pseudomonas* spp.**, ***Y. ruckeri, L. garvieae***, ***V. anguillarum, F. psychrophilum*** ve ***V. salmoninarum*** türlerine ait klinik izolatların, disk difüzyon yöntemiyle **10 farklı antimikrobiyal ajan**a (Gentamisin, Siprofloksasin, Oksitetrasiklin, SXT, Tetrasiklin, Enrofloksasin, Eritromisin, AMC, Florfenikol ve Doksisiklin) karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. Elde edilen veriler, inhibisyon zon çapları milimetre cinsinden ölçülerek **CLSI ve EUCAST** kriterlerine göre yorumlanmış; değerlendirme yapılamayan ajanlar için ise mevcut literatürde bildirilen epidemiyolojik eşik değerlerinden (EcoFF) yararlanılmıştır (Tablo 16, 17).

Tablo 16. *Aeromonas* spp. izolatlarının (n=38) antimikrobiyallere karşı tahmini epidemiyolojik sınır değerleri ve duyarlılık tiplerinin yüzdeleri

Antimikrobiyal	WT* Sınır Değerleri (mm)	Doğal Fenotip (WT) Yüzdesi	Doğal Olmayan Fenotip (NWT) Yüzdesi
Enrofloksasin	28	89.47	10.53
Kanamisin	18	84.21	15.29
Florfenikol	35	53.13	46.87
Oksitetrasiklin	22	50	50
Tetrasiklin	28	15.79	84.21
Eritromisin	8	84.21	15.29
SXT	22	15.79	84.21

Aeromonas spp. türlerine ait 38 izolatın test sonuçlarına göre, **Enrofloksasin (≥28 mm)** için izolatların %89,47'si WT (doğal fenotip) olarak sınıflandırılmıştır. Benzer şekilde **Kanamisin (≥18 mm)** için %84,21'i WT, **Florfenikol (≥35 mm)** için %53,13'ü WT olarak tespit edilmiştir. Buna karşın, **Tetrasiklin (≥28 mm)** ve **SXT (≥22 mm)** gibi ajanlarda dirençli (NWT) fenotip oranları sırasıyla %84,21 ve %84,21 ile oldukça yüksektir. Bu bulgular, *Aeromonas* spp. izolatlarında bazı antimikrobiyallere karşı yaygın direnç geliştiğine işaret etmektedir (Tablo 16). Detaylı fenotipik değerlendirmelerde, tür düzeyinde farklılıklar da dikkat çekmiştir. Örneğin,

Aeromonas hydrophila suşlarının önemli bir kısmı Enrofloksasin, Florfenikol ve Oksitetrasiklin'e karşı duyarlılık göstermişken; *Aeromonas sobria* ve *Aeromonas veronii* suşlarında aynı ajanlara karşı dirençli fenotipler daha sık tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bazı izolatların CLSI veya EUCAST'te sınır değerleri tanımlanmamış antibiyotiklere karşı inhibisyon zon çaplarının yorumlanması literatür ışığında yapılmıştır (Smith ve ark., 2012) (Tablo 17).

Tablo 17. *Aeromonas* spp. izolatlarının Disk Difuzyon Testi Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

İzolat No	Bakteri Türü	Antimikrobiyal Etkenler ve Epidemiyolojik Sınır Değerleri (mm)						
		*ENR 28≥	*CN 18≥	*FFC ≥35	*OTC ≥21	*TE 28≥	*E 8≥	SXT ≥ 22
403	*Aeromonas* bestiarum	30	22	36	9	14	24	28
160	*Aeromonas eucrenophila*	40	20	38	20	20	20	20
230	*Aeromonas* hydrophila	38	22	36	22	25	22	0
232	*Aeromonas* hydrophila	36	21	31	28	18	20	20
326	*Aeromonas* hydrophila	40	24	32	24	20	24	20
511	*Aeromonas* hydrophila	40	19	32	25	28	28	24
322	*Aeromonas* media	40	26	10	0	12	18	20
510	*Aeromonas* media	38	23	35	21	25	20	18
393	*Aeromonas* media	50	20	45	30	16	0	0
52	*Aeromonas* salmonicida	40	20	38	20	20	20	20
75	*Aeromonas* salmonicida	38	20	38	20	20	20	0
170	*Aeromonas* salmonicida	38	20	30	26	24	18	18
224	*Aeromonas* salmonicida	30	22	36	9	14	24	28
6	*Aeromonas* sobria	44	20	36	22	?	25	22
15	*Aeromonas* sobria	50	18	40	15	22	20	17
47	*Aeromonas* sobria	36	21	31	28	18	20	20
65	*Aeromonas* sobria	38	20	38	16	28	28	24
68	*Aeromonas* sobria	32	26	44	22	28	30	32

78	*Aeromonas* sobria	30	24	42	24	28	28	34
80	*Aeromonas* sobria	25	20	39	14	21	25	20
129	*Aeromonas* sobria	38	20	38	16	28	28	24
143	*Aeromonas* sobria	30	0	32	10	20	0	0
156	*Aeromonas* sobria	42	20	37	25	24	22	24
172	*Aeromonas* sobria	44	20	36	22	0	25	22
233	*Aeromonas* sobria	41	23	0	0	0	28	0
243	*Aeromonas* sobria	29	22	46	9	16	30	30
249	*Aeromonas* sobria	25	17	10	0	11	10	0
286	*Aeromonas* sobria	25	15	12	10	13	21	22
301	*Aeromonas* sobria	18	19	27	18	19	25	19
303	*Aeromonas* sobria	28	20	11	9	14	19	18
396	*Aeromonas* sobria	28	21	14	10	15	0	18
427	*Aeromonas* sobria	32	26	44	22	28	30	32
453	*Aeromonas* sobria	42	20	37	25	24	22	24
454	*Aeromonas* sobria	30	20	0	20	20	5	0
169	*Aeromonas* veronii	34	20	38	26	26	16	20
172	*Aeromonas* veronii	30	0	32	10	20	0	0
176	*Aeromonas* veronii	40	20	30	26	24	20	8
310	*Aeromonas* veronii	28	21	14	9	10	18	0
25922a	E. coli	40	30	30	20	20	20	10

Kırmızı renkli hücreler dirençli disk difüzyon değerlerini, yeşil renkli hücreler duyarlı disk difüzyon değerlerini göstermektedir, gri hücreler CLSI/EUCAST ve literatüre göre duyarlılık sınırları bulunmayan değerleri temsil etmektedir. *: Belirtilen antibiyotiklerin sınır değerleri CLSI/EUCAST'de bulunmaması nedeniyle değerlendirme mevcut literatür ışığında yapılmıştır (Smithve ark., 2012).

Tablolar üzerinde yapılan renkli sınıflandırma; **yeşil hücrelerin duyarlı**, **kırmızı hücrelerin dirençli antibiyotik kombinasyonlarını** göstermektedir. Bu görsel ayrım, farklı türlerdeki izolatların antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç düzeylerinin açık biçimde karşılaştırılmasını sağlamaktadır

Sonuç olarak, elde edilen veriler *Aeromonas* spp. başta olmak üzere su kaynaklı patojenlerin önemli bir kısmında bazı antimikrobiyal ajanlara karşı belirgin direnç gelişimi olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, kültür balıkçılığında **etkin ve hedefe yönelik antimikrobiyal kullanım stratejileri** geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda, **EcoFF sınır**

değerlerinin tür düzeyinde belirlenmesi, mevcut direnç eğilimlerinin izlenmesi ve ülke düzeyinde epidemiyolojik direnç profillerinin oluşturulması açısından değerli bir temel teşkil etmektedir.

4.3.2 *Pseudomonas* spp. İzolatlarında Disk Difuzyon Testi ile Antimikrobiyal Duyarlılığın Değerlendirilmesi

Proje kapsamında gökkuşağı alabalığı işletmelerinden izole edilen ***Pseudomonas* spp.** türlerinin antimikrobiyal duyarlılıkları, disk difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Test edilen antimikrobiyallerin inhibisyon zon çapları **Miranda ve Rojas (2007)** ile **Ben Mhenni ve ark. (2023)** tarafından önerilen epidemiyolojik eşik değerlerine (EcoFF) göre yorumlanmıştır. Bu kapsamda, **Enrofloksasin (≥17 mm), Kanamisin (≥13 mm), Amoksisilin-Klavulanik Asit [AMC] (≥12 mm), Florfenikol (≥15 mm), Oksitetrasiklin (≥15 mm), Doksisiklin (≥11 mm), Tetrasiklin (≥15 mm), Eritromisin (≥11 mm), Siprofloksasin (≥26 mm) ve SXT (≥21 mm)** için referans zon çapları esas alınarak fenotipik sınıflandırma yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, ***Pseudomonas* spp.** izolatlarının bazı antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç geliştirdiğini ortaya koymuştur (Tablo 18). Enrofloksasin için tüm izolatların (%100) **doğal fenotip (WT)** özellikte olduğu saptanırken; Kanamisin (%97,37) ve Doksisiklin (%86,84) için de yüksek WT oranları gözlenmiştir. Buna karşın, **Amoksisilin-Klavulanik Asit (%81,58 NWT), Florfenikol (%79,95 NWT), Eritromisin (%81,58 NWT)** ve **SXT (%83,84 NWT)** için dirençli (NWT) fenotip oranları oldukça yüksektir. Bu durum, özellikle beta-laktam ve makrolid grubu antibiyotiklerin ***Pseudomonas* spp.** türlerinde etkinliğinin sınırlı olduğunu göstermektedir.

Tablo 18. *Pseudomonas* spp. izolatlarının (n=38) antimikrobiyallere karşı tahmini epidemiyolojik sınır değerleri ve duyarlılık tiplerinin yüzdeleri

Antimikrobiyal	WT* Sınır Değerleri (mm)	Doğal Fenotip (WT) Yüzdesi	Doğal Olmayan (NWT) Fenotip Yüzdesi
Enrofloksasin	17	100	0
Kanamisin	13	97.37	2.63
AMC**	12	18.42	81.58
Florfenikol	15	21.05	79.95
Doksisiklin	15	86.84	13.16
Tetrasiklin	11	84.21	15.89
Eritromisin	26	18.42	81.58

SXT	21	13.16	83.84

*:Doğal Fenotip, **: Amoksisilin-Klavunik asit

Tür bazında yapılan analizlerde, ***Pseudomonas iridis***, ***P. koreensis***, ***P. anatoliensis***, ***P. fluorescens***, ***P. brassicacearum*** ve diğer türlerin antimikrobiyallere karşı gösterdiği inhibisyon zon çapları Tablo 19'da detaylı olarak sunulmuştur. Özellikle ***P. koreensis*** ve ***P. iridis*** türlerinin Enrofloksasin, Oksitetrasiklin ve Siprofloksasin'e karşı daha geniş inhibisyon zonlarına sahip olduğu, buna karşın AMC, Eritromisin ve SXT'ye karşı genellikle düşük zon çapları gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 19. *Pseudomonas* spp. Türlerinin disk difüzyon yöntemine ilişkin antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

İzolat No	Bakteri Türü	Antimikrobiyal Etkenler ve Epidemiyolojik Sınır Değerleri (mm)									
		*ENR ≥17	*CN ≥13	*AMC≥12	*FFC≥15	*OTC ≥15	*DO≥11	*TE≥15	*E≥11	*CIP≥26	*SXT≥11
309	*Pseudomonas anatoliensis*	30	23	0	02	18	18	18	5	26	6
395	*Pseudomonas anatoliensis*	27	25	0	10	0	10	0	0	33	0
401	*Pseudomonas anatoliensis*	42	26	18	0	22	25	23	8	44	16
4	*Pseudomonas antarctica*	23	25	0	0	20	27	22	0	35	0
140	*Pseudomonas antarctica*	38	30	0	0	20	20	20	5	40	0
173	*Pseudomonas brassicacearum*	25	23	0	0	18	19	18	15	34	0
51	*Pseudomonas chlororaphis*	27	20	0	0	14	13	12	0	43	0
41	*Pseudomonas corrugata*	25	17	0	0	13	13	15	0	41	0
482	*Pseudomonas extremorientalis*	36	24	0	0	18	20	20	0	40	0
389	*Pseudomonas fluorescens*	42	26	18	0	22	25	23	8	44	16
105	*Pseudomonas iridis*	30	25	0	0	20	15	18	0	40	10
223	*Pseudomonas iridis*	27	24	0	9	17	16	18	0	38	0
308	*Pseudomonas iridis*	25	23	0	0	18	19	18	15	34	0
387	*Pseudomonas iridis*	26	24	0	0	0	0	0	0	32	0
420	*Pseudomonas iridis*	35	22	0	15	20	24	21	10	40	0
486	*Pseudomonas iridis*	30	24	0	0	20	20	20	0	40	0
509	*Pseudomonas iridis*	30	23	0	0	17	20	17	0	44	0
379	*Pseudomonas proteolytica*	30	20	0	0	16	10	10	0	40	0
150	*Pseudomonas koreensis*	38	26	0	0	20	22	20	0	40	0
307	*Pseudomonas koreensis*	34	24	13	10	18	21	19	10	42	0
66	*Pseudomonas koreensis*	40	22	23	35	23	23	22	17	42	23
92	*Pseudomonas mandelii*	40	30	0	10	24	22	21	0	42	0
44	*Pseudomonas marginalis*	27	10	0	0	15	23	19	0	38	0
54	*Pseudomonas marginalis*	28	20	0	0	10	23	20	0	40	0
342	*Pseudomonas neuropathica*	40	22	23	35	23	23	22	17	42	23

Kırmızı renkli hücreler dirençli disk difüzyon değerlerini, yeşil renkli hücreler duyarlı disk difüzyon değerlerini göstermektedir. *: Belirtilen antibiyotiklerin sınır değerleri CLSI/EUCAST'de bulunmaması nedeniyle değerlendirme mevcut literatür ışığında yapılmıştır (Ben Mhenni ve ark., 2023; Miranda ve Rojas 2007)

Tabloda yer alan renkli sınıflandırmaya göre; **yeşil hücreler duyarlı (WT)**, **kırmızı hücreler dirençli (NWT)** antibiyotik kombinasyonlarını temsil etmektedir. Bu görsel ayrım, antibiyotiklerin türlere göre etkinliğinin değerlendirilmesinde önemli bir analiz kolaylığı sağlamaktadır.

Bu bulgular, ***Pseudomonas* spp.** suşlarında çoklu antimikrobiyal direnç gelişiminin yaygın olduğunu ve bazı antibiyotiklerin bu patojenlere karşı etkinliğinin oldukça azaldığını göstermektedir. Bu nedenle, su ürünleri sektöründe **rastgele antibiyotik kullanımının**

sınırlandırılması ve **türe özgü duyarlılık profillerine dayalı tedavi stratejilerinin geliştirilmesi** önem arz etmektedir.

4.3.3 *Y. ruckeri* İzolatlarında Disk Difuzyon Testi ile Antimikrobiyal Duyarlılığın Değerlendirilmesi

Proje kapsamında gökkuşağı alabalıklarından izole edilen **22 adet *Y. ruckeri* izolatının**, disk difüzyon yöntemiyle Florfenikol (FFC) ve Tetrasiklin (TE) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları test edilmiştir. Değerlendirme, *Baron ve ark.* (2021) tarafından bildirilen **epidemiyolojik eşik değerleri (EcoFF)** temel alınarak yapılmıştır. Bu değerlere göre, **Florfenikol için ≥27 mm**, **Tetrasiklin için ise ≥26 mm** inhibisyon zon çapı referans alınmıştır. Analiz sonuçlarına göre, **Florfenikol** için izolatların %86,36'sı **doğal fenotip (WT)** sınıfına girmiş; yalnızca %13,64'ü **doğal olmayan fenotip (NWT)** olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, **Tetrasiklin** için WT oranı %77,27, NWT oranı ise %22,73 olarak hesaplanmıştır (Tablo 18). Bu durum, *Y. ruckeri* suşlarında Florfenikol'ün etkinliğinin büyük oranda korunmuş olduğunu, Tetrasiklin'e karşı ise kısmi bir direnç gelişiminin başladığını göstermektedir. Her bir izolatın inhibisyon zon çaplarına ilişkin ayrıntılı sonuçlar Tablo 20'de sunulmuştur.

Tablo 20. *Y. ruckeri* izolatlarının Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

İzolat No	*Bakteri Türü*	Antimikrobiyal Etkenler ve Epidemiyolojik Sınır Değerleri (mm)									
		ENR	CN	AMC	*FFC ≥27	OTC	DO	*TE ≥26	E	CIP	SXT
87	*Y. ruckeri*	44	30	30	38	30	32	26	28	40	22
214	*Y. ruckeri*	32	20	28	28	22	26	30	10	40	34
208	*Y. ruckeri*	38	22	26	24	20	24	30	12	32	38
218	*Y. ruckeri*	40	22	27	30	30	34	28	20	40	30
238	*Y. ruckeri*	36	18	27	36	26	28	28	15	40	36
240	*Y. ruckeri*	38	25	30	36	28	30	26	20	36	35
254	*Y. ruckeri*	25	28	30	29	24	28	27	30	30	30
266	*Y. ruckeri*	36	24	25	30	25	22	26	15	35	30
267	*Y. ruckeri*	35	23	30	32	30	30	29	15	36	34
268	*Y. ruckeri*	38	25	25	30	24	27	26	14	40	35
280	*Y. ruckeri*	32	20	28	28	22	26	30	10	40	34
414	*Y. ruckeri*	40	20	26	30	24	24	24	12	30	0
422	*Y. ruckeri*	32	23	26	32	20	30	32	18	40	0
429	*Y. ruckeri*	30	20	24	30	30	20	20	20	40	24

430	*Y. ruckeri*	30	26	10	30	20	20	20	20	30	0
437	*Y. ruckeri*	30	20	20	10	16	20	16	10	30	8
518	*Y. ruckeri*	30	25	22	20	22	22	20	12	26	20
122	*Y. ruckeri*	44	30	30	38	30	32	26	28	40	22
123	*Y. ruckeri*	40	30	24	32	28	34	38	20	42	0
217	*Y. ruckeri*	32	22	30	36	24	28	30	20	38	36
222	*Y. ruckeri*	40	20	30	30	28	30	30	20	38	40
406	*Y. ruckeri*	40	30	30	30	20	20	24	30	40	0

Kırmızı renkli hücreler dirençli disk difüzyon değerlerini, yeşil renkli hücreler duyarlı disk difüzyon değerlerini göstermektedir. *: Belirtilen antibiyotiklerin sınır değerleri CLSI/EUCAST'de bulunmaması nedeniyle değerlendirme mevcut literatür ışığında yapılmıştır (Baron vd.2021).

4.3.4 *L. petauri* İzolatlarında Disk Difuzyon Testi ile Antimikrobiyal Duyarlılığın Değerlendirilmesi

Proje kapsamında gökkuşağı alabalığı örneklerinden izole edilen **32 adet *L. petauri*** izolatına ait antimikrobiyal duyarlılık testleri, disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirilmiş; elde edilen inhibisyon zon çapları literatürde bildirilen epidemiyolojik eşik değerleri (EcoFF) ile karşılaştırılmıştır. Özellikle **Florfenikol (≥22 mm)** ve **Eritromisin (≥23 mm)** için *Egger ve ark.* (2023) tarafından bildirilen referans değerler esas alınarak fenotipik sınıflandırmalar yapılmıştır. Antimikrobiyallere karşı duyarlılık oranları şu şekilde belirlenmiştir.

- **Florfenikol** için izolatların %90,63'ü **doğal fenotip (WT)**, %9,37'si **doğal olmayan fenotip (NWT)** olarak sınıflandırılmıştır.
- **Eritromisin** için %87,50 oranında WT fenotip gözlenmiş, yalnızca %12,50'lik kısmı dirençli kabul edilmiştir.
- **Amoksisilin-Klavulanik Asit (AMC)** için belirlenen ≥16 mm sınır değerine göre, izolatların %96,88'i WT olarak değerlendirilmiştir.
- **Oksitetrasiklin** açısından ise direnç dikkat çekici düzeydedir: yalnızca %18,75'i WT, geri kalan %81,25'i NWT fenotip göstermiştir.

Her bir izolatın antibiyotiklere karşı gösterdiği inhibisyon zon çapları Tablo 21'de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Tablo 21. *L. petauri* izolatlarının Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

İzolat No	Bakteri Türü	Antimikrobiyal Etkenler ve Epidemiyolojik Sınır Değerleri (mm)									
		ENR	CN	AMC ≥18	*FFC≥22	OTC ≥22	DO	TE	E≥21	CIP	SXT
11	*L. petauri*	17	20	30	22	20	20	16	24	16	0
84	*L. petauri*	20	22	30	20	20	20	20	24	16	0
165	*L. petauri*	20	20	30	20	10	20	20	30	10	0
175	*L. petauri*	20	22	40	30	20	28	20	30	16	0
179	*L. petauri*	22	20	36	27	23	22	20	30	16	0
180	*L. petauri*	28	20	40	30	20	22	28	26	20	0
181	*L. petauri*	20	22	30	28	20	20	20	24	16	0
190	*L. petauri*	20	20	38	30	20	10	10	25	18	0
202	*L. petauri*	20	0	9	0	10	22	20	0	10	0
204	*L. petauri*	20	22	40	30	20	28	20	30	16	0
228	*L. petauri*	20	21	29	25	20	23	21	30	15	0
247	*L. petauri*	22	21	32	25	19	21	20	26	18	12
257	*L. petauri*	20	26	38	30	20	20	24	38	20	0
272	*L. petauri*	22	21	32	22	23	24	22	31	17	0
287	*L. petauri*	22	20	36	27	23	22	20	30	16	0
305	*L. petauri*	26	20	30	22	28	20	20	20	10	0
325	*L. petauri*	23	22	33	38	18	23	20	27	18	0
327	*L. petauri*	20	20	40	30	20	30	28	30	16	0
352	*L. petauri*	22	20	30	28	16	24	20	24	18	0
375	*L. petauri*	23	21	36	25	23	28	22	27	20	0
377	*L. petauri*	20	20	38	20	20	20	24	24	10	0
390	*L. petauri*	20	16	32	30	20	20	26	30	20	0
391	*L. petauri*	2	20	30	30	20	20	20	30	10	0
421	*L. petauri*	22	21	35	26	20	26	24	26	19	0
433	*L. petauri*	24	21	35	26	20	28	20	28	18	0
99	*L. petauri*	26	24	38	38	20	22	24	0	20	0
198	*L. petauri*	24	20	40	26	20	30	20	40	20	0
205	*L. petauri*	28	20	40	38	20	30	20	28	20	0
229	*L. petauri*	26	20	30	22	28	20	20	20	10	0

283	*L. petauri*	23	22	33	38	18	23	20	27	18	0
359	*L. petauri*	20	20	40	30	20	30	28	30	16	0
366	*L. petauri*	22	20	30	28	16	24	20	24	18	0

Kırmızı renkli hücreler dirençli disk difüzyon değerlerini, yeşil renkli hücreler duyarlı disk difüzyon değerlerini göstermektedir. *: Belirtilen antibiyotiklerin sınır değerleri CLSI/EUCAST'de bulunmaması nedeniyle değerlendirme mevcut literatür ışığında yapılmıştır (Avendaño-Herrera ve ark., 2011; Egger ve ark., 2023)

4.3.5 *V. anguillarum* İzolatlarında Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

Proje kapsamında örnekleme yapılan gökkuşağı alabalığı üretim alanlarından izole edilen **3 adet *V. anguillarum*** izolatına yönelik antimikrobiyal duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Test edilen antibiyotikler arasında yer alan **Enrofloksasin, Florfenikol, Oksitetrasiklin, Tetrasiklin ve Timetoprim-Sülfametoksazol (SXT)** için değerlendirme, mevcut literatürde bildirilen **epidemiyolojik eşik değerleri (EcoFF)** doğrultusunda yapılmıştır. Buna göre; *Smith ve Christofilogiannis (2007)*, *Uhland (2011)* ve *Poblete-Morales (2013)* çalışmalarında bildirilen eşik değerler sırasıyla **ENR ≥20 mm, FFC ≥38 mm, OTC ≥38 mm, TE ≥20 mm ve SXT ≥27 mm** olarak esas alınmıştır. Fenotipik sınıflandırma sonuçlarına göre:

- **Enrofloksasin**, **Florfenikol**, **Tetrasiklin** ve **SXT** için tüm izolatlar (%100) **doğal fenotip (WT)** olarak sınıflandırılmıştır.
- Buna karşın **Oksitetrasiklin** için yalnızca %33,33 oranında WT fenotip gözlenmiş, izolatların %66,67'si bu ajana karşı **dirençli (NWT)** olarak değerlendirilmiştir (Tablo 22).
-

Tablo 22. *Vibrio* spp. izolatlarının (n=3) antimikrobiyallere karşı tahmini epidemiyolojik sınır değerleri ve duyarlılık tiplerinin yüzdeleri

Antimikrobiyal	WT* Sınır Değerleri (mm)	Doğal Fenotip (WT) Yüzdesi	Doğal Olmayan Fenotip (NWT) Yüzdesi
Enrofloksasin	20	100	0
Florfenikol	38	100	0
Ositetrasiklin	38	33.33	66.67
Tetrasiklin	20	100	0
SXT**	27	100	0

*:Doğal Fenotip, **: Timetoprim-Sülfametoksazol

İzolatlara ait bireysel inhibisyon zon çapları Tablo 23'de sunulmuştur.

Tablo 23. *V. anguillarum* izolatlarının Disk Difüzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

İzolat No	Bakteri Türü	Antimikrobiyal Etkenler ve Epidemiyolojik Sınır Değerleri (mm)									
		*ENR≥20	CN	AMC	*FFC≥38	*OTC≥38	DO	TE	E	CIP	SXT
124	*V. anguillarum*	46	20	10	40	24	30	32	18	43	38
151	*V. anguillarum*	44	26	10	40	40	32	30	20	42	34
152	*V. anguillarum*	38	20	16	38	30	30	32	10	40	30

Kırmızı renkli hücreler dirençli disk difüzyon değerlerini, yeşil renkli hücreler duyarlı disk difüzyon değerlerini göstermektedir. *: Belirtilen antibiyotiklerin sınır değerleri CLSI/EUCAST'de bulunmaması nedeniyle değerlendirme mevcut literatür temel alınarak yapılmıştır.

Bu verilere göre, özellikle **izolat no: 124 ve 152**, Florfenikol ve Enrofloksasin'e karşı geniş zon çaplarıyla WT fenotip göstermiştir. Ancak Oksitetrasiklin için 124 numaralı izolatın zon çapı 24 mm olarak belirlenmiş olup bu değer literatür eşik değeri olan 38 mm'nin oldukça altında kalmaktadır ve bu durum **yüksek düzeyde direnç** göstergesidir.

Bu bulgular, sınırlı sayıda izolat olmasına rağmen, özellikle Oksitetrasiklin gibi bazı tetrasiklin türevi antibiyotiklere karşı **direnç gelişiminin mevcut olabileceğini** işaret etmektedir. Öte yandan, **Florfenikol, Enrofloksasin ve SXT** gibi ajanların hâlen *V. anguillarum* suşlarına karşı etkinliğini koruduğu görülmektedir.

Disk difüzyon testlerinde kullanılan **renkli hücre sınıflandırması**, değerlendirmeyi kolaylaştırmaktadır:

- **Yeşil hücreler**: WT (duyarlı),
- **Kırmızı hücreler**: NWT (dirençli),
- **Gri hücreler**: sınır değeri bulunmayan veya literatürde net tanımlanmamış antibiyotik–izolat kombinasyonlarını temsil etmektedir.

Sonuç olarak, *V. anguillarum* suşlarına karşı antibiyotik seçimi yapılırken **tetrasiklin grubuna özel dikkat gösterilmesi**, direnç eğilimlerinin yakından izlenmesi ve daha geniş izolat serileriyle çalışmaların sürdürülmesi gerektiği düşünülmektedir.

4.3.6 *F. psychrophilum* İzolatlarında Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

Bu çalışmada gökkuşağı alabalıklarından izole edilen toplam **26 adet *F. psychrophilum*** suşuna yönelik olarak disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal duyarlılık testleri

gerçekleştirilmiştir. Değerlendirme kriterleri olarak, *Satıcıoğlu (2018)* tarafından bildirilen **epidemiyolojik eşik değerleri (EcoFF)** temel alınmıştır. Bu referanslara göre belirlenen inhibisyon zonu eşik değerleri; **Enrofloksasin ≥55 mm, AMC ≥47 mm, Florfenikol ≥52 mm, Oksitetrasiklin ≥53 mm, Eritromisin ≥31 mm ve SXT ≥24 mm** şeklindedir. İzolatların fenotipik dağılımları Tablo 24'de verilmiştir.

Tablo 24. F. psychrophilum izolatlarının (n=26) antimikrobiyallere karşı tahmini epidemiyolojik sınır değerleri ve duyarlılık tiplerinin yüzdeleri

Antimikrobiyal	WT* Sınır Değerleri (mm)	Doğal Fenotip (WT) Yüzdesi	Doğal Olmayan Fenotip (NWT) Yüzdesi
Enrofloksasin	55	7.69	92.31
AMC**	47	88.46	11.54
Florfenikol	42	3.85	96.15
Ositetrasiklin	53	0	100
Eritromisin	31	84.61	15.39
SXT***	24	30.77	69.23

*:Doğal Fenotip, ** Amoksisilin Klavunik asit, **: Timetoprim-Sülfametoksazol

Tablo 24 incelendiğinde:

- **Florfenikol** ve **Oksitetrasiklin** için direnç oldukça yaygındır; sırasıyla yalnızca %3,85 ve %0 oranında WT (doğal fenotip) gözlenmiş, bu da izolatların **neredeyse tamamının bu antibiyotiklere dirençli olduğunu** göstermektedir.
- **Enrofloksasin** için WT oranı %7,69 iken, %92,31 oranında dirençli fenotip (NWT) belirlenmiştir.
- Buna karşın **Amoksisilin-Klavulanik Asit (AMC)** ve **Eritromisin** antibiyotiklerine karşı duyarlılık yüksektir; WT oranları sırasıyla %88,46 ve %84,61 olarak tespit edilmiştir.
- **Timetoprim-Sülfametoksazol (SXT)** için ise orta düzeyde bir direnç söz konusudur; yalnızca %30,77'si WT fenotipte bulunmuş, %69,23'ü dirençli sınıfta yer almıştır. Detaylı disk difüzyon zon çapları Tablo 25'de sunulmuştur.

Tablo 25. *F. psychrophilum* İzolatlarının Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

İzolat No	Bakteri Türü	Antimikrobiyal Etkenler ve Epidemiyolojik Sınır Değerleri (mm)									
		*ENR ≥55	CN	*AMC ≥47	*FFC ≥ 52	OTC ≥ 53	DO	TE	*E ≥31	CIP	*SXT ≥24
227	*F. psychrophilum*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
346	*F. psychrophilum*	60	25	50	40	0	34	0	0	36	20

348	*F. psychrophilum*	50	50	50	50	50	50	50	50	40	20
435	*F. psychrophilum*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
445	*F. psychrophilum*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
447	*F. psychrophilum*	60	25	50	40	0	34	0	0	36	20
451	*F. psychrophilum*	23	16	40	38	30	40	34	40	26	0
461	*F. psychrophilum*	50	16	50	50	50	50	50	50	50	10
462	*F. psychrophilum*	38	21	50	44	25	50	40	60	18	0
464	*F. psychrophilum*	50	20	50	50	50	50	50	50	50	50
465	*F. psychrophilum*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
466	*F. psychrophilum*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	26
467	*F. psychrophilum*	50	8	50	50	50	50	50	50	50	22
468	*F. psychrophilum*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
469	*F. psychrophilum*	46	22	50	50	50	50	50	30	26	14
494	*F. psychrophilum*	50	20	50	50	50	50	50	50	50	26
495	*F. psychrophilum*	50	20	50	50	50	50	50	50	50	26
496	*F. psychrophilum*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	26
498	*F. psychrophilum*	40	24	70	50	50	50	50	50	24	0
502	*F. psychrophilum*	44	30	60	60	40	60	50	50	40	0
503	*F. psychrophilum*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
505	*F. psychrophilum*	50	60	30	50	50	50	40	36	50	16
506	*F. psychrophilum*	40	18	30	35	26	32	24	36	23	20
507	*F. psychrophilum*	25	13	32	21	35	36	32	33	45	20
508	*F. psychrophilum*	50	60	30	50	50	50	40	36	50	16
516	*F. psychrophilum*	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

Kırmızı renkli hücreler dirençli disk difüzyon değerlerini, yeşil renkli hücreler duyarlı disk difüzyon değerlerini göstermektedir. *: Belirtilen antibiyotiklerin sınır değerleri CLSI/EUCAST'de bulunmaması nedeniyle değerlendirme mevcut literatür ışığında yapılmıştır (Saticioglu, 2018)

Bu tabloda özellikle **izolat no: 346, 447, 451, 462, 502, 507, 506** gibi birçok suşun Florfenikol, Oksitetrasiklin ve Enrofloksasin'e karşı düşük inhibisyon zonları ile NWT fenotipte olduğu dikkat çekmektedir. Öte yandan **izolat no: 464, 465, 503, 516** gibi bazı suşlar, çoğu antibiyotiğe karşı 50 mm ve üzeri inhibisyon zonlarıyla duyarlılık göstermiştir. Tabloda kullanılan **renk kodlaması** şu şekilde yorumlanmaktadır:

- **Yeşil hücreler** WT (duyarlı),
- **Kırmızı hücreler** NWT (dirençli),
- **Gri hücreler** ise sınır değeri literatürde bulunmayan antibiyotik-izolat kombinasyonlarına karşılık gelmektedir.

Bu sonuçlar, *F. psychrophilum* suşlarında **özellikle Florfenikol, Oksitetrasiklin ve Enrofloksasin** gibi sıklıkla kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç geliştiğini göstermektedir. Bu direnç örüntüsü, tedavi planlamalarında ciddi bir tehdit oluşturmaktadır ve **alternatif antimikrobiyal stratejilerin** geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Ayrıca, duyarlılık testlerinin bölgesel olarak düzenli biçimde tekrarlanması, **dirençli suşların yayılımının izlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.**

4.3.7 *V. salmoninarum* İzolatlarında Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

Proje kapsamında gökkuşağı alabalıklarından izole edilen toplam **8 adet *V. salmoninarum*** suşunun antimikrobiyal duyarlılık profili, disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Değerlendirme kriterleri olarak *Avendaño-Herrera (2011)* tarafından bildirilen **epidemiyolojik eşik değerleri (EcoFF)** kullanılmıştır. Bu eşik değerler, **Florfenikol ≥21 mm, Oksitetrasiklin ≥22 mm ve Eritromisin ≥21 mm** şeklindedir. Fenotipik dağılım sonuçlarına göre:

- **Florfenikol** için izolatların %75'i **doğal fenotip (WT)**, %25'i ise **dirençli (NWT)** fenotip göstermiştir.
- **Oksitetrasiklin** için WT ve NWT oranları eşit olup %50–%50 düzeyindedir.
- **Eritromisin** için ise WT oranı %62,5, NWT oranı %37,5 olarak hesaplanmıştır.

Bu bulgular, *V. salmoninarum* suşlarında Florfenikol ve Eritromisin'e karşı genel olarak **iyi düzeyde duyarlılık** bulunduğunu, buna karşın Oksitetrasiklin için **belirgin bir direnç eğilimi** olduğunu göstermektedir. İzolatlara ait inhibisyon zon çapları Tablo 26'da ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Tablo 26. *Vagococcus salmoninarum* İzolatlarının Disk Difuzyon Yöntemine İlişkin Antimikrobiyal Duyarlılık Sonuçları

İzolat No	Bakteri Türü	**Antimikrobiyal Etken**						
		***ENR**	**FFC ≥ 21**	***AMC**	***TE**	**OTC ≥ 22**	****SXT**	**E ≥ 21**
1	*V. salmoninarum*	40	32	20	26	26	20	28
3	*V. salmoninarum*	38	36	22	26	10	26	26
8	*V. salmoninarum*	30	26	16	28	10	28	28
10	*V. salmoninarum*	40	38	32	28	28	30	30
81	*V. salmoninarum*	40	40	32	20	10	30	36
114	*V. salmoninarum*	30	40	40	26	26	28	28
116	*V. salmoninarum*	40	40	32	28	28	20	28
418	*V. salmoninarum*	40	40	30	20	10	20	30

Kırmızı renkli hücreler dirençli disk difüzyon değerlerini, yeşil renkli hücreler duyarlı disk difüzyon değerlerini göstermektedir. *: Belirtilen antibiyotiklerin sınır değerleri CLSI/EUCAST kataloklarında yer almaması nedeniyle değerlendirme yapılmamıştır.

Veriler incelendiğinde, örneğin **izolat no: 10, 114, 116** gibi suşların Florfenikol ve Eritromisin'e karşı yüksek inhibisyon zon çaplarıyla duyarlılık gösterdiği görülürken; **izolat no: 81 ve 418** gibi suşlar Oksitetrasiklin ve Eritromisin'e karşı **daha düşük zon çaplarıyla dirençli fenotip** sergilemiştir. Tablodaki **renk kodlaması**, değerlendirmeyi kolaylaştırmak amacıyla şu şekilde kullanılmıştır:

- **Yeşil hücreler**: WT (duyarlı) fenotipleri,
- **Kırmızı hücreler**: NWT (dirençli) fenotipleri göstermektedir.
- Gri hücreler (bu tabloda yer almamakla birlikte), sınır değeri literatürde tanımlanmamış antibiyotik–izolat kombinasyonlarını ifade eder.

Sonuçlar, *V. salmoninarum* izolatlarında **Florfenikol ve Eritromisin'in hâlâ etkili seçenekler olduğunu**, ancak **Oksitetrasiklin kullanımı konusunda dikkatli olunması gerektiğini** ortaya koymaktadır. Direnç eğilimlerinin gelecekte daha net anlaşılabilmesi için, tür bazlı duyarlılık verilerinin daha geniş örneklem gruplarıyla desteklenmesi önerilmektedir.Bu sonuçlara göre örneğin **izolat no: 180, 204, 257, 287** gibi bazı *L. petauri* suşları birçok antimikrobiyale karşı yüksek inhibisyon zon çaplarıyla WT sınıfına girerken, özellikle Oksitetrasiklin'e karşı düşük zon çapları gösteren **izolat no: 165, 190, 202** gibi suşlarda dirençli fenotipler dikkat çekmiştir.

Tabloda kullanılan **renk kodlaması**, verilerin görsel olarak değerlendirilmesini kolaylaştırmaktadır:

- **Yeşil hücreler**, duyarlı (WT) izolatları,
- **Kırmızı hücreler**, dirençli (NWT) izolatları,
- **Gri hücreler** ise CLSI/EUCAST veya literatürde sınır değeri bulunmadığından değerlendirilemeyen sonuçları göstermektedir.

Genel değerlendirme, *L. petauri* izolatlarında **Florfenikol, Eritromisin ve AMC** gibi ajanların hâlen etkili tedavi seçenekleri olduğunu; ancak özellikle **Tetrasiklin grubu antibiyotiklere karşı dikkat çekici düzeyde direnç geliştiğini** göstermektedir. Bu durum, kültür balıkçılığında antimikrobiyal seçiminin, tür düzeyinde duyarlılık testlerine dayalı olarak yapılmasını zorunlu kılmaktadır.

Bu tabloda yer alan veriler ışığında, özellikle FFC ve TE ajanlarına karşı yüksek zon çapları gözlenen birçok suşun (örneğin izolat no: 87, 240, 122) **duyarlı (WT)** fenotipte olduğu görülmektedir. Buna karşılık, inhibisyon zon çapları Florfenikol için 20–24 mm aralığında kalan bazı izolatlar (örneğin izolat no: 208, 414, 437, 518), bu antibiyotiğe karşı **azalmış duyarlılık** göstermiştir.

Tablodaki **renkli hücre kodlaması**, değerlendirmeyi görsel olarak da desteklemektedir:

- **Yeşil hücreler** WT (duyarlı),
- **Kırmızı hücreler** NWT (dirençli),
- **Gri hücreler** ise değerlendirme yapılacak referans değerin mevcut olmadığı durumları temsil etmektedir.

Bu bulgular, *Y. ruckeri* suşlarının tedavisinde Florfenikol'ün halen etkili bir seçenek olduğunu; ancak Tetrasiklin'e karşı gözlenen dirençli fenotiplerin dikkatle izlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Özellikle çoklu antimikrobiyal kullanım geçmişi olan sahalarda, **düzenli duyarlılık testlerinin yapılması** ve **EcoFF temelli izleme programlarının uygulanması**, ileride gelişebilecek direnç yayılımını kontrol altında tutmak açısından önem arz etmektedir.

4.3.8 Epidemiyolojik Eşik Değerlerinin (cut-off: EcoFF) Belirlenmesi

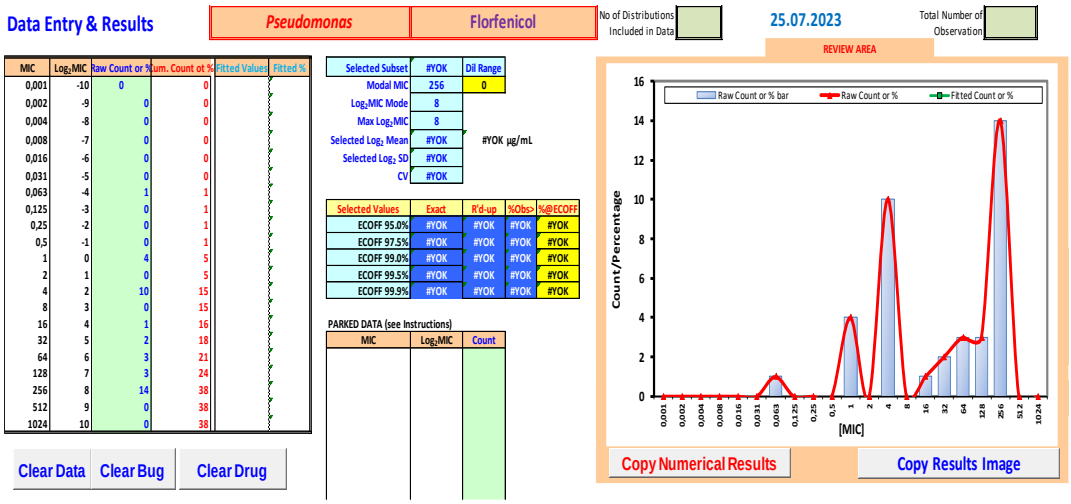
4.3.8.1 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında (n=38) Oksitetrasiklin'e Karşı Epidemiyolojik Eşik Değer (EcoFF) Analizleri

Disk difüzyon testlerinde *Pseudomonas spp.* izolatları için antibiyotik duyarlılıklarına ilişkin bilgiler **EUCAST** ve **CLSI** tarafından sınırlı olarak tanımlanmıştır. EUCAST (2020, Sürüm 10.0) verilerine göre, sadece **Siprofloksasin (CIP)** için *Pseudomonas spp.*'ye ait ECV değeri verilmiş olup, **inhibisyon zonu 50 mm'nin üzerinde olan izolatlar duyarlı**, 26–50 mm aralığında olanlar ise **orta derecede dirençli** kabul edilmektedir. CLSI ise *Pseudomonas spp.* için Oksitetrasiklin'e özgü bir ECV değeri bildirmemektedir. Bu nedenle bu projede, epidemiyolojik eşik değerin belirlenmesinde **EcoFFinder** ve **NRI** gibi epidemiyolojik dağılım temelli modelleme yöntemleri kullanılmıştır.

4.3.8.1.1 *Pseudomonas spp.* izolatlarının Oksitetrasiklin'e karşı MIC dağılımı ve epidemiyolojik eşik değerin EcoFFinder yöntemiyle belirlenmesi

Proje kapsamında 38 *Pseudomonas spp.* izolatı üzerinde **broth mikrodilüsyon yöntemi** ile yapılan Oksitetrasiklin duyarlılık test sonuçları EcoFFinder analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen MIC dağılımı **unimodal** bir yapı göstermiştir (Şekil 2). Yapılan analizde:

- İzolatların %97,5'ini inhibe eden konsantrasyon değeri **16 µg/mL** olarak hesaplanmıştır.
- Bu değerin, Oksitetrasiklin için *Pseudomonas spp.* izolatlarında **epidemiyolojik eşik değeri (EcoFF/ECV)** olarak kabul edilebileceği belirlenmiştir.
- Analiz sonuçlarına göre 38 izolatın **36'sı doğal fenotip (WT)**, yalnızca **2'si doğal olmayan fenotip (NWT)** olarak sınıflandırılmıştır.
- Hesaplanan **standart sapma (SD)** değeri önerilen sınırlar içerisinde kalmış ve dağılımın güvenilirliği teyit edilmiştir.

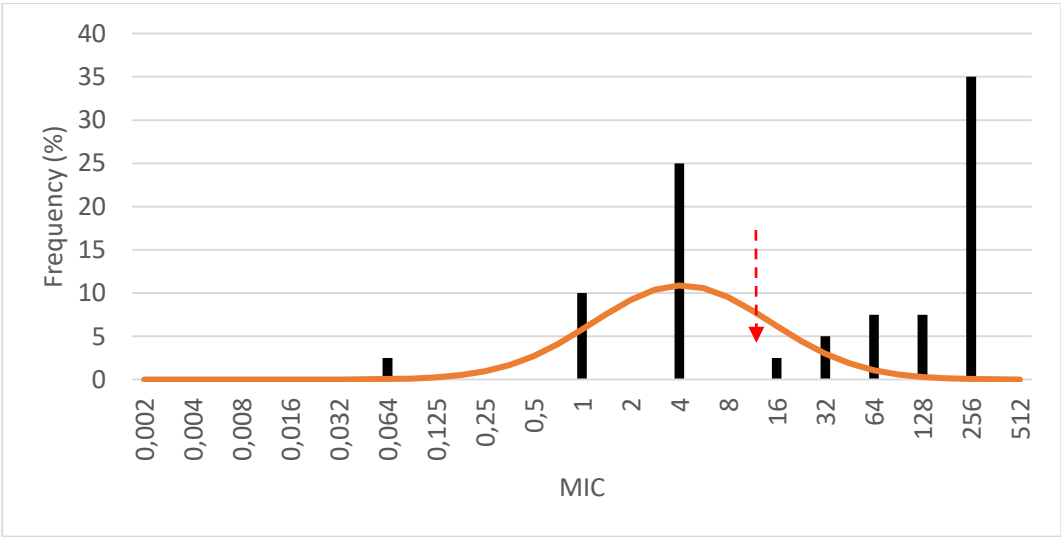


Şekil 2. *Pseudomonas* spp. izolatlarının Oksitetrasiklin'e karşı MIC dağılımı ve epidemiyolojik eşik değerin EcoFFinder yöntemiyle belirlenmesi.

4.3.8.1.2 NRI (Normalize Edilmiş Direnç Yorumlama) Yöntemi Bulguları

EcoFF analizine ek olarak, izolatlara ait MIC değerleri **NRI spreadsheet yazılımına** yüklenerek Normalize Edilmiş Direnç Yorumlaması yapılmıştır. NRI analizinde:

- MIC dağılımı yine **unimodal** bir özellik göstermiştir.
- Hesaplanan standart sapma (SD) değeri **0,7805** olarak belirlenmiş olup, bu değer literatürde önerilen güvenilirlik sınırları içerisindedir.
- NRI yöntemine göre Oksitetrasiklin için **epidemiyolojik eşik değeri (COwt) 8 µg/mL** olarak hesaplanmıştır.
- Bu yöntemle yapılan analizde, **31 izolat WT (%81,58)**, **7 izolat ise NWT (%18,42)** olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. NRI analizinde oksitetrasikline karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarında MIC

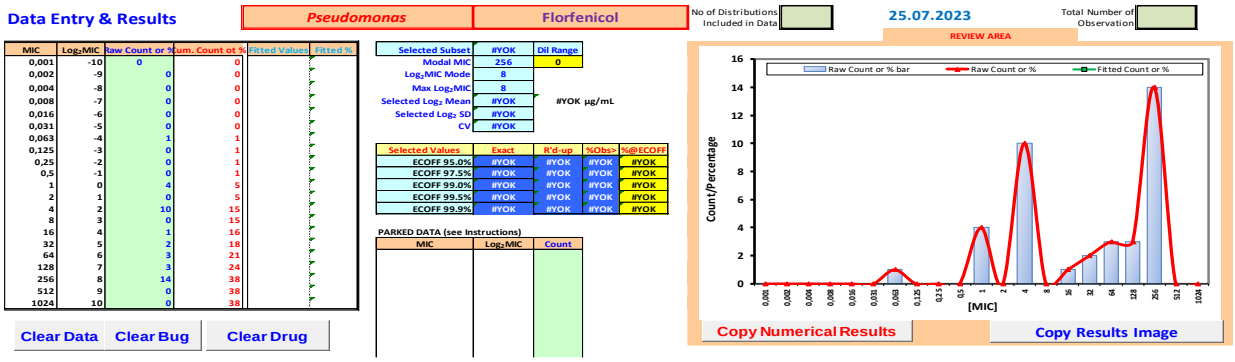
değerlerinin dağılımı

Her iki yöntemle elde edilen veriler birbiriyle uyumlu olmakla birlikte, **EcoFFinder yönteminde hesaplanan eşik değer (16 µg/mL)**, **NRI yöntemine kıyasla daha yüksek bulunmuştur (8 µg/mL)**. Bu fark, yöntemlerin istatistiksel yaklaşım farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Ancak her iki analiz de, izolat popülasyonunda **Oksitetrasiklin'e karşı düşük düzeyde direnç (NWT) bulunduğunu**, ancak büyük çoğunluğun **duyarlı (WT)** fenotipte olduğunu ortaya koymaktadır. Bu tür epidemiyolojik eşik değer analizleri, özellikle referans aralıklarının henüz tanımlanmadığı tür–antibiyotik kombinasyonlarında **klinik sınır değerlerinin yerine geçebilecek güçlü bir değerlendirme aracı** olarak kullanılabilmektedir.

4.3.8.1.3 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında Florfenikol Epidemiyolojik Eşik Değer (EcoFF/COwt) Belirlenmesi

4.3.8.1.3.1 EcoFFinder Yöntemi Bulguları

Proje kapsamında elde edilen 38 *Pseudomonas spp.* izolatına ait **Florfenikol MIC verileri**, EcoFFinder yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Ancak yapılan analizde, **MIC dağılımının standart sapma (SD) değerinin önerilen güvenilirlik sınırlarının dışında olması** nedeniyle, **geçerli bir EcoFF değeri (COwt)** üretilememiştir (Şekil 4).



Şekil 4. EcoFFinder analizinde florfenikole karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve florfenikolün epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi

Bu durum, literatürde de ifade edildiği gibi (Kronvall, 2010), özellikle **farklı türlerin aynı cinste (genus düzeyinde) analize dahil edilmesi** durumunda MIC dağılımının homojenliğini bozarak **unimodal yapıdan sapmasına** ve bu nedenle SD değerinin artmasına neden olmaktadır. Nitekim, tür bazlı analizlerde elde edilen SD değerleri kabul edilebilir sınırda iken, *Pseudomonas spp.* izolatları gibi tür çeşitliliği içeren gruplarda bu tip analiz zorlukları beklenen bir durumdur.

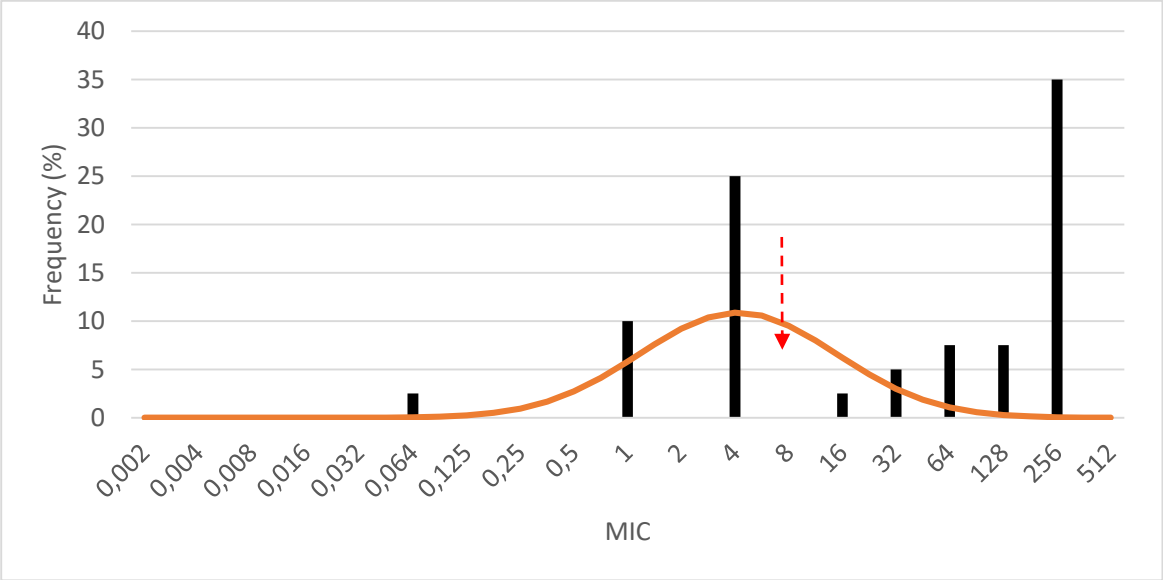
4.3.8.1.3.2 NRI Yöntemi Bulguları

NRI analizinde, Florfenikol için elde edilen SD değeri **2,1548** olarak hesaplanmış ve yazılımın önerdiği güven aralığının teknik olarak dışına çıkmıştır. Ancak literatürde **+2,0 ile +2,5 SD aralığının kabul edilebilir olduğu** bildirilmiş olduğundan (Baron vd. 2021; Smith vd. 2012), hesaplamalar bu çerçevede değerlendirilmiştir.

Bu yaklaşımla Florfenikol için **COwt değeri 8 µg/mL** olarak belirlenmiş ve izolatlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır:

- **23 izolat (%60,53)**: Doğal olmayan fenotip (NWT)
- **15 izolat (%39,47)**: Doğal fenotip (WT)

Bu sonuçlar, test edilen *Pseudomonas spp.* suşlarının çoğunluğunda Florfenikol'e karşı **duyarlılığın azaldığını**, yani **epidemiyolojik olarak dirençli fenotiplerin yaygınlaştığını** ortaya koymaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. Florfenikol'e karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarında MIC dağılımı ve COwt hesaplaması (NRI yöntemi).

Florfenikol, su ürünleri sektöründe sıklıkla tercih edilen geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajan olmasına rağmen, bu çalışmada elde edilen bulgular ***Pseudomonas* spp. izolatlarında artan direnç eğilimine** işaret etmektedir. Epidemiyolojik eşik değerin (EcoFF/COwt) belirlenmesi amacıyla yürütülen analizlerde, hem **EcoFFinder** hem de **NRI** yöntemleri kullanılmış ancak bu yöntemlerin her biri farklı sınırlamalar ortaya koymuştur.

EcoFFinder analizinde, izolatlara ait MIC dağılımı **standart sapma değerinin önerilen güvenilirlik sınırlarının dışında kalması** nedeniyle geçerli bir EcoFF değeri üretilememiştir. Bu durum, muhtemelen analizde yer alan izolatların farklı türleri (örneğin *P. fluorescens*, *P. koreensis* vb.) temsil etmesinden ve bu çeşitliliğin dağılımın unimodal yapısını bozmasından

kaynaklanmaktadır. Bu da, genus düzeyinde yapılan analizlerin fenotip ayrımı açısından **istatistiksel olarak kısıtlı yorum gücü taşıdığını** göstermektedir. **NRI analizinde** ise benzer bir durum söz konusu olmakla birlikte, elde edilen **standart sapma değeri (SD=2,15)** literatürde kabul edilebilir aralıkta değerlendirilmiştir (Smith ve ark., 2012; Baron ve ark., 2021). Bu değerlendirme doğrultusunda Florfenikol için **epidemiyolojik eşik değeri (COwt) 8 µg/mL** olarak hesaplanmıştır. Bu değere göre 38 izolatın **%60,53'ü dirençli fenotip (NWT)**, yalnızca **%39,47'si doğal fenotip (WT)** olarak sınıflandırılmıştır.

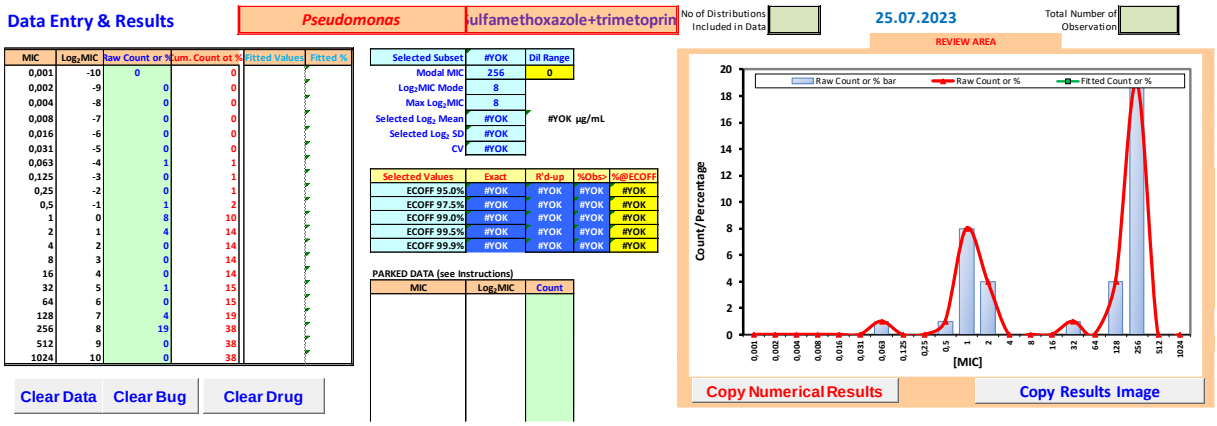
Bu bulgular, ***Pseudomonas* spp. suşlarında Florfenikol'e karşı direnç oranının yüksek olduğunu** göstermekte ve bu ajanın özellikle bu cins içerisindeki bazı türlerde etkisini yitirmeye başladığına işaret etmektedir. Özellikle, su ürünleri yetiştiriciliğinde **rastgele antibiyotik kullanımının yaygın olduğu üretim alanlarında** bu tür direnç eğilimleri hızla yayılabilmektedir.

Sonuç olarak, **Florfenikol'ün tedavi aracı olarak etkinliğini sürdürüp sürdürmediğinin tür düzeyinde ayrı ayrı izlenmesi**, aynı zamanda farklı bölgelere ait izolatlarla epidemiyolojik çalışmaların devam ettirilmesi gerekmektedir. Tür bazlı EcoFF analizlerinin yapılabilmesi, hem fenotip ayrımını daha güvenilir hale getirecek hem de **klinik karar verme süreçlerine daha güçlü bilimsel temel** sunacaktır.

4.3.8.1.4 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında Sulfametoksazol + Trimetoprim (SXT) İçin Epidemiyolojik Eşik Değer (EcoFF/COwt) Belirlenmesi

4.3.8.1.4.1 EcoFFinder Yöntemi Bulguları

Proje kapsamında, 38 adet *Pseudomonas spp.* izolatının **SXT** (Sulfametoksazol + Trimetoprim) antibiyotiğine karşı duyarlılığı, **broth mikrodilüsyon yöntemiyle** belirlenen MIC değerleri kullanılarak **EcoFFinder** yazılımında analiz edilmiştir. Ancak bu analizde elde edilen **standart sapma (SD) değerleri**, yazılımın kabul ettiği aralıkların dışında bulunmuştur. Bu nedenle **epidemiyolojik eşik değer (ECV/COwt)** hesaplaması yapılamamış ve **geçerli bir unimodal dağılım oluşturulamamıştır** (Şekil 6). Bu durum, MIC değerlerinin populasyon içerisinde homojen dağılmadığını ve analizde yer alan izolatların türler arası farklılıklar taşıyor olabileceğini göstermektedir.



Şekil 6. EcoFFinder analizinde sulfamethoksazol+trimetoprime karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve sulfamethoksazol+trimetoprimin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi

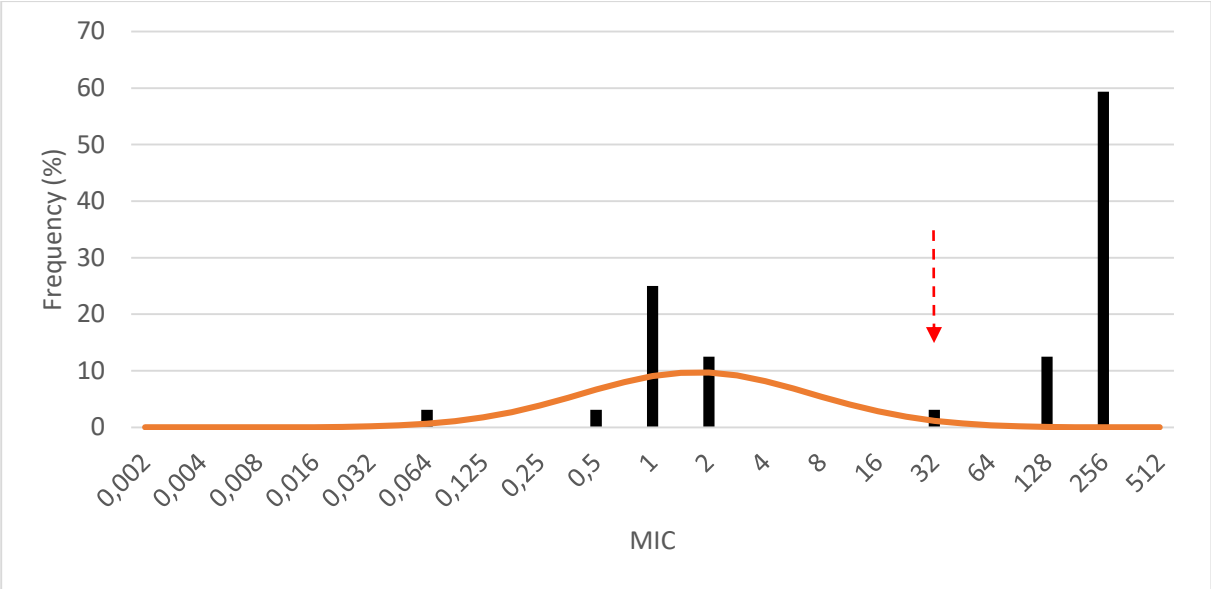
4.3.8.1.4.2 NRI Yöntemi Bulguları

Alternatif olarak kullanılan **Normalize Edilmiş Direnç Yorumlama (NRI)** yönteminde, aynı MIC verileriyle yapılan analizde **standart sapma değeri (SD = 2,038)** hesaplanmıştır. Her ne kadar bu değer yazılımın ön tanımlı güven aralığı dışında görünse de, mevcut literatür (Baron ve ark., 2021; Smith ve ark., 2012) ışığında **+2,0 ± 2,5 aralığındaki SD değerleri kabul edilebilir** olarak değerlendirilmektedir.

Bu doğrultuda yapılan hesaplamalarda **COwt değeri 32 µg/mL** olarak belirlenmiştir. Bu eşik değer baz alınarak yapılan fenotipik sınıflamada:

- **23 izolat (%60,53)**: Doğal olmayan fenotip (NWT)
- **15 izolat (%39,47)**: Doğal fenotip (WT)

olarak değerlendirilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. NRI analizinde sulfamethoksazol+trimetoprime karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarında MIC dağılımı ve COwt hesaplaması.

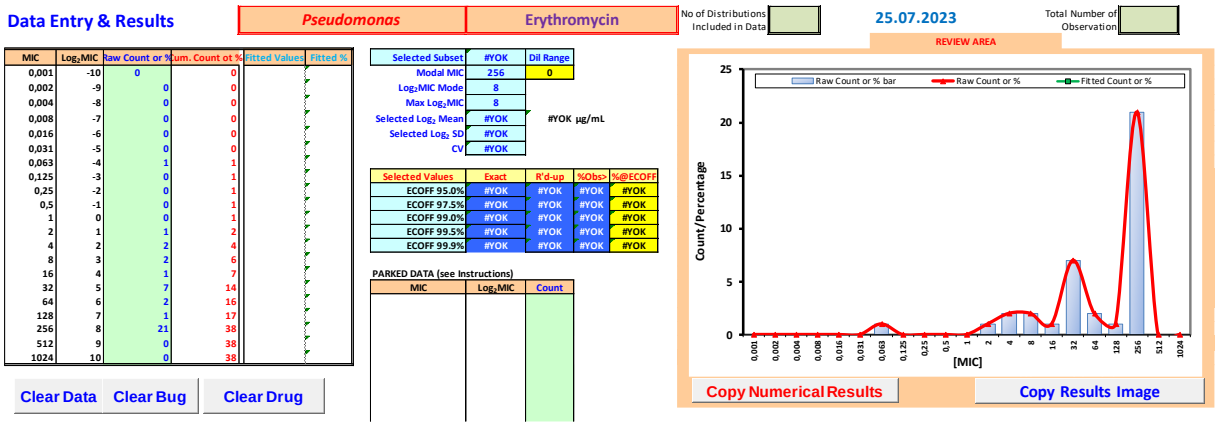
Yapılan analizler, *Pseudomonas spp.* izolatlarında SXT'ye karşı **genel olarak dirençli fenotiplerin baskın olduğunu** ortaya koymaktadır. EcoFFinder analizinin güvenilir sonuç üretememesi, türler arası değişkenliğin MIC dağılımını bozduğunu ve bu nedenle genus düzeyindeki analizlerin sınırlı yorum gücüne sahip olduğunu göstermektedir. Öte yandan NRI yöntemi, daha esnek değerlendirme kriterleri sayesinde bu eksikliği kısmen gidermiş ve anlamlı bir eşik değer hesaplamasına olanak sağlamıştır.

Bu sonuçlar, SXT gibi kombine antibiyotiklerin *Pseudomonas spp.* gibi heterojen bakteri gruplarında kullanımı öncesinde **duyarlılık testlerinin mutlaka yapılması gerektiğini**, ayrıca **tür düzeyinde ayrıştırılmış epidemiyolojik analizlerin** direnç izleme açısından daha güvenilir sonuçlar vereceğini göstermektedir.

4.3.8.1.5 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında Eritromisin İçin Epidemiyolojik Eşik Değer (EcoFF/COwt) Belirlenmesi

4.3.8.1.5.1 EcoFFinder Yöntemi Bulguları

Pseudomonas spp. izolatlarının **eritromisin** antimikrobiyaline karşı duyarlılıklarını belirlemek amacıyla yürütülen EcoFFinder analizinde, elde edilen MIC değerlerinin dağılımı incelenmiştir. Ancak analiz sonucunda **standart sapma (SD)** değerinin önerilen güvenilirlik sınırlarının **önemli ölçüde dışında** olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, analiz geçerli bir **epidemiyolojik eşik değeri (ECV/COwt)** üretememiştir (Şekil 8).

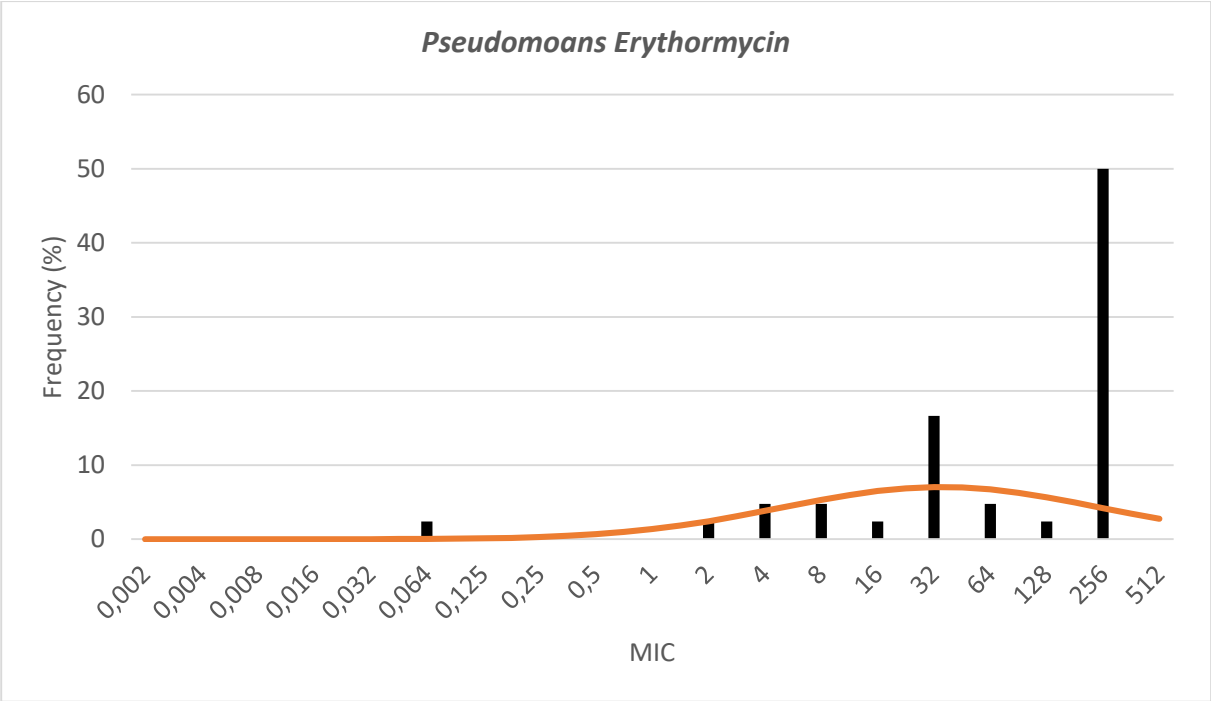


Şekil 8. EcoFFinder analizinde eritromisine karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve eritromisinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi

Bu durumun başlıca nedeni, eritromisinin esas olarak **gram pozitif bakterilere karşı etkili olması**, oysa *Pseudomonas spp.* türlerinin **gram negatif** karakter taşımasıdır. Ayrıca bu ajanın **saha uygulamalarında *Pseudomonas* suşlarına karşı yaygın olarak kullanılmaması**, izolatların bu antibiyotiğe karşı doğal dirençli olmasına ve MIC dağılımının sağlıksız görünmesine neden olmuş olabilir.

4.3.8.1.5.2 NRI Yöntemi Bulguları

NRI analizine göre de benzer bir durum söz konusudur. Eritromisin için yapılan analizde **standart sapma (SD) değeri 2,83** olarak hesaplanmış ve bu değer, yazılımın kabul edilebilir sınırlarının oldukça dışındadır. Bu nedenle **güvenilir bir COwt değeri belirlenememiş**, **WT/NWT ayrımı yapılamamıştır** (Şekil 9).



Şekil 9. *Pseudomonas* spp. izolatlarının eritromisine karşı NRI analizine göre MIC dağılımı

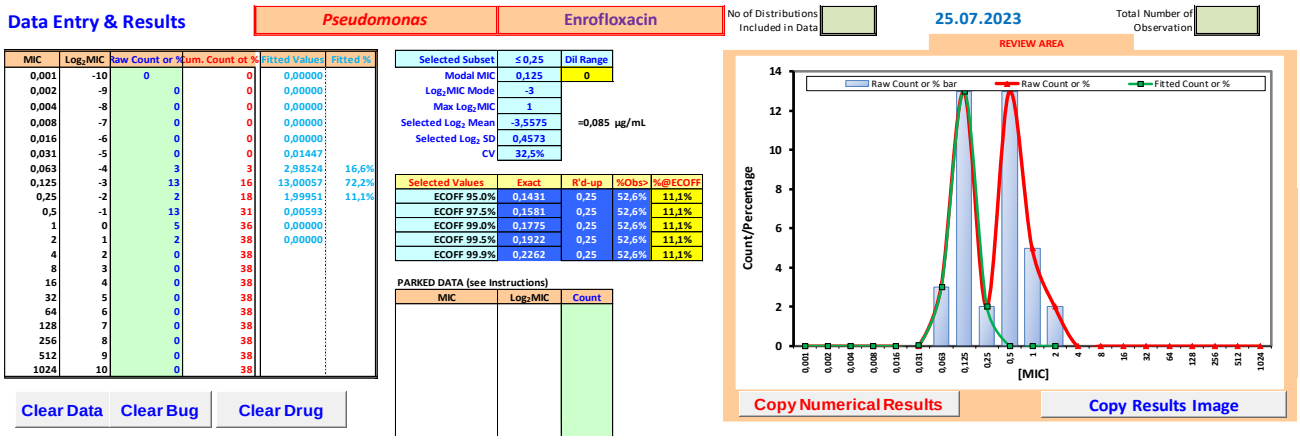
Elde edilen sonuçlar, **eritromisinin *Pseudomonas spp.* izolatlarında epidemiyolojik eşik değeri belirlemeye uygun olmadığını** göstermektedir. Bu, hem **doğal direnç profili** hem de **klinik kullanım eksikliği** ile ilişkilidir. Dolayısıyla, bu antibiyotiğin *Pseudomonas* türlerine yönelik epidemiyolojik analizlerde referans ilaç olarak değerlendirilmesi **bilimsel olarak önerilmemektedir**.

4.3.8.1.6 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında Enrofloksasin İçin Epidemiyolojik Eşik Değer (EcoFF/COwt) Belirlenmesi

4.3.8.1.6.1 EcoFFinder Yöntemi Bulguları

Proje kapsamında elde edilen 38 *Pseudomonas spp.* izolatına ait **Enrofloksasin MIC değerleri**, EcoFFinder yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda MIC dağılımının **unimodal** olduğu ve **standart sapma (SD)** değerinin önerilen sınırlar içinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu doğrultuda:

- **Epidemiyolojik eşik değeri (ECV/COwt): 0,25 µg/mL**
- Bu eşik değer, izolatların **%97,5'ini inhibe eden konsantrasyon** olarak hesaplanmıştır.
- Elde edilen eşik değere göre:
  - **20 izolat (%52,63)**: Doğal olmayan fenotip (NWT)
  - **18 izolat (%47,37)**: Doğal fenotip (WT) olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 10).



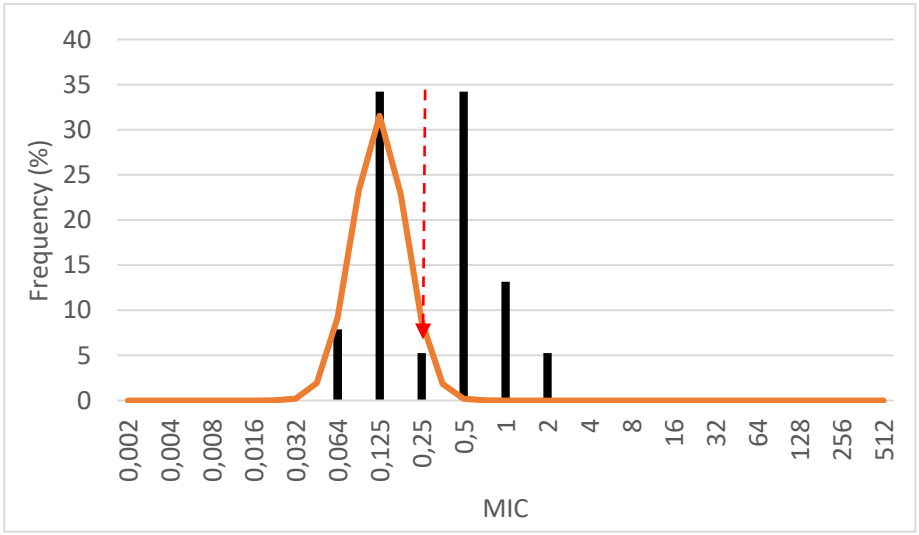
Şekil 10. EcoFFinder analizinde enrofloksasine karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve COwt hesaplaması.

4.3.8.1.6.2 NRI Yöntemi Bulguları

NRI analizinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. MIC verileri üzerinden yapılan hesaplamalarda: **standart sapma (SD): 0,6151, COwt değeri: 0,25 µg/mL** olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3.2.5.2).

Bu değer, EcoFFinder analizinde elde edilen eşik değerle tamamen **uyumlu** bulunmuştur. WT ve NWT dağılımı da aynı şekilde belirlenmiştir:

- **20 izolat (%52,63)**: NWT
- **18 izolat (%47,37)**: WT olduğu respit edilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. NRI analizinde enrofloksasine karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve eşik değerin belirlenmesi.

Yapılan her iki analiz yöntemi de (EcoFFinder ve NRI), *Pseudomonas spp.* izolatlarında **Enrofloksasin'e karşı önemli düzeyde direnç geliştiğini** göstermektedir. Her iki analizde aynı COwt değeri (0,25 µg/mL) elde edilmiş ve **%52,63 oranında izolatın NWT fenotipte** olduğu belirlenmiştir. Bu durum, özellikle florokinolon grubu antibiyotiklerin *Pseudomonas* türlerine karşı etkinliğinde **azalma eğilimi** olduğunu ve sahadaki kullanım kararlarında bu antibiyotiğin **duyarlılık testleri yapılmadan kullanılmaması gerektiğini** ortaya koymaktadır.

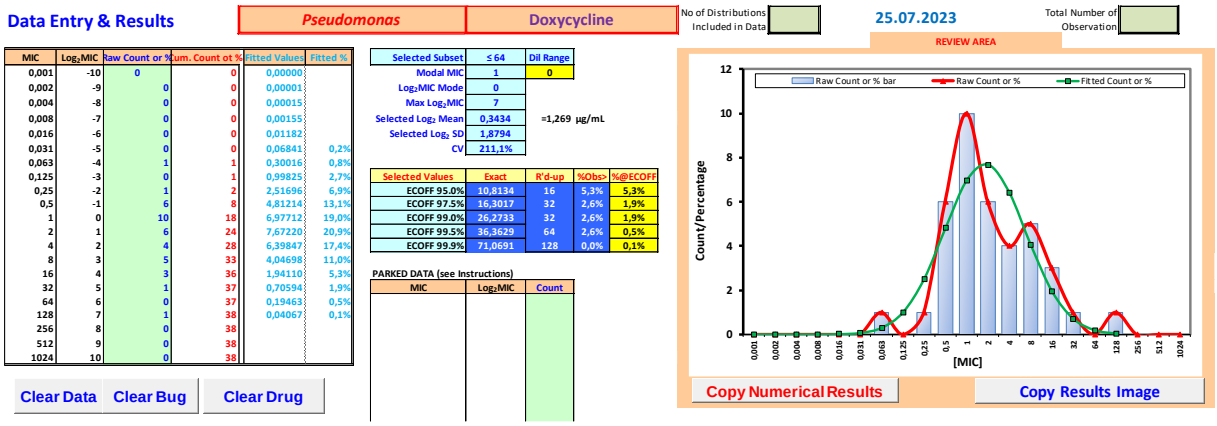
4.3.8.1.7 *Pseudomonas spp.* İzolatlarında Doksisiklinin Epidemiyolojik Eşik Değerinin (EcoFF/COwt) Belirlenmesi

4.3.8.1.7.1 EcoFFinder Yöntemi Bulguları

Proje kapsamında elde edilen 38 *Pseudomonas spp.* izolatına ait doksisiklin MIC değerleri, EcoFFinder yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda:

- **Standart sapma (SD)** değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu tespit edilmiştir.
- **Epidemiyolojik eşik değeri (ECV/COwt): 32 µg/mL**
- Bu eşik değerde, izolatların **%97,5'i inhibe** edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, yalnızca **1 izolat (%2,63) doğal olmayan fenotipte (NWT)**, geri kalan **37 izolat (%97,37)** ise **doğal fenotipte (WT)** sınıflandırılmıştır (**Şekil 12)**.



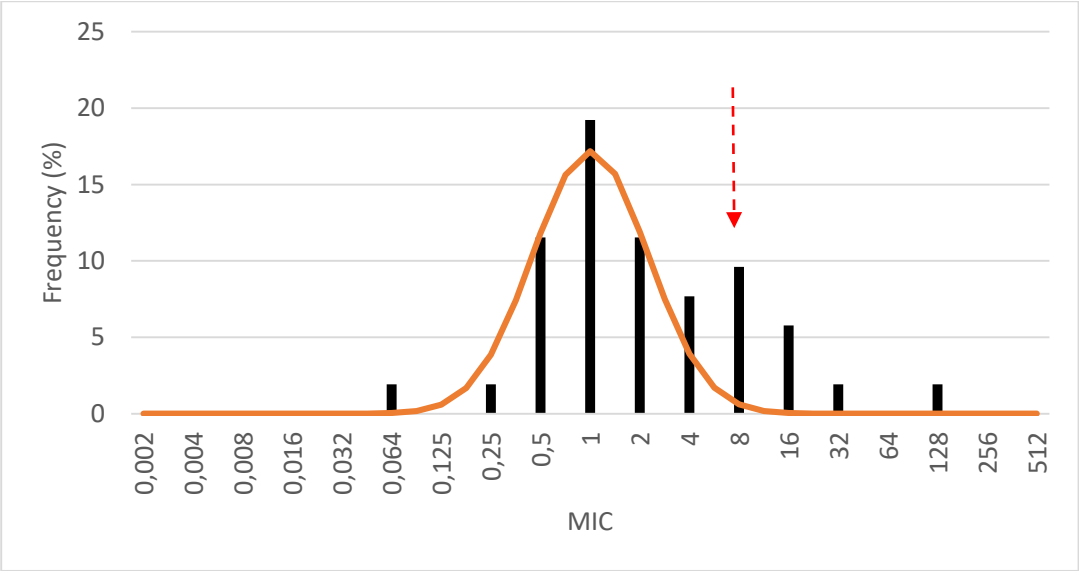
Şekil 12. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve eşik değerin belirlenmesi.

4.3.8.1.7.2 NRI Yöntemi Bulguları

NRI analizine göre:

- **Standart sapma (SD): 1,15**
- Bu değer, kabul edilebilir aralıkta bulunmuştur.
- Yapılan hesaplamalar sonucunda:
  - **ECV (COwt) değeri: 8 µg/mL**

- **NWT fenotip: 5 izolat (%13,16)**
- **WT fenotip: 33 izolat (%86,84)** olarak belirlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. NRI analizinde doksisikline karşı *Pseudomonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve COwt belirlenmesi.

Doksisiklin'e yönelik yapılan her iki analizde de **güvenilir dağılımlar** elde edilmiştir. Ancak:

- EcoFFinder yönteminde belirlenen **COwt değeri 32 µg/mL**,
- NRI yönteminde ise bu değer **8 µg/mL** olarak hesaplanmıştır.

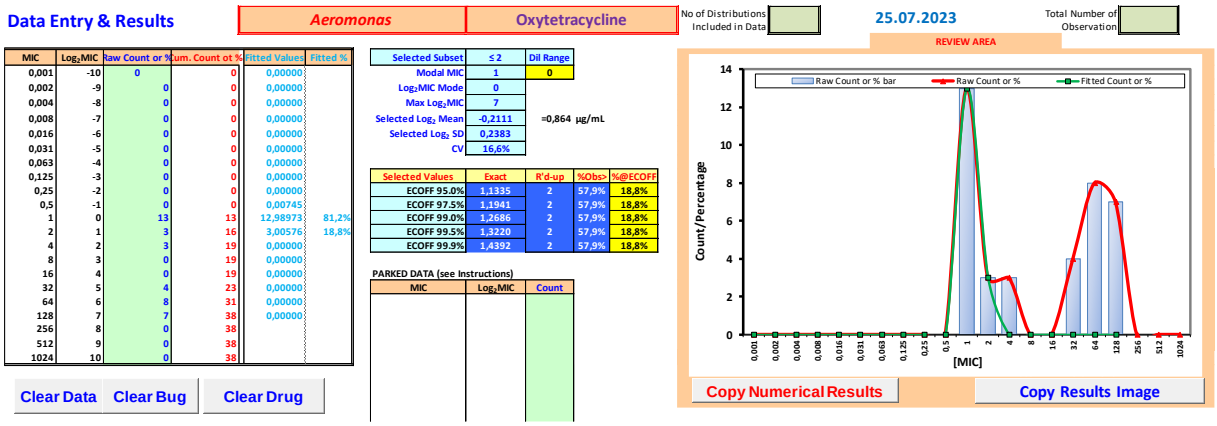
Bu farkın temel nedeni, iki yöntemin **hesaplama algoritmaları ve dağılım varsayımlarındaki farklılıktır**. Her iki analizde de **izolatların büyük çoğunluğu WT fenotipte** bulunmuş ve bu da **doksisiklinin *Pseudomonas* spp. izolatları üzerinde yüksek düzeyde etki potansiyeline sahip olduğunu** göstermektedir.

4.3.8.2 *Aeromonas* spp. izolatlarında Oksitetrasiklinin(n=38) Epidemiyolojik Eşik Değerinin (EcoFF/COwt) Belirlenmesi

Bu çalışmada ***Aeromonas* spp. (n=38)** izolatlarının **oksitetrasiklin** antibiyotiğine karşı antimikrobiyal duyarlılıkları **broth mikrodilüsyon yöntemiyle** belirlenmiş; elde edilen MIC değerleri **EcoFFinder** ve **NRI** analiz metotlarıyla değerlendirilmiştir.

4.3.8.2.1 EcoFFinder Analizi Sonuçları

EcoFFinder analizinde, *Aeromonas* spp. izolatlarının oksitetrasikline karşı MIC dağılımlarının **unimodal karakter** gösterdiği ve **standart sapma (SD)** değerinin yazılımın kabul edilebilir sınırları içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda izolatların %97,5'ini inhibe eden **epidemiyolojik eşik değer (ECV) 2 µg/mL** olarak hesaplanmıştır (Şekil 14).

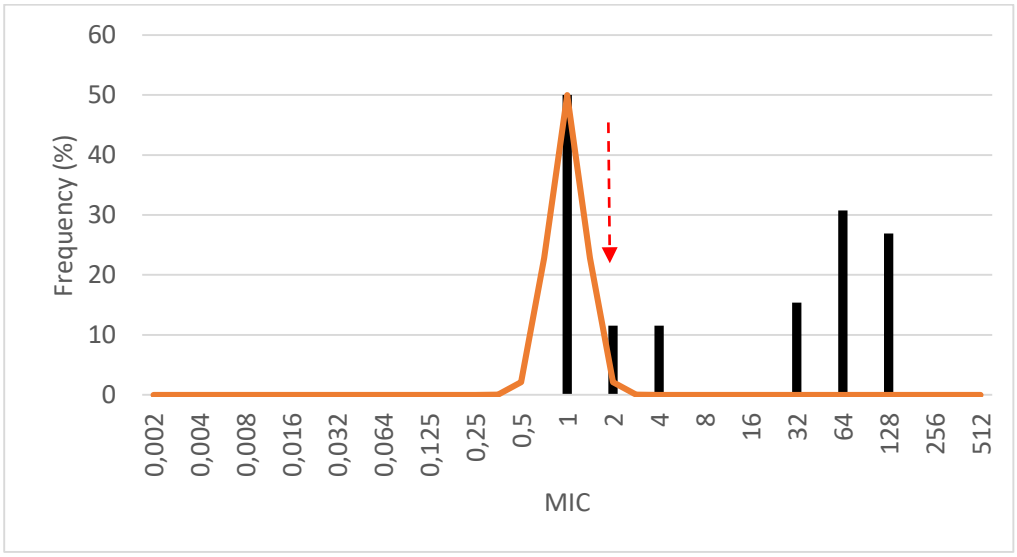


Şekil 14. EcoFFinder analizinde oksitetrasikline karşı *Aeromonas* spp. izolatlarında MIC konsantrasyon dağılımları ve oksitetrasiklinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi

Bu eşik değere göre, izolatlardan **19'u (%50) WT (doğal fenotip)**, **19'u ise NWT (doğal olmayan fenotip)** olarak sınıflandırılmıştır. Yapılan analizlerde izolatların antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarının unimodal dağılım gösterdiği ve hesaplamalarda standart sapma değerinin önerilen aralıkta olduğu belirlenmiştir. Bu durum, *Aeromonas* spp. izolatlarında oksitetrasiklin direncinin önemli bir düzeye ulaştığını göstermektedir.

4.3.8.2.2 NRI Yöntemi Sonuçları

Aynı veri kümesi üzerinden yapılan NRI analizinde, MIC değerlerinin **standart sapma (SD)** değeri **0,371** olarak hesaplanmış ve bu değerin önerilen aralıklar içinde olduğu belirlenmiştir. NRI analizine göre, **epidemiyolojik eşik değeri (COwt)** de **2 µg/mL** olarak hesaplanmış ve bu sonuç **EcoFFinder ile tam uyum** göstermiştir (Şekil 15).



Şekil 15. NRI analizinde doksisikline karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve

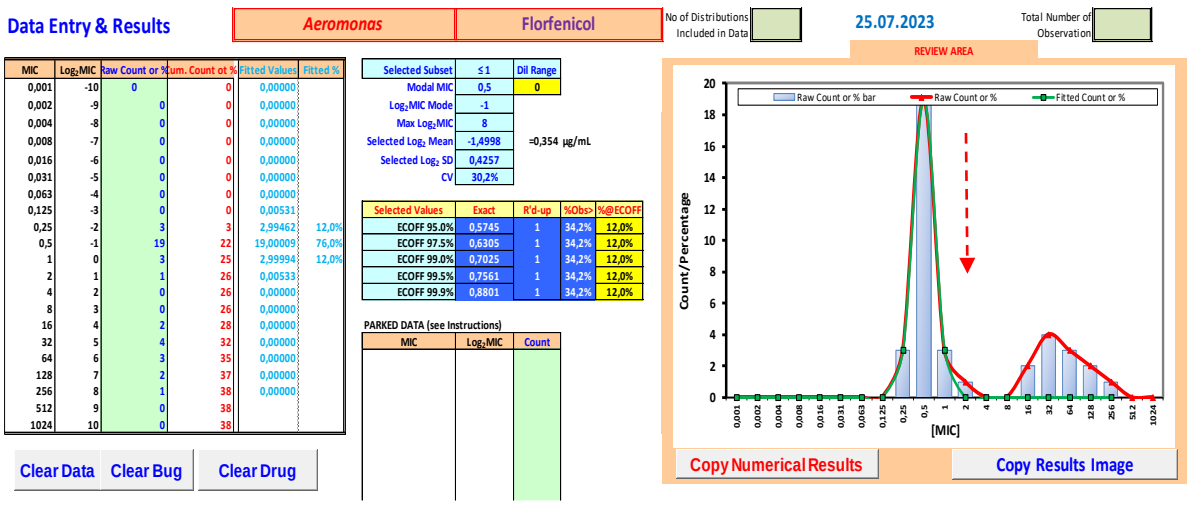
COwt belirlenmesi.

Oksitetrasiklin, **sıklıkla balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan tetrasiklin türevi** bir antibiyotiktir. Bu çalışmada *Aeromonas* spp. izolatlarının %50'sinde doğal olmayan fenotip (NWT) varlığı, bu antibiyotiğe karşı **geniş çapta direnç gelişimi bulunduğunu** göstermektedir. EcoFFinder ve NRI analizlerinin tamamen uyumlu sonuçlar vermesi, belirlenen **2 µg/mL'lik ECV/COwt değerinin** istatistiksel güvenilirliğini güçlendirmektedir.

Bu bulgular, **oksitetrasiklinin klinik etkinliğinin *Aeromonas* spp. suşlarına karşı azalmakta olduğunu**, dolayısıyla **tedavi protokollerinin güncellenmesi** ve **alternatif antibakteriyel ajanlara yönelimin gerekliliğini** ortaya koymaktadır. Aynı zamanda, antimikrobiyal direnç eğilimlerinin düzenli olarak **moleküler düzeyde izlenmesi**, gelecekteki balık sağlığı stratejileri açısından büyük önem taşımaktadır.

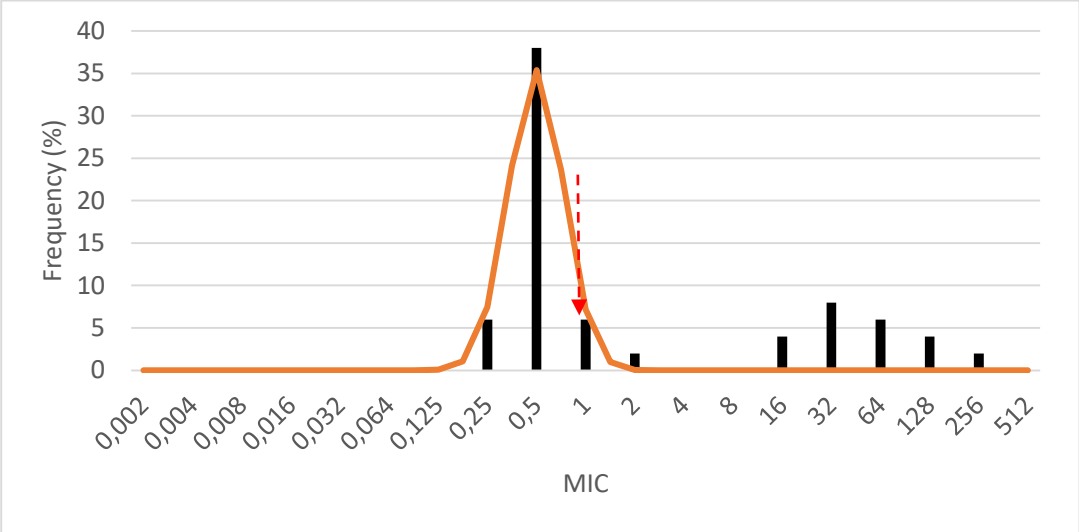
4.3.8.2.3 *Aeromonas* spp. İzolatlarında Florfenikolün Epidemiyolojik Eşik Değerinin (EcoFF/COwt) Belirlenmesi

Bu çalışmada ***Aeromonas* spp. (n=38)** izolatlarının **Florfenikol** antibiyotiğine karşı antimikrobiyal duyarlılıkları **broth mikrodilüsyon yöntemiyle** belirlenmiş; elde edilen MIC verileri **EcoFFinder** ve **NRI** analizlerine tabi tutulmuştur. *Aeromonas* spp. (n=38) izolatlarına karşı yapılan florfenikol duyarlılık testlerinde, hem EcoFFinder hem de NRI analiz yöntemleri kullanılarak epidemiyolojik eşik değer (ECV) tespit edilmiştir. **EcoFFinder analizine** göre, MIC konsantrasyon dağılımlarının unimodal özellik gösterdiği ve **standart sapma (SD)** değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde yer aldığı belirlenmiş, bu doğrultuda **epidemiyolojik eşik değer (ECV)** 1 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu eşik değerde izolatların %97.5'inin inhibe edildiği görülmüş, buna göre 25 izolat (%65.79) **doğal (WT)**, 13 izolat (%34.21) ise **doğal olmayan (NWT)** fenotipte sınıflandırılmıştır (Şekil 16).



Şekil 16. EcoFFinder analizinde florfenikole karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve florfenikolün epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi

Aynı izolatlara ait MIC verileri üzerinde yapılan **NRI analizinde**, SD değeri 0,544 olarak tespit edilmiş ve bu değer literatürde bildirilen kabul edilebilir aralıkla uyumlu bulunmuştur. Bu yöntemle de florfenikol için **COwt değeri** 1 µg/mL olarak hesaplanmış ve EcoFFinder sonuçlarıyla tam uyum göstermiştir (Şekil 17). NRI analizi sonucunda da izolatların %65.79'unun WT, %34.21'inin ise NWT fenotipte olduğu belirlenmiştir.



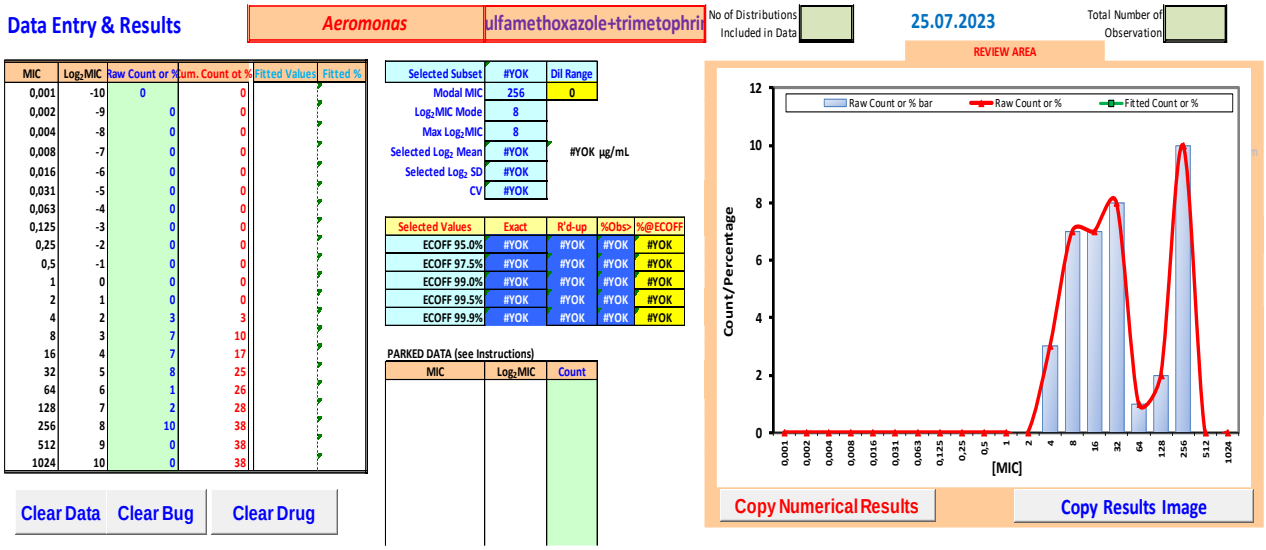
Şekil 17. NRI analizinde florfenikole karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve COwt belirlenmesi.

Bu bulgular, florfenikolün *Aeromonas* spp. üzerinde genel olarak etkili bir ajan olduğunu ortaya koymakla birlikte, izolatların üçte birinden fazlasında edinilmiş direnç mekanizmalarının varlığına işaret eden **doğal olmayan fenotip oranı (%34.21)** dikkat çekicidir. Bu durum, klinik uygulamalarda **florfenikol kullanımına ilişkin dikkatli bir değerlendirme yapılması gerektiğini** ve tür içerisinde direnç gelişimi riskinin göz ardı edilmemesi gerektiğini göstermektedir.

4.3.8.2.4 *Aeromonas* spp. izolatlarında Sulfametkosazol+trimetoprimin EcoFF:ECV değerleri

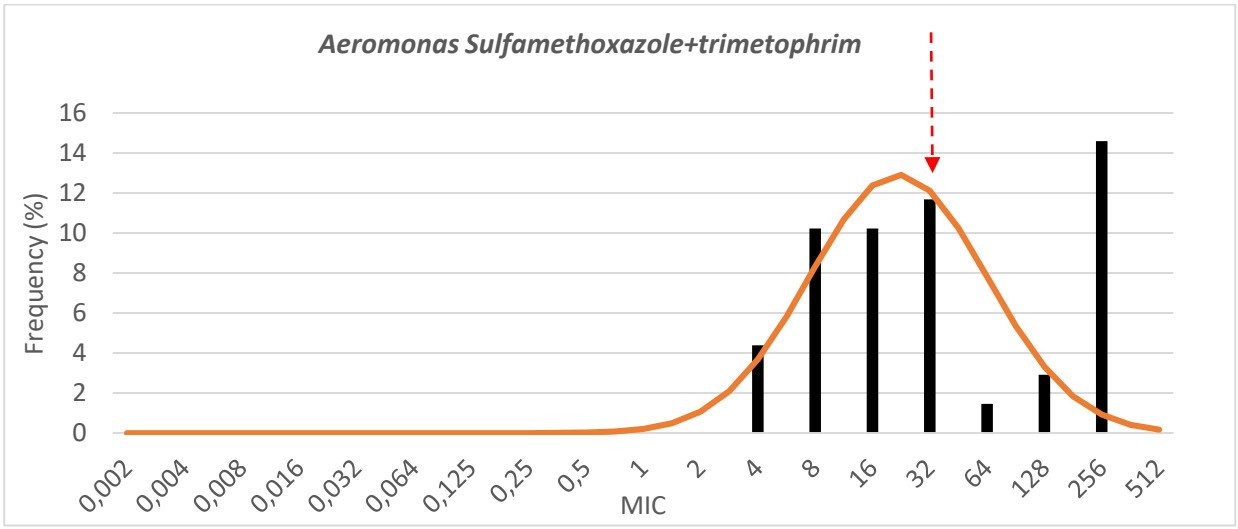
Aeromonas spp. (n=38) izolatlarına yönelik Sulfametoksazol + Trimetoprim (SXT) antibiyotiği için yapılan epidemiyolojik eşik değer analizlerinde hem EcoFFinder hem de NRI yöntemleri kullanılmıştır. **EcoFFinder analizinde**, izolatların MIC dağılımlarının bimodal özellik gösterdiği ve elde edilen **standart sapma (SD)** değerinin yazılımın önerdiği kabul edilebilir sınırların

dışında kaldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle EcoFFinder yöntemiyle güvenilir bir **epidemiyolojik cut-off değeri (ECV)** belirlenememiştir (Şekil 18). Bu durum, izolatlar arasında belirgin fenotipik ayrım olduğunu ve heterojenlik gösteren bir direnç paternine sahip olabileceklerini düşündürmektedir.



Şekil 18. EcoFFinder analizinde sulfamethoksazol+trimetoprime karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve sulfamethoksazol+trimetoprimin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV, COwt) belirlenmesi

Buna karşın, aynı veriler **NRI yöntemi** ile değerlendirildiğinde, SD değeri **1,538** olarak hesaplanmış ve literatürde (Baron ve ark., 2021; Smith ve ark., 2012) belirtilen **+2.0 ile +2.5** aralığındaki kabul edilebilir sınırlar içinde yer aldığı görülmüştür. Bu doğrultuda NRI analizinde Sulfametoksazol + Trimetoprim için **COwt değeri 32 µg/mL** olarak belirlenmiş ve bu eşik değer temelinde tüm izolatların **WT (doğal fenotip)** karakterde olduğu saptanmıştır (Şekil 19).



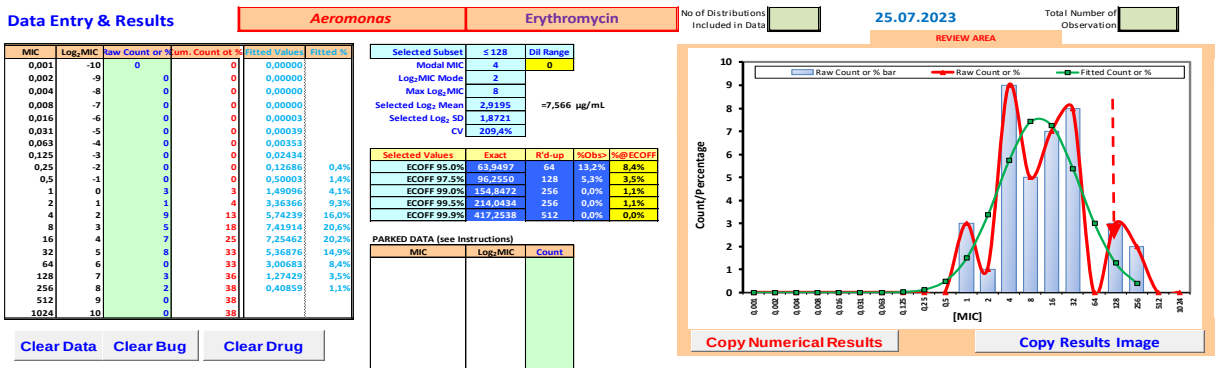
Şekil 19. NRI analizinde sulfamethoksazol+trimetoprime karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC dağılımı ve COwt belirlenmesi.

Bu sonuçlar, ***Aeromonas* spp. izolatlarının tamamının SXT antibiyotiğine karşı doğal duyarlılığını** koruduğunu göstermektedir. Ayrıca elde edilen yüksek COwt değeri, *Aeromonas* spp.'nin bu kombinasyona karşı **doğal olarak düşük duyarlılığa sahip olabileceğini**, ancak bu durumun edinilmiş dirençten ziyade türün **intrinsik duyarlılık profiliyle ilişkili** olabileceğini düşündürmektedir.

4.3.8.2.5 *Aeromonas* spp. izolatlarında Eritromisinin EcoFF:ECV değerleri

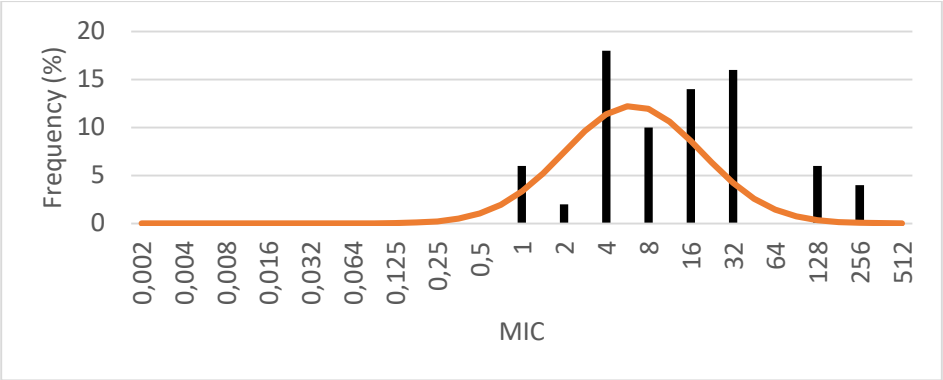
Aeromonas spp. (n=38) izolatlarında eritromisin antibiyotiğine karşı yapılan antimikrobiyal duyarlılık analizleri hem **EcoFFinder** hem de **NRI** yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

EcoFFinder analizinde, izolatların **MIC dağılımlarının unimodal özellik** gösterdiği ve dağılımlara ilişkin **standart sapma (SD)** değerinin kabul edilebilir aralıkta bulunduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda yapılan değerlendirme sonucunda **epidemiyolojik eşik değeri (ECV)** 128 µg/mL olarak belirlenmiş ve bu konsantrasyonun izolatların %97,5'ini inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 20). Bu eşik değere göre yalnızca 2 izolat (%5,26) **NWT**, geri kalan 36 izolat (%94,74) ise **WT fenotipte** olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 20. EcoFFinder analizinde eritromisine karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyonlarının dağılımı ve epidemiyolojik eşik değerinin belirlenmesi

Ancak **NRI analizinde**, elde edilen **SD değeri 1,6207** olup EcoFFinder yazılımı tarafından önerilen sınırların dışında bulunmuştur. Bununla birlikte, literatürde belirtilen **+2,0 ile +2,5 aralığında** olan SD değerlerinin kabul edilebilir olduğu bilgisi doğrultusunda (Baron ve ark., 2021; Smith ve ark., 2012), bu değer **sınırda kabul edilebilir** bulunmuş ve analizler devam ettirilmiştir. NRI analizine göre **COwt değeri 32 µg/mL** olarak hesaplanmıştır (Şekil 21). Bu eşik değere göre, **5 izolat (%13,16) NWT**, **33 izolat (%86,84) WT** fenotipinde sınıflandırılmıştır.

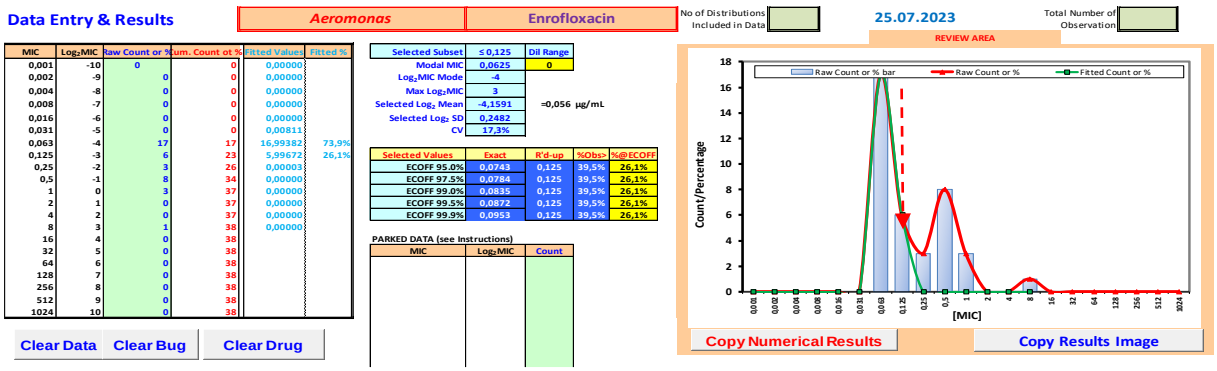


Şekil 21. NRI analizinde eritromisine karşı *Aeromonas* spp. izolatlarında MIC konsantrasyonlarının dağılımı

4.3.8.2.6 *Aeromonas* spp. izolatlarında Enrofloksasinin EcoFF:ECV değerleri

Aeromonas spp. (n=38) izolatlarına karşı yapılan **enrofloksasin duyarlılık testleri**, hem **EcoFFinder** hem de **NRI** yöntemleri ile analiz edilmiştir.

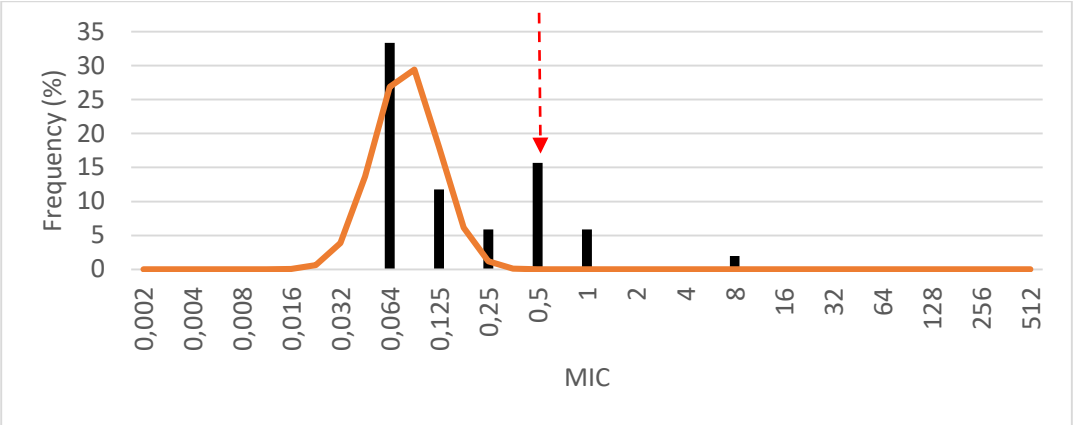
EcoFFinder analizinde, MIC değerlerinin **unimodal dağılım** gösterdiği ve elde edilen **standart sapma (SD)** değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde yer aldığı belirlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda **epidemiyolojik eşik değeri (ECV)** 0,125 µg/mL olarak saptanmış, bu değerin izolatların %97,5'ini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 22). Belirlenen bu ECV değerine göre 15 izolat (%39,47) **NWT**, 23 izolat ise (%60,53) **WT fenotipte** değerlendirilmiştir.



Şekil 22. EcoFFinder analizinde enrofoksasine karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve enrofloksasinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi

NRI analizinde, MIC değerlerinin dağılımına ait SD değeri 0,6383 olarak hesaplanmış ve bu değerin önerilen aralıklar içinde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak, NRI

analizinde COwt değeri 0,25 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 23). NRI analizine göre 12 izolat (%31,58) NWT, 26 izolat (%68,42) WT fenotipte bulunmuştur.



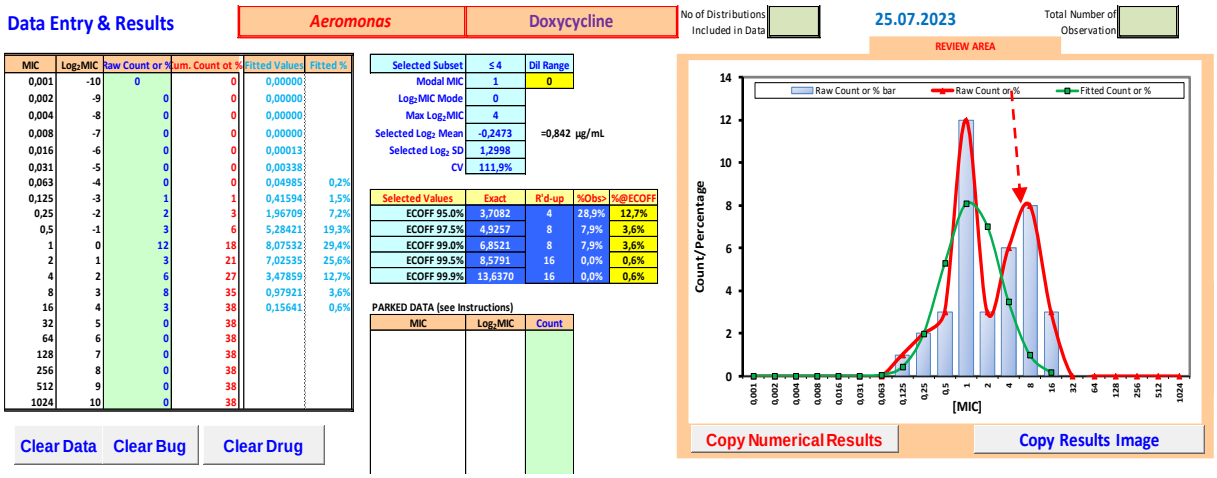
Şekil 23. NRI analizinde enrofloksasine karşı *Aeromonas* spp. izolatlarında MIC değerlerinin dağılımı

Her iki analiz yöntemi de *Aeromonas* spp. izolatlarının önemli bir kısmının enrofloksasine karşı duyarlılığını koruduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, EcoFF ve NRI analizlerinde belirlenen COwt değerlerinde (0,125 µg/mL vs. 0,25 µg/mL) gözlenen farklılık, yöntemsel varyasyonlardan kaynaklanmaktadır. Ancak her iki yöntemde de NWT oranlarının dikkat çekici düzeyde (%31–39) olması, sahada enrofloksasine karşı gelişen direnç eğiliminin varlığını düşündürmektedir. Bu durum, özellikle *Aeromonas* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde enrofloksasin kullanımının dikkatle değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır.

4.3.8.2.7 *Aeromonas* spp. izolatlarında Doksisiklinin EcoFF:ECV değerleri

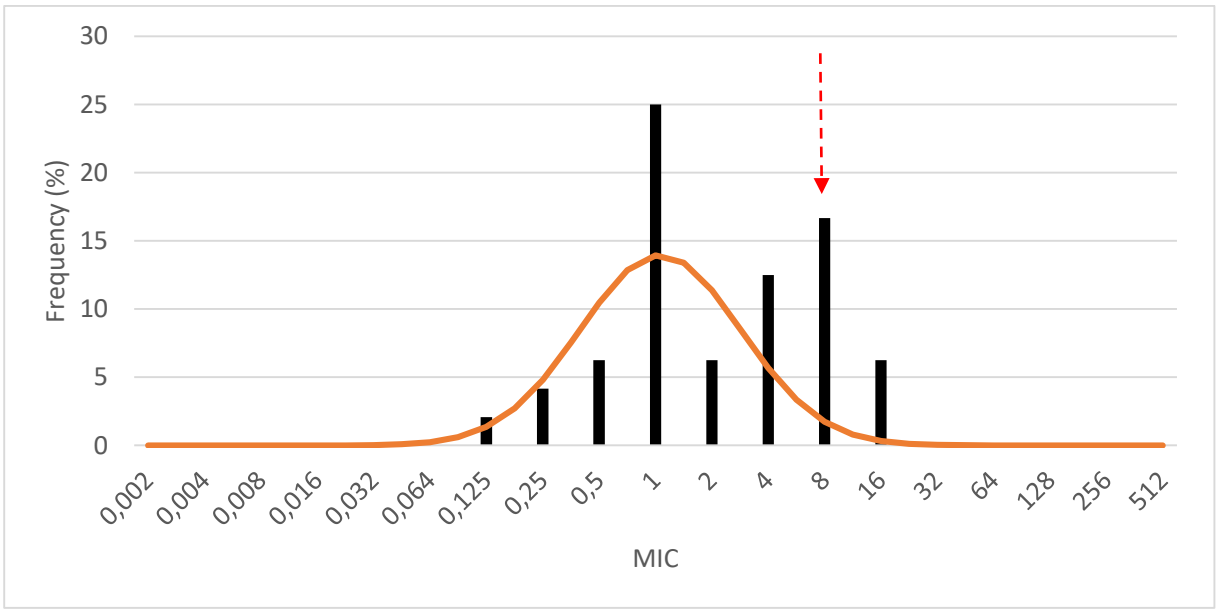
Aeromonas spp. (n=38) izolatlarının doksisikline karşı antimikrobiyal duyarlılıkları, hem **EcoFFinder** hem de **NRI** yöntemleri ile analiz edilmiştir.

EcoFFinder analizinde, MIC değerlerinin **unimodal dağılım** gösterdiği ve elde edilen **standart sapma (SD)** değerlerinin kabul edilebilir aralıkta bulunduğu saptanmıştır. Bu doğrultuda belirlenen **epidemiyolojik eşik değeri (ECV)** 8 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu ECV değerinin izolatların %97,5'ini inhibe ettiği belirlenmiş, bu verilere göre yalnızca 3 izolat (%7,89) **NWT**, 35 izolat (%92,11) ise **WT fenotipte** bulunmuştur (Şekil 24).



Şekil 24. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve doksisiklinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi

NRI analizinde ise MIC konsantrasyonlarına ait **SD değeri 1,4209** olarak belirlenmiş ve bu değer doğrudan yazılımın önerilen sınırlarının dışında olmasına karşın, literatürde (Baron ve ark., 2021; Smith ve ark., 2012) kabul edilebilir olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle yapılan NRI analizinde, **COwt değeri 8 µg/mL** olarak hesaplanmış ve EcoFFinder ile uyumlu bulunmuştur. NRI analizine göre 3 izolat (%7,89) **NWT**, 35 izolat ise **WT** fenotip özellik göstermiştir (Şekil 25).

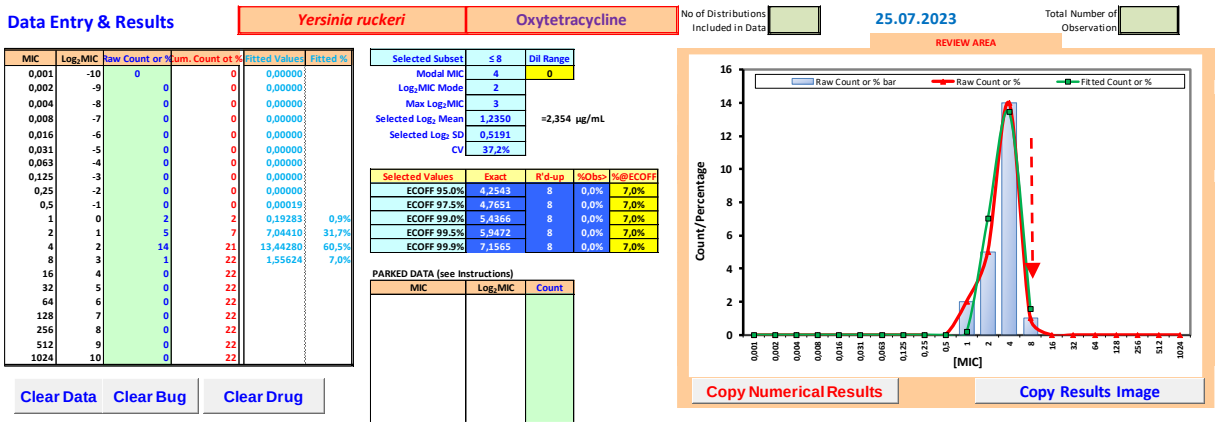


Şekil 25. NRI analizinde doksisikline karşı *Aeromonas* spp. izolatlarında MIC değerlerinin dağılımı

4.3.8.3 *Y. ruckeri* izolatlarında (n=22) Oksitetrasiklinin EcoFF:ECV değerleri

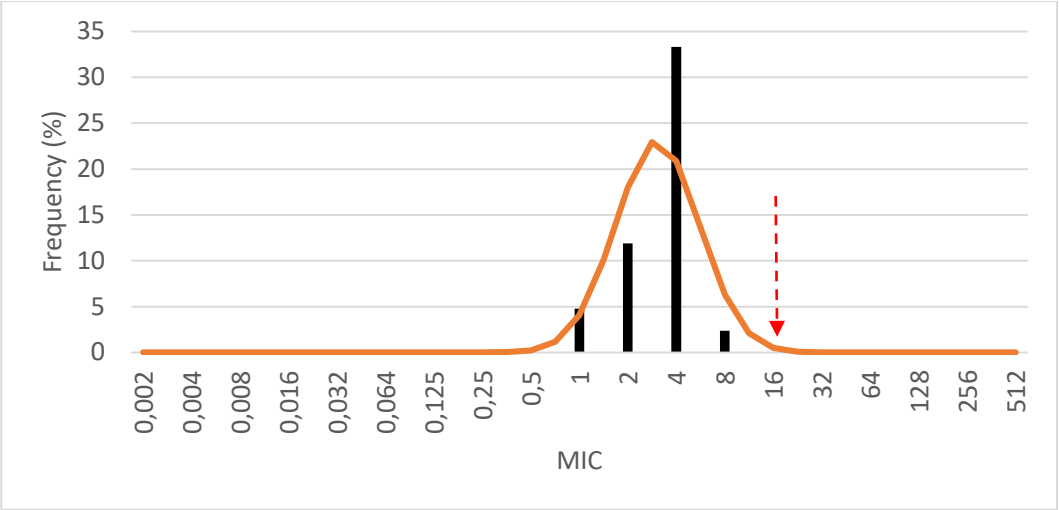
Y. ruckeri izolatlarına yönelik yapılan oksitetrasiklin MIC analizleri hem **EcoFFinder** hem de **NRI** yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

EcoFFinder metodu ile yapılan analizde, MIC konsantrasyonlarının **unimodal dağılım** gösterdiği, ayrıca **standart sapma (SD)** değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içinde kaldığı saptanmıştır. Bu doğrultuda epidemiyolojik eşik değeri (ECV) **8 µg/mL** olarak hesaplanmıştır. Bu konsantrasyonun izolatların %97,5'ini inhibe ettiği görülmüş ve **tüm izolatların (n=22) WT fenotip** sergilediği belirlenmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *Aeromonas* spp. izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve doksisiklinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV,COwt) belirlenmesi

***Y. ruckeri* izolatlarının NRI analizinde** de oksitetrasiklin MIC değerlerinin **unimodal** dağılım gösterdiği ve SD değerinin **0,8501** ile önerilen sınırlar içinde olduğu belirlenmiştir. Ancak bu analizde belirlenen **COwt değeri 16 µg/mL** olarak hesaplanmış ve EcoFF değerine göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 27). Bu farkın, yöntemler arası modelleme farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, NRI analizine göre de tüm izolatların **WT fenotip** özelliği taşıdığı görülmüştür.



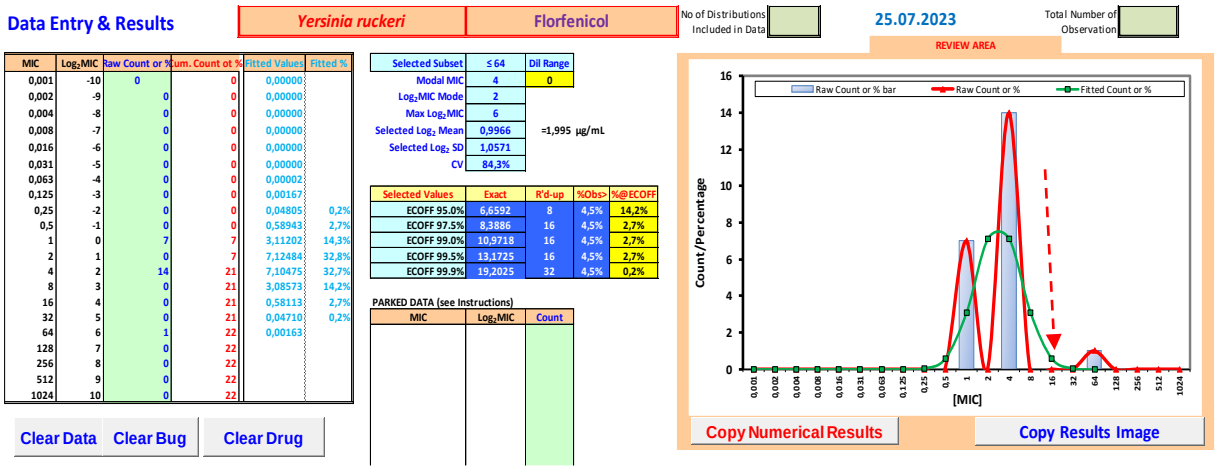
Şekil 27. NRI analizinde oksitetrasikline karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC değerlerinin dağılımı

Her iki analiz metodunun sonuçları, ***Y. ruckeri* izolatlarının tamamının oksitetrasikline karşı doğal duyarlılıkta olduğunu** göstermektedir. EcoFF ve NRI metotları arasında **epidemiyolojik eşik değerinde farklılık** bulunmasına karşın (8 µg/mL vs. 16 µg/mL), fenotipik dağılım bakımından **uyumlu sonuçlar** elde edilmiştir. Bu durum, oksitetrasiklinin ***Y. ruckeri*'ye karşı etkili bir antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilebileceğini** ve izolatlar arasında kazanılmış direnç gelişiminin henüz gözlenmediğini göstermektedir.

4.3.8.3.1 *Y. ruckeri* izolatlarında Florfenikolün EcoFF:ECV değerlerinin Belirlenmesi

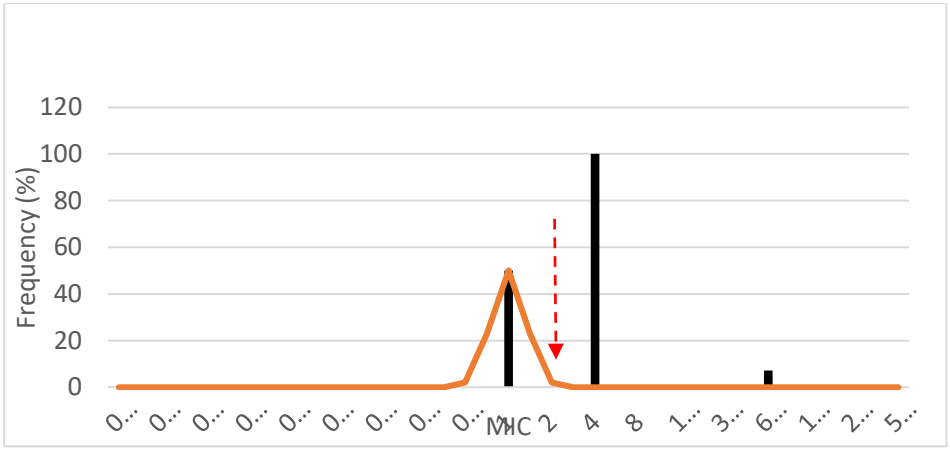
Florfenikol'e karşı yapılan antimikrobiyal duyarlılık analizlerinde, *Y. ruckeri* (n=22) izolatlarının minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) dağılımları hem **EcoFFinder** hem de **NRI** metotları kullanılarak değerlendirilmiştir.

EcoFFinder analizinde, *Y. ruckeri* izolatlarına ait MIC değerlerinin **unimodal** dağılım gösterdiği ve standart sapma (SD) değerinin önerilen sınırlar içerisinde (≤1.25) yer aldığı belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda epidemiyolojik eşik değeri (ECV) **16 µg/mL** olarak hesaplanmış ve bu konsantrasyon düzeyinde izolatların **%97,5'inin inhibe edildiği** tespit edilmiştir. Değerlendirme sonucunda yalnızca bir izolatın (%4,55) NWT, geri kalan 21 izolatın (%95,45) ise WT fenotipinde yer aldığı belirlenmiştir (**Şekil 28**).



Şekil 28. EcoFFinder analizinde florfenikole karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve epidemiyolojik eşik değeri (ECV, COwt).

NRI yöntemiyle yapılan değerlendirmede, florfenikol MIC değerlerinin SD değeri **0,8501** olarak belirlenmiş ve önerilen istatistiksel sınırlar içinde kaldığı görülmüştür. NRI analizinde, COwt değeri **2 µg/mL** olarak hesaplanmıştır. Bu eşik değere göre yapılan sınıflandırmada, 15 izolatın (%68,18) NWT ve 7 izolatın (%31,82) WT fenotipinde yer aldığı tespit edilmiştir (**Şekil 29**).



Şekil 29. NRI analizinde florfenikole karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve epidemiyolojik eşik değeri (COwt).

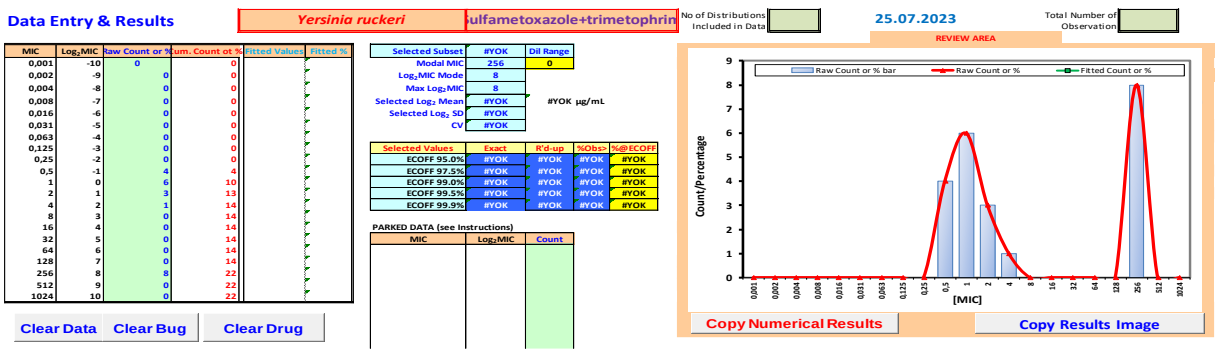
Florfenikol'e karşı *Y. ruckeri* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılığı, kullanılan metoda bağlı olarak anlamlı farklar göstermiştir. EcoFFinder yöntemi yüksek bir ECV değeri (16 µg/mL) ile yalnızca bir izolatı dirençli (NWT) olarak sınıflandırırken; NRI analizinde belirlenen daha düşük COwt değeri (2 µg/mL), dirençli fenotipe sahip izolat oranını %68,18'e çıkarmıştır. Bu sonuç, epidemiyolojik eşik değeri tespitinde kullanılan metodoloji farklılıklarının, duyarlılık verilerinin

yorumlanması üzerinde doğrudan etkili olduğunu göstermektedir. *Y. ruckeri* izolatlarında florfenikol MIC dağılımı unimodal karakterde olup, EcoFFinder analizine göre %95,45 oranında WT fenotip gözlenmiş; ancak NRI metodolojisi, daha düşük COwt değeriyle izolatların %68,18'ini NWT olarak sınıflandırmıştır. Bu fark, epidemiyolojik eşik değerlerinin belirlenmesinde kullanılan analiz yaklaşımının sonuçlar üzerindeki belirleyici etkisini göstermektedir.

4.3.8.3.2 *Y. ruckeri* izolatlarında Sulfamethoksazol+trimetoprimin EcoFF:ECV değerlerinin Belirlenmesi

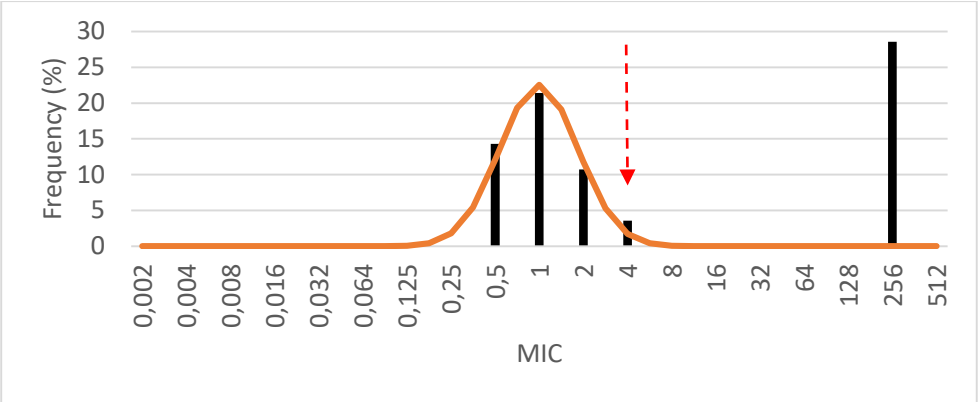
Y. ruckeri izolatlarında **sulfametoksazol+trimetoprim kombinasyonuna karşı antimikrobiyal duyarlılığın epidemiyolojik eşik değerlerinin (ECV)** belirlenebilmesi amacıyla, **hem EcoFFinder hem de NRI analiz yöntemleri** kullanılarak karşılaştırmalı bir değerlendirme yapılmıştır.

EcoFFinder yazılımı ile yapılan analizde, MIC değerlerinin **standart sapma değeri kabul edilebilir sınırlar içinde** yer alsa da, **MIC dağılımının bimodal** yapıda olması nedeniyle güvenilir bir ECV (COwt) değeri hesaplanamamıştır. Bu durum, **doğal (WT) ve doğal olmayan (NWT) fenotiplerin ayrımını EcoFFinder yöntemi ile yapmayı imkansız kılmıştır** (Şekil 30).



Şekil 30. EcoFFinder analizinde *Y. ruckeri* izolatlarının sulfametoksazol+trimetoprime karşı MIC konsantrasyon dağılımı ve eşik değerin belirlenememesi.

NRI analizinde elde edilen MIC SD değeri **0,872** olarak ölçülmüş ve bu değer literatürde kabul edilen sınırlar içerisinde yer almıştır. Bu yöntemle yapılan değerlendirmede, *Y. ruckeri* izolatları için **COwt değeri 4 µg/mL** olarak belirlenmiştir. Bu eşik değere göre, 22 izolattan **8'i (%36,36) NWT**, **14'ü (%63,64) ise WT** fenotipte sınıflandırılmıştır (Şekil 31).



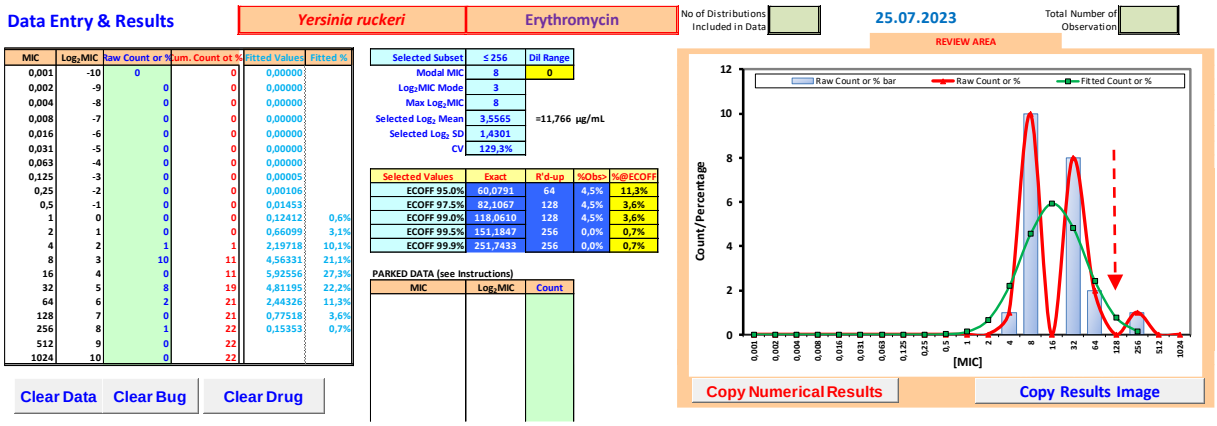
Şekil 31. NRI analizinde sulfametoksazol+trimetoprime karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC dağılımı ve belirlenen COwt değeri.

Bu veriler, *Y. ruckeri* izolatlarında sulfametoksazol+trimetoprim kombinasyonuna karşı **dirençli alt popülasyonların varlığına** işaret etmekte ve antimikrobiyal duyarlılığın değerlendirilmesinde **EcoFFinder yönteminin sınırlı kaldığı**, buna karşılık **NRI metodunun daha duyarlı ve ayrım yapıcı bir analiz sunduğu** görülmektedir. MIC dağılımlarındaki bimodal yapı, saha izolatlarının heterojenliğine ve muhtemel kazanılmış direnç genlerinin varlığına işaret edebilir.

4.3.8.3.3 *Y. ruckeri* izolatlarında Eritromisinin EcoFF:ECV değerlerinin Belirlenmesi

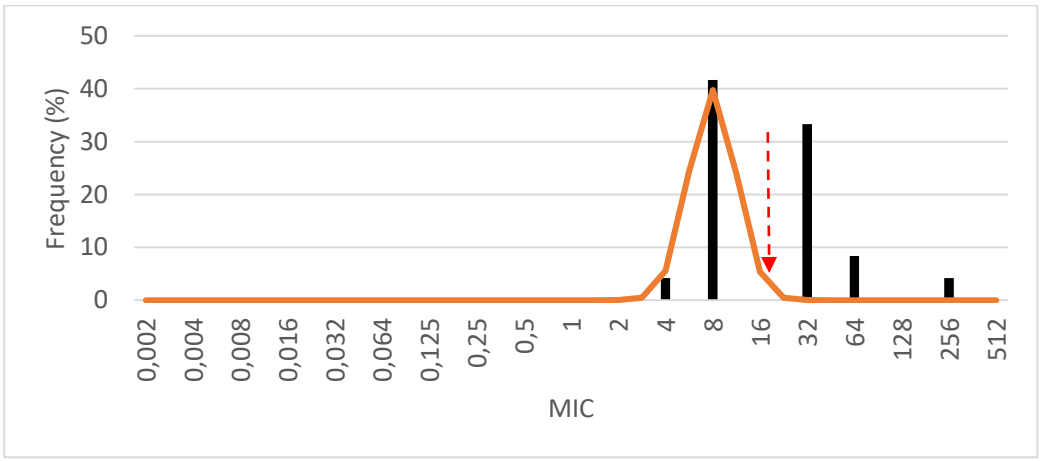
Y. ruckeri izolatlarında eritromisine karşı antimikrobiyal duyarlılığın değerlendirilmesi amacıyla hem **EcoFFinder hem de NRI analiz yöntemleri** kullanılmış, elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

EcoFFinder analizinde *Y. ruckeri* izolatlarının eritromisin MIC değerlerinin **unimodal dağılım gösterdiği** ve elde edilen **standart sapma değerinin kabul edilebilir sınırlar içinde** olduğu belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda **epidemiyolojik eşik değerin (ECV) 128 µg/mL** olduğu saptanmıştır. Belirlenen bu eşik değerde izolatların %97,5'inin inhibe edildiği ve yalnızca **1 izolatta (%4,55) NWT**, kalan **21 izolatta WT fenotip** gözlendiği tespit edilmiştir (Şekil 32).



Şekil 32. EcoFFinder analizinde eritromisine karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve belirlenen epidemiyolojik eşik değeri.

NRI analizinde eritromisin MIC değerlerinin unimodal yapıda olduğu ve SD değerinin 0,480 ile önerilen sınırlar içinde yer aldığı görülmüştür. Bu yöntemde ise COwt değeri 16 µg/mL olarak hesaplanmıştır. NRI analizine göre, 22 izolattan 11'i (%50) NWT, 11'i (%50) WT fenotipte sınıflandırılmıştır (Şekil 33)



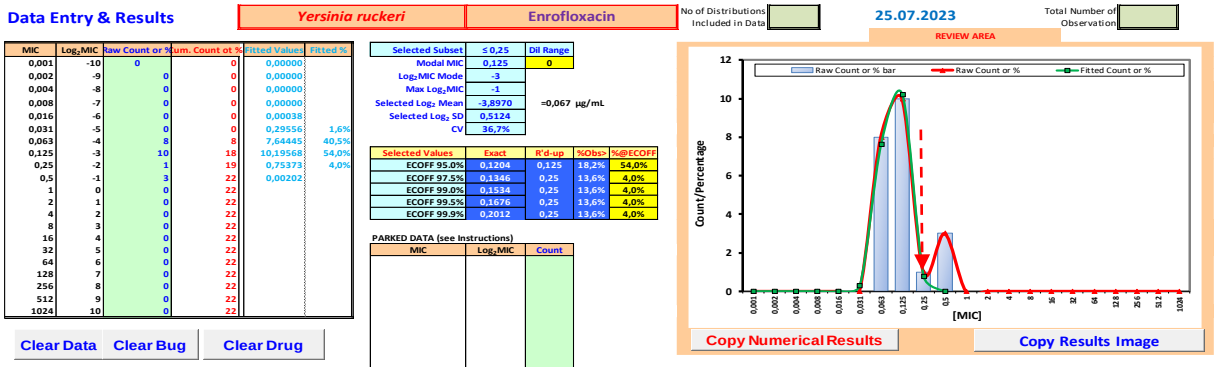
Şekil 33. NRI analizinde eritromisine karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC değerlerinin dağılımı ve belirlenen COwt değeri.

Elde edilen bulgular, eritromisine karşı *Y. ruckeri* izolatlarında **epidemiyolojik fenotip sınıflandırmasının kullanılan metoda bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini** ortaya koymaktadır. EcoFFinder analizinde dirençli izolat oranı %4,55 iken, NRI analizinde bu oran %50'ye kadar çıkmaktadır. Bu durum, özellikle **NRI metodunun daha düşük eşik değeriyle NWT fenotipleri daha geniş tanımlayabildiğini**, dolayısıyla **potansiyel dirençli alt popülasyonları daha hassas şekilde ortaya koyduğunu** göstermektedir. Eritromisine karşı olası kazanılmış direnç mekanizmalarının varlığı, sahada eritromisin kullanımına karşı dikkatli olunması gerektiğini vurgulamaktadır.

4.3.8.3.4 *Y. ruckeri* izolatlarında Enrofloksasinin EcoFF:ECV değerlerinin Belirlenmesi

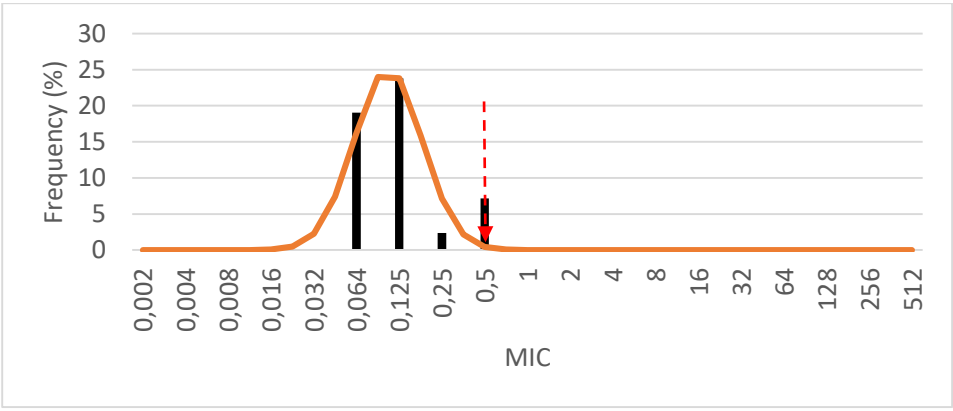
Y. ruckeri izolatlarında enrofloksasine karşı antimikrobiyal duyarlılık, **EcoFFinder** ve **NRI** yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

EcoFFinder analizinde *Y. ruckeri* izolatlarına ait enrofloksasin MIC değerlerinin **unimodal dağılım** gösterdiği ve **standart sapma (SD)** değerinin kabul edilebilir sınırlar içinde yer aldığı belirlenmiştir. Bu doğrultuda, **epidemiyolojik eşik değerin (ECV)** 0,25 µg/mL olduğu ve bu konsantrasyonda izolatların %97,5'inin inhibe edildiği tespit edilmiştir. EcoFFinder analizine göre, toplam 22 izolatın **3'ü (%13,63) NWT**, **19'u WT** fenotip olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 34).



Şekil 34. EcoFFinder analizinde enrofloksasine karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve belirlenen ECV değeri.

NRI analizinde *Y. ruckeri* izolatlarının enrofloksasin MIC konsantrasyonlarına ait **SD değeri 0,7805** olarak hesaplanmış ve bu değerin kabul edilebilir sınırlar içinde yer aldığı belirlenmiştir. NRI yöntemine göre, **COwt değeri 0,5 µg/mL** olarak saptanmıştır. Bu eşik değere göre tüm izolatların **WT fenotip** özelliği gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 35).

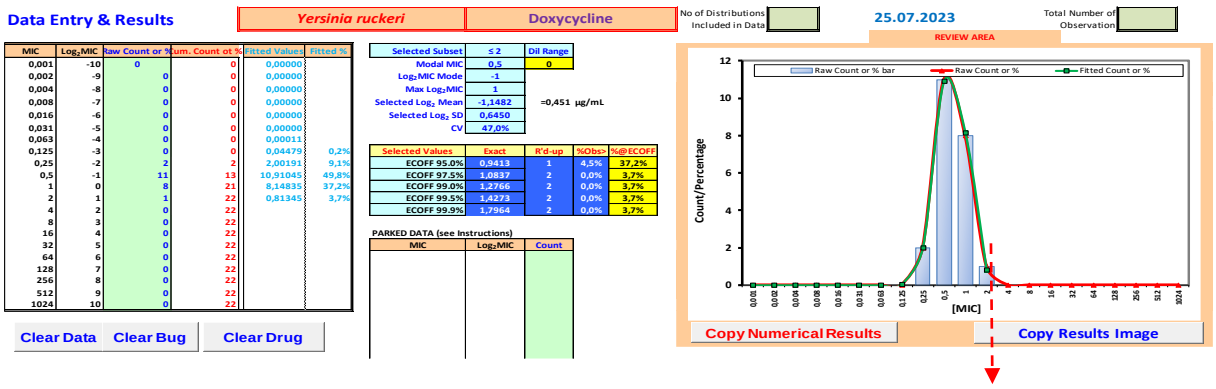


Şekil 35. NRI analizinde enrofloksasine karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC değerlerinin dağılımı ve belirlenen COwt değeri

EcoFFinder ve NRI analiz yöntemleri karşılaştırıldığında, **epidemiyolojik eşik değerlerinde farklılık gözlenmiştir**. EcoFFinder analizinde daha düşük bir eşik değerin belirlenmesiyle birlikte %13,63 oranında dirençli (NWT) izolat tespit edilirken, NRI analizinde tüm izolatlar WT olarak değerlendirilmiştir. Bu durum, **eşik değerin tanımlanmasında kullanılan analiz metodunun, dirençli fenotip oranlarının belirlenmesinde doğrudan etkili olabileceğini** göstermektedir. Enrofloksasine karşı genel olarak yüksek duyarlılık gözlenmiş olmakla birlikte, EcoFFinder analizinde belirlenen düşük oranlı NWT varlığı, **potansiyel direnç gelişimi açısından saha takibinin sürdürülmesi gerektiğini** işaret etmektedir.

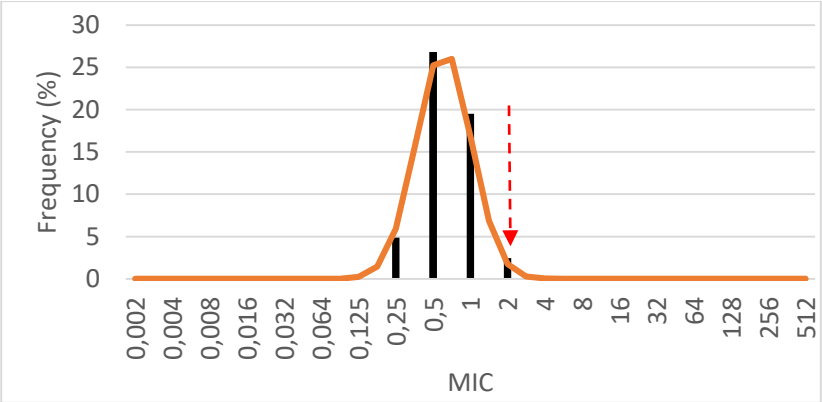
4.3.8.3.5 *Y. ruckeri* izolatlarında Doksisiklinin EcoFF: ECV değerlerinin Belirlenmesi

Y. ruckeri izolatlarının doksisikline karşı antimikrobiyal duyarlılığı, **EcoFFinder** ve **NRI** yöntemleri kullanılarak epidemiyolojik eşik değerler (ECV) belirlenmiş ve bu yöntemler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. EcoFFinder analizinde *Y. ruckeri* izolatlarına ait MIC verilerinin **unimodal dağılım** gösterdiği ve hesaplanan **standart sapma (SD)** değerlerinin önerilen sınırlar içinde olduğu belirlenmiştir. Bu doğrultuda, doksisikline karşı **epidemiyolojik eşik değer (ECV)** 2 µg/mL olarak hesaplanmış ve bu konsantrasyonda izolatların %97,5'inin inhibe edildiği tespit edilmiştir. EcoFFinder analiz sonuçlarına göre tüm izolatlar **WT fenotip** özelliği göstermiştir (Şekil 36).



Şekil 36. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve doksisiklinin epidemiyolojik eşik değerinin (ECV, COwt) belirlenmesi

NRI analizinde, *Y. ruckeri* izolatlarına ait doksisiklin MIC değerlerinin dağılımı unimodal olarak değerlendirilmiş ve SD değeri 0,7199 olarak bulunmuştur. Bu değerin önerilen sınırlar içerisinde olduğu belirlenmiştir. NRI analizine göre COwt değeri 0,5 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu sınır değer esas alınarak yapılan değerlendirmede, 9 izolatın (%40,91) NWT, geri kalan 13 izolatın ise WT fenotipte olduğu belirlenmiştir (Şekil 37).



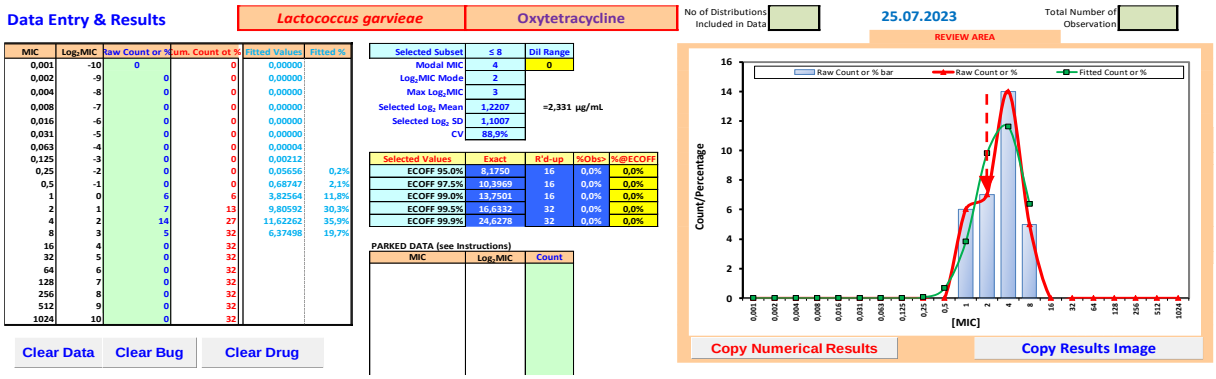
Şekil 37. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *Y. ruckeri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve belirlenen ECV değeri.

EcoFFinder ve NRI yöntemleriyle yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda doksisikline karşı belirlenen ECV değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmiştir. EcoFFinder analizine göre tüm izolatlar WT olarak sınıflandırılırken, NRI analizine göre %40,91 oranında NWT fenotip saptanmıştır. Bu durum, kullanılan yöntemin eşik değerlerin belirlenmesinde ve dirençli fenotiplerin tanımlanmasında **önemli derecede etkili** olabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle **NWT oranındaki farklılık**, saha uygulamaları ve tedavi başarısı açısından dikkatle değerlendirilmelidir. Doksisikline karşı gözlenen olası direnç sinyalleri, izolatların izlenmesi ve bu ajanın rasyonel kullanımının sürdürülmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

4.3.8.3.6 *L. petauri* izolatlarında (n=32) Oksiterasiklinin EcoFF:ECV değerlerinin Belirlenmesi

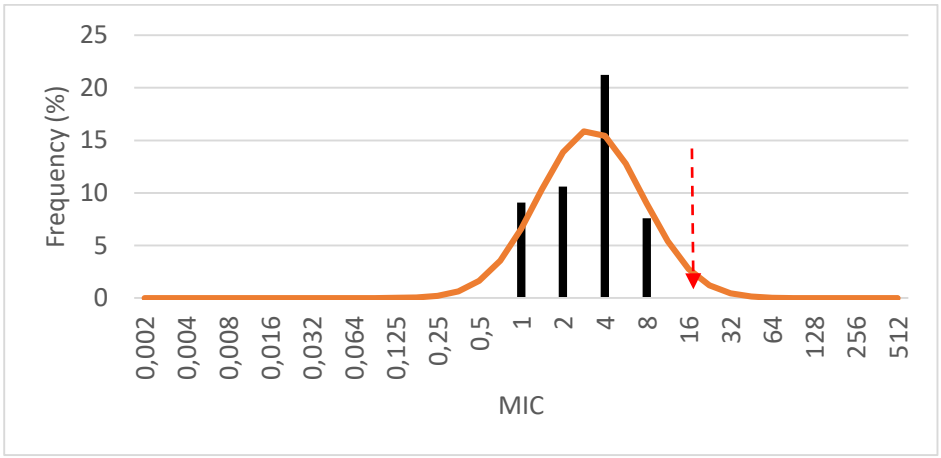
Bu çalışmada, kültür balıkçılığında önemli bir patojen olan *L. petauri* izolatlarının oksitetrasikline karşı antimikrobiyal duyarlılığı iki farklı analiz yöntemi olan EcoFFinder ve NRI kullanılarak değerlendirilmiştir.

EcoFFinder metodu ile yapılan değerlendirmelerde, *L. petauri* izolatlarının oksitetrasikline karşı MIC dağılımlarının unimodal olduğu ve standart sapma (SD) değerlerinin önerilen sınırlar içinde yer aldığı belirlenmiştir. Analiz sonucunda, oksitetrasiklin için epidemiyolojik eşik değer (ECV) 2 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu eşik değere göre, 19 izolat (%59,38) NWT fenotipinde, 13 izolat (%40,62) ise WT fenotipte sınıflandırılmıştır (Şekil 38).



Şekil 38. EcoFFinder analizinde oksitetrasikline karşı *L. petauri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve ECV (COwt) değerinin belirlenmesi.

NRI yöntemi ile yapılan değerlendirmelerde de izolatların MIC dağılımlarının **unimodal karakterde** olduğu görülmüş ve **standart sapma değeri 1,2389** olarak hesaplanmıştır. Bu değerin önerilen aralıkta olması, analizin güvenilirliğini desteklemektedir. NRI analizine göre oksitetrasiklin için **epidemiyolojik eşik değeri (COwt) 16 µg/mL** olarak saptanmıştır. Bu sınır değere göre, tüm izolatlar (%100) **WT fenotip** özelliği göstermiştir (Şekil 39).



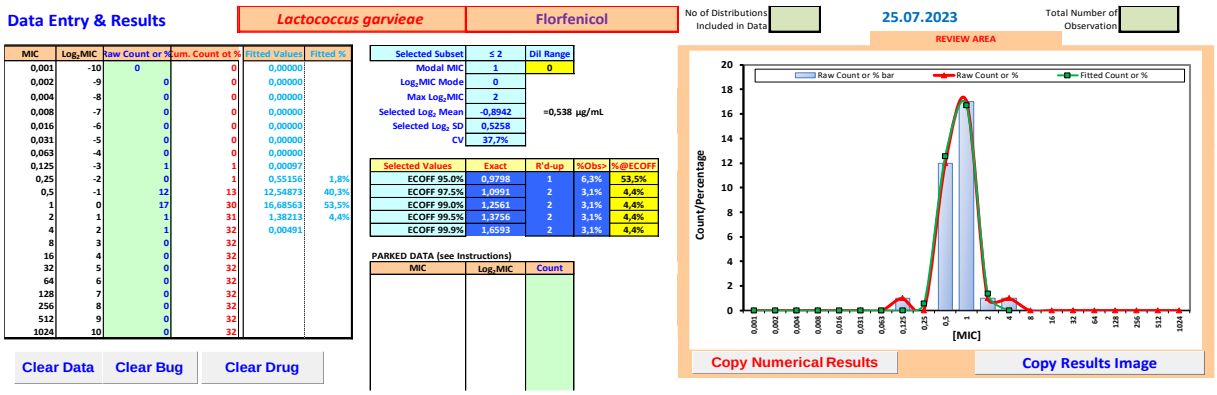
Şekil 39. NRI analizinde oksitetrasikline karşı *L. petauri* izolatlarının MIC konsantrasyonlarının dağılımı ve COwt değerinin belirlenmesi.

Her iki analiz yöntemi de **MIC dağılımlarının unimodal** olduğunu ortaya koymakla birlikte, epidemiyolojik eşik değerlerinde **anlamlı bir fark** tespit edilmiştir. EcoFFinder analizinde 2 µg/mL olarak belirlenen ECV değeri, NRI analizinde 16 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu farklılık, epidemiyolojik eşik değerlerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve yorum farklılıklarını yansıtmaktadır. Klinik kararların verilmesinde bu iki yöntemin birlikte değerlendirilmesi, özellikle sınır bölgede yer alan izolatların doğru sınıflandırılması açısından önemlidir.

4.3.8.3.7 *L. petauri* İzolatlarında (n=32) Florfenikolün EcoFF:ECV Değerinin Belirlenmesi

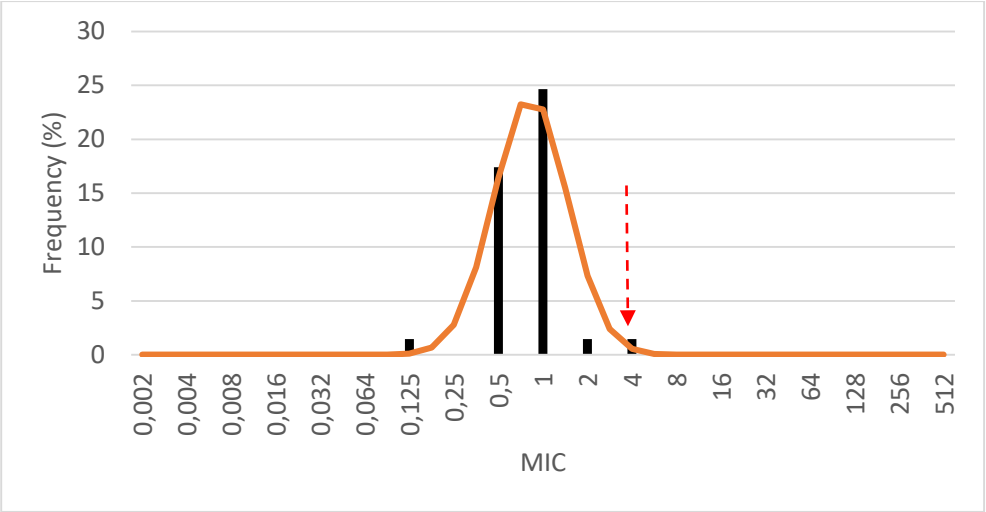
Florfenikol, kültür balıkçılığında yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir antibakteriyel ajandır. Bu çalışmada, ***L. petauri*** izolatlarının florfenikole karşı duyarlılığı, **EcoFFinder** ve **Normalize Direnç Yorumlama (NRI)** yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

EcoFFinder analizinde *L. petauri* izolatlarının florfenikol MIC dağılımı **unimodal karakter** göstermiş, hesaplanan **standart sapma (SD)** değerinin kabul edilebilir aralıkta olduğu belirlenmiştir. Bu değerlendirme sonucunda florfenikol için epidemiyolojik eşik değer (**ECV**) **2 µg/mL** olarak saptanmıştır. Belirlenen bu eşik değere göre tüm *L. petauri* izolatları **WT fenotipinde** sınıflandırılmıştır (Şekil 40).



Şekil 40. EcoFFinder analizinde florfenikole karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımı ve ECV (COwt) değerinin belirlenmesi

NRI yöntemiyle yapılan analizlerde de izolatların MIC dağılımlarının unimodal olduğu ve MIC değerlerine ait **standart sapma değeri (0,8157)** ile yöntemin güvenilirlik kriterlerini karşıladığı saptanmıştır. NRI analizine göre florfenikol için epidemiyolojik sınır değeri (**COwt**) **4 µg/mL** olarak hesaplanmıştır. Bu sınır değere göre de tüm izolatların **WT fenotipinde** olduğu belirlenmiştir (Şekil 41).



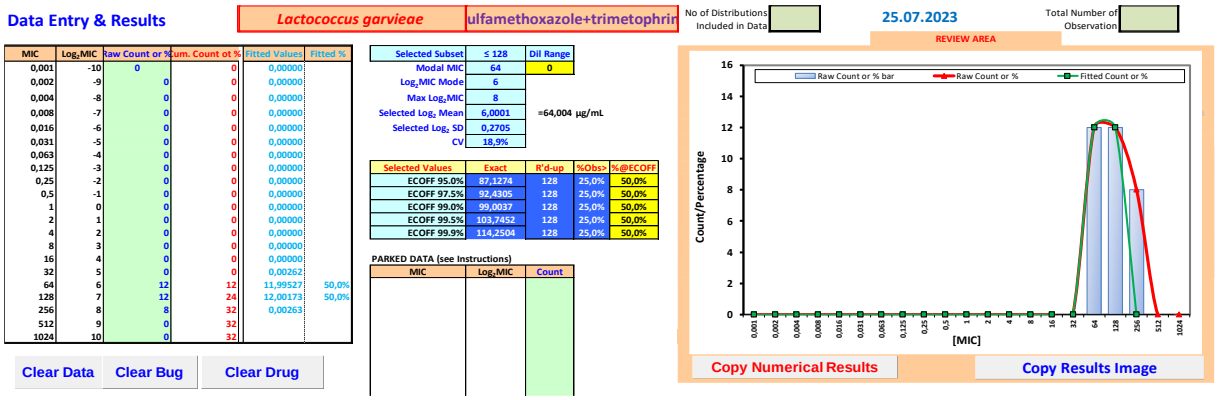
Şekil 41. NRI analizinde florfenikole karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımları ve COwt değerinin belirlenmesi.

Her iki analiz yöntemi de *L. petauri* izolatlarının florfenikole karşı yüksek duyarlılığa sahip olduğunu ve izolatların tamamının **doğal (WT) fenotip** gösterdiğini ortaya koymuştur. ECV değerlerinde EcoFFinder (2 µg/mL) ve NRI (4 µg/mL) arasında sınırlı düzeyde farklılık görülse de fenotipik değerlendirme açısından sonuçlar **uyumlu** bulunmuştur. Bu durum, florfenikolün *L. petauri* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde etkinliğini sürdürdüğünü göstermektedir.

4.3.8.4 *L. petauri* izolatlarında (n=32) Sulfamethoksazol+trimetoprimin EcoFF:ECV değerleri

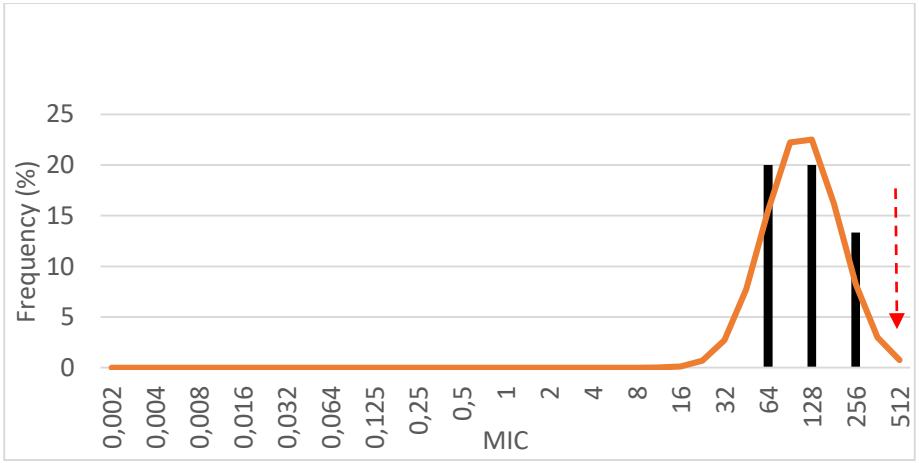
Bu bölümde, kültür balıkçılığında sıklıkla kullanılan **sulfamethoksazol + trimetoprim** antibakteriyel kombinasyonuna karşı ***L. petauri*** izolatlarının antimikrobiyal duyarlılığı, **EcoFFinder** ve **Normalize Direnç Yorumlama (NRI)** yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

EcoFFinder analizinde *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımları **unimodal özellik** göstermiştir. Analiz sonucunda izolatların %97,5'ini inhibe eden **epidemiyolojik eşik değer (ECV) 128 µg/mL** olarak belirlenmiştir. Bu eşik değere göre izolatların **24'ü WT fenotipinde**, **8'i (%25)** ise **NWT (doğal olmayan fenotip)** olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 42).



Şekil 42. EcoFFinder analizinde sulfamethoksazol + trimetoprime karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımları ve ECV (COwt) değerinin belirlenmesi.

NRI analizinde MIC değerlerinin dağılımı unimodal karakter göstermiş ve **standart sapma (SD = 0,8414)** değeri yöntemin kabul edilebilir sınırları içerisinde kalmıştır. Bu yöntemde elde edilen **COwt değeri 512 µg/mL** olarak hesaplanmıştır. Bu değere göre **tüm *L. petauri* izolatları (n=32) WT fenotipinde** sınıflandırılmıştır (Şekil 43).



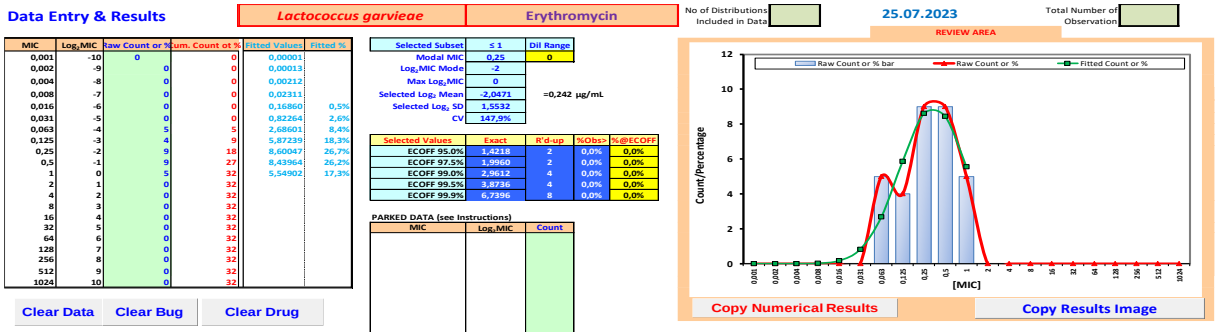
Şekil 43. NRI analizinde sulfamethoksazol + trimetoprime karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımları ve COwt değerinin belirlenmesi.

İki farklı analiz yöntemiyle yapılan değerlendirmeler sonucunda, ***L. petauri*** izolatlarının çoğunluğunun sulfamethoksazol + trimetoprim kombinasyonuna karşı **doğal fenotip** özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. EcoFF ve NRI yöntemleri arasında **ECV değerlerinde farklılık** gözlense de, **fenotipik sınıflandırma açısından genel uyum** gözlenmiştir. NRI analizinin daha geniş bir eşik değeri sunması nedeniyle tüm izolatların WT olarak değerlendirilmesi, yöntemin duyarlılık sınırlarını daha toleranslı belirlediğini göstermektedir.

4.3.8.4.1 *L. petauri* İzolatlarında (n=32) Eritromisinin EcoFF: ECV değerinin Belirlenmesi

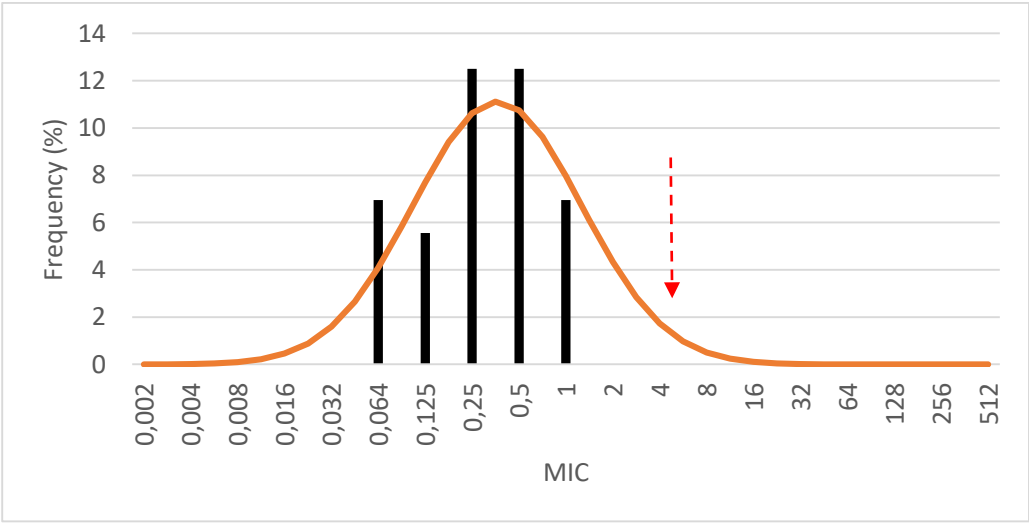
Bu çalışmada, ***L. petauri*** izolatlarının **eritromisin**e karşı antimikrobiyal duyarlılık profili, hem **EcoFFinder** hem de **Normalize Edilmiş Direnç Yorumlama (NRI)** analizleri ile değerlendirilmiştir.

EcoFFinder yöntemiyle yapılan analizde, eritromisin MIC değerlerinin dağılımı **unimodal karakter** göstermiştir. Elde edilen dağılıma göre, izolatların %97,5'ini inhibe eden **epidemiyolojik eşik değer (ECV) 2 µg/mL** olarak belirlenmiştir. Bu eşik değerde tüm ***L. petauri* izolatlarının (n=32) WT fenotip** özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 44).



Şekil 44. EcoFFinder analizinde eritromisine karşı *L. petauri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve ECV (COwt) değerinin belirlenmesi.

NRI analizinde eritromisin MIC değerlerinin dağılımı da **unimodal** olup, hesaplanan **standart sapma değeri (SD = 1,7887)** yöntemin kabul edilebilir sınırları içerisinde bulunmuştur. Bu analiz sonucunda **COwt değeri 4 µg/mL** olarak belirlenmiştir. NRI analizine göre de **tüm *L. petauri* izolatları WT fenotip** olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 45).



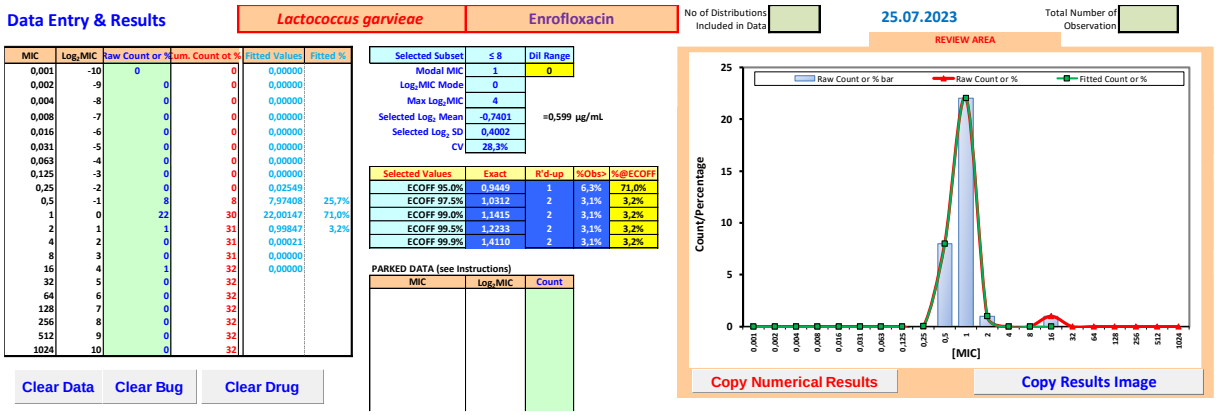
Şekil 45. NRI analizinde eritromisine karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımları ve COwt değerinin belirlenmesi.

Her iki analiz yöntemi, **eritromisinin *L. petauri* izolatlarına karşı yüksek inhibisyon etkinliği** gösterdiğini ortaya koymuştur. EcoFF ve NRI analizlerinde belirlenen ECV değerlerinde farklılık bulunmasına rağmen, her iki yöntemde de tüm izolatlar **WT (doğal duyarlılıkta)** olarak değerlendirilmiştir. Bu bulgular, eritromisinin *L. petauri* kaynaklı enfeksiyonlara karşı tedavide **etkili bir ajan** olabileceğini ve direnç gelişiminin bu popülasyonda şu an için sınırlı düzeyde olduğunu göstermektedir.

4.3.8.4.2 *L. petauri* İzolatlarında (n=32) Enrofloksasin EcoFF: ECV Değerinin Belirlenmesi

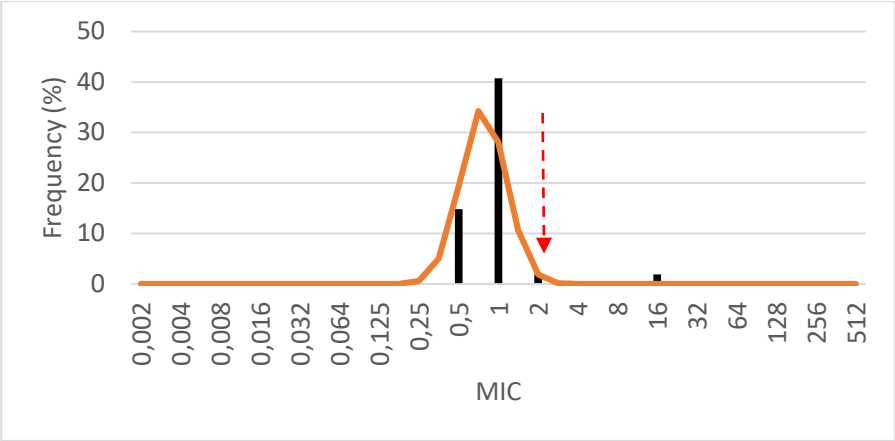
Bu bölümde, ***L. petauri*** izolatlarının **enrofloksasin**e karşı antimikrobiyal duyarlılığı, hem **EcoFFinder** hem de **NRI** yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

EcoFFinder yazılımı ile yapılan analizde enrofloksasin MIC değerlerinin **unimodal dağılım** gösterdiği tespit edilmiştir. Bu dağılıma göre, *L. petauri* izolatlarının %97,5'ini inhibe eden **epidemiyolojik eşik değer (ECV) 1 µg/mL** olarak belirlenmiştir. Bu eşik değer doğrultusunda izolatların büyük çoğunluğunun **WT fenotip** özelliği taşıdığı görülmüştür (Şekil 46).



Şekil 46. EcoFFinder analizinde enrofloksasine karşı *L. petauri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve ECV değerinin belirlenmesi

NRI analizinde de MIC değerlerinin **unimodal dağılım** sergilediği ve elde edilen **standart sapma değeri (SD = 0,5508)** ile analiz koşullarının uygunluk gösterdiği belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda ECV (COwt) değeri **2 µg/mL** olarak hesaplanmıştır. NRI analizine göre *L. petauri* izolatlarının **%96.75'i WT**, **%3.25'i NWT** fenotip olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 47).



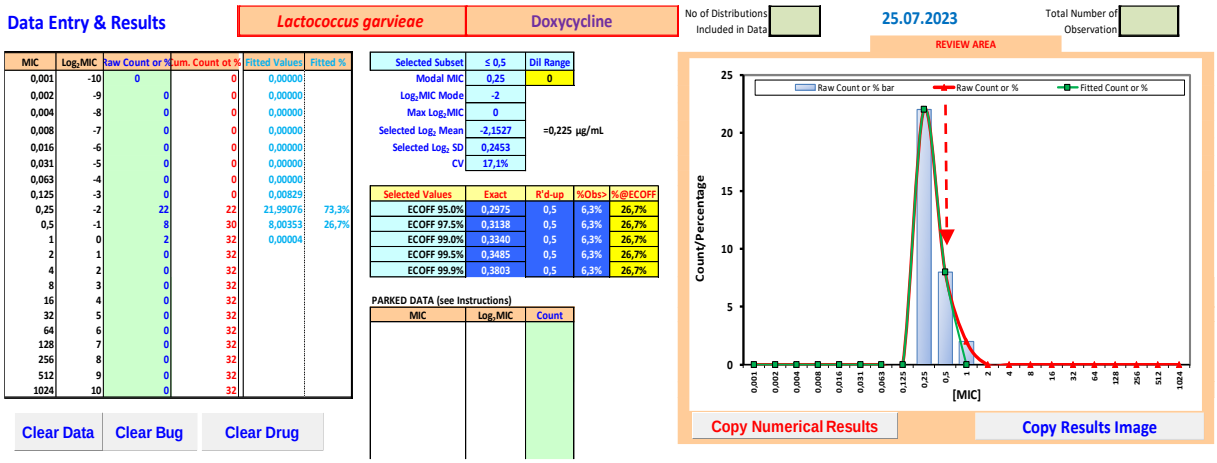
Şekil 47. NRI analizinde enrofloksasine karşı *L. petauri* izolatlarının MIC dağılımı ve COwt değerinin belirlenmesi.

EcoFFinder ve NRI analiz sonuçları, enrofloksasinin ***L. petauri* izolatlarına karşı genel olarak etkili bir antimikrobiyal ajan** olduğunu göstermektedir. İki yöntemle elde edilen ECV değerleri arasında fark bulunmasına rağmen, her iki analizde de izolatların büyük çoğunluğunun **WT (doğal duyarlılığa sahip)** olduğu görülmüştür. Bu durum, enrofloksasinin *L. petauri* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde **uygun bir seçenek** olabileceğini desteklemektedir. Bununla birlikte, az sayıda da olsa gözlenen NWT izolatların varlığı, düzenli izleme ve direnç gelişimini göz önünde bulundurma gerekliliğini ortaya koymaktadır.

4.3.8.4.3 *L. petauri* İzolatlarında(n=32) Doksisiklinin EcoFF:ECV Değerinin Belirlenmesi

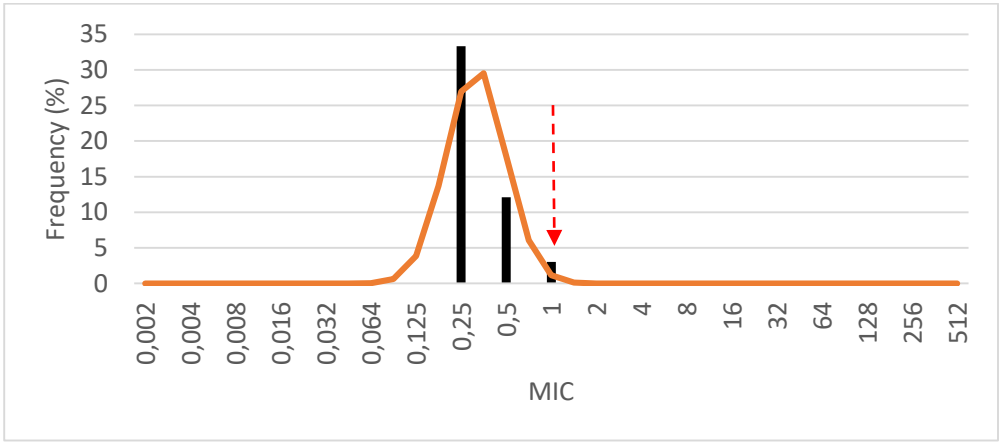
Bu çalışmada, ***L. petauri*** izolatlarının **doksisiklin**e karşı duyarlılığı **EcoFFinder** ve **NRI** analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

EcoFFinder yazılımı ile yapılan analizde doksisiklin MIC değerlerinin **unimodal dağılım** gösterdiği belirlenmiştir. Analiz sonucunda *L. petauri* izolatlarının %97,5'ini inhibe eden **epidemiyolojik eşik değerin (ECV) 0,5 µg/mL** olduğu saptanmıştır. Bu eşik değere göre 32 izolatın 30'u (%93.75) **WT**, 2'si (%6.25) ise **NWT** fenotipte sınıflandırılmıştır (Şekil 48).



Şekil 48. EcoFFinder analizinde doksisikline karşı *L. petauri* izolatlarının MIC konsantrasyon dağılımları ve ECV değerinin belirlenmesi.

NRI analizinde doksisiklin MIC dağılımlarının da **unimodal** özellik gösterdiği ve MIC konsantrasyonlarına ait **standart sapma değerinin (SD = 0,6361)** önerilen aralıkta bulunduğu görülmüştür. NRI analizinde **epidemiyolojik eşik değeri (COwt) 1 µg/mL** olarak hesaplanmıştır (Şekil 49). Bu değere göre izolatların tamamının (%100) **WT fenotip** özellik gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 49. NRI analizinde *L. petauri* izolatlarının doksisiklin MIC değerinin dağılımı. COwt değerinin belirlenmesi.

4.4 Prototip Aşı Üretimine Yönelik Aşı Aşı Suşlarının Seçimi

Proje çalışmasında toplam 69 *Y. ruckeri* serotip O1 suşu değerlendirilmiş olup, bunların **48'i (%69,6)** proje kapsamında 2022 ve 2023 yıllarında Türkiye'nin farklı bölgelerindeki gökkuşağı alabalığı işletmelerinden ilk kez izole edilmiştir. **Geri kalan 21 suş (%30,4)** ise 2013–2017 yılları arasında izole edilmiş, Ulusal Referans Laboratuvar arşivinde moleküler olarak karakterize edilmiş saha suşlarından seçilmiştir.

Proje kapsamında tanımlanan Lactococcus spp. izolatlarının değerlendirilmesinde, geçmişte *L. garvieae* olarak bildirilen birçok suşun, güncel moleküler analiz teknikleriyle yeniden sınıflandırılması büyük önem taşımaktadır. 2017 yılında *L. petauri*'nin tür olarak tanımlanmasından sonra, Türkiye'de proje ekibi tarafından (Satıcıoğlu vd. 2023) yapılan geniş çaplı taksonomik revizyon çalışmasında, geçmişte *L. garvieae* olarak tanımlanan 177 izolattan yalnızca 40'ının gerçekten bu türe ait olduğu; geri kalan 137 suşun aslında *L. petauri* olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgu, Türkiye'deki lactococcosis vakalarının etiyolojik yapısında uzun süredir farkında olunmayan bir değişimi ortaya koymaktadır. Başka bir deyişle, *L. petauri*, tanımlandığı 2017 yılından çok önce de Türkiye'de yaygındı; ancak sınırlı tanımlama teknikleri nedeniyle *L. garvieae* olarak rapor edilmekteydi.

Bu veriler doğrultusunda:

- **Aşı geliştirme sürecinde kullanılan suşların büyük çoğunluğu *L. petauri* olarak seçilmiş**, böylece ülkemizde klinik olarak baskın ve moleküler düzeyde tanımlanmış güncel suşlara karşı koruma hedeflenmiştir.
- **Sınıflandırma revizyonu öncesinde *L. garvieae* olarak bilinen kültür koleksiyonu suşlarının da yeniden değerlendirilmesi**, bu suşların doğru tür tayinine dayalı antijenik analizlerine olanak sağlamış ve geçmişteki enfeksiyon tiplerine karşı koruyuculuk stratejisi oluşturulmuştur.
- Bu sayede geliştirilmesi hedeflenen inaktif emülsiyon aşının, hem **geçmiş saha izolasyonlarını** hem de **güncel klinik vakaları** kapsayan, türler arası ayrım gözeten **bilimsel temelli, geniş spektrumlu** bir biyolojik ürün niteliğinde olması amaçlanmıştır.

Sonuç olarak, tür düzeyinde yapılan moleküler çalışmalar, yalnızca doğru patojen tanımlamasını değil, aynı zamanda **aşı hedefinin yeniden belirlenmesini de gerekli kılmıştır**. Bu proje kapsamında seçilen *L. petauri* suşları, hem sayısal olarak baskın olmaları hem de sahadaki güncel enfeksiyon yükünü temsil etmeleri açısından aşı geliştirme süreci için **en uygun antijen kaynakları** olarak değerlendirilmiştir.

Bu projede gerçekleştirilen saha örneklemeleri sonucunda, 2022–2023 yılları arasında yalnızca bir işletmeden **3 adet *V. anguillarum* suşu** izole edilmiştir. Sınırlı sayıda izolat elde edilmesine karşın, geçmiş yıllardaki klinik veriler ve kültür balıkçılığı istatistikleri, *V. anguillarum*'un özellikle **deniz ortamında üretilen gökkuşağı alabalıkları için önemli bir bakteriyel patojen** olduğunu açıkça göstermektedir. Türkiye'de şimdiye kadar gökkuşağı alabalıklarında izole edilen *V. anguillarum* suşlarının tamamı **O1 serotipine** aittir. Bu durum, serotip O1'in sahada klinik önemi yüksek, baskın bir serotip olduğunu ve aşılama stratejilerinde öncelikli olarak hedeflenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, aşı geliştirme çalışmalarında yalnızca proje kapsamında elde edilen 3 saha izolatı değil; aynı zamanda **farklı coğrafi bölgelerden ve yıllardan elde edilmiş toplam 20 adet kültür koleksiyonu suşu**,

O1 serotipi doğrulanmış olarak, antijenik çeşitliliği güçlendirmek amacıyla aşı tasarımına dahil edilmiştir. Bu yaklaşım aşağıdaki bilimsel ve stratejik gerekçelere dayanmaktadır:

1. **Klinik önemi yüksek, tek baskın serotip:** Türkiye'deki gökkuşağı alabalıklarında yalnızca *V. anguillarum* serotip O1'in izole edilmesi, aşı formülasyonunda spesifik serotip hedeflemesini kolaylaştırmış ve etkili bir bağışıklık yanıtı oluşturma potansiyelini artırmıştır.
2. **Denizlerde gökkuşağı alabalığı üretimi için stratejik hedef:** *V. anguillarum* O1, **özellikle deniz ortamında yapılan büyük ölçekli gökkuşağı alabalığı üretiminde** sıcaklık artışı, stres ve tuzluluk değişimi gibi çevresel faktörlerin etkisiyle yüksek mortaliteye neden olabilmektedir. Bu durum, patojenin deniz yetiştiriciliği bağlamında **öncelikli hedef bakteri** olmasını gerektirmektedir.
3. **Kombine aşı formülasyonunun tamamlayıcısı:** Projede geliştirilen inaktif emülsiyon aşı, *Y. ruckeri* ve *L. petauri* gibi hem Tatlısu, hem de deniz kökenli patojenleri kapsamakla birlikte, *V. anguillarum*'un dahil edilmesiyle birlikte **deniz ortamı için de uygun, çift ekosistem kapsayıcılığına sahip bir aşı** formülasyonu hedeflenmiştir.
4. **Antibiyotik kullanımını azaltma ve biyogüvenlik:** *V. anguillarum*'a bağlı enfeksiyonların önlenmesi, **özellikle deniz ortamında antibiyotik kullanımının azaltılmasına**, çevresel sürdürülebilirliğin desteklenmesine ve **biyoekonomik kayıpların önlenmesine** katkı sunmaktadır.

Sonuç olarak, Türkiye'de yalnızca O1 serotipi olarak tanımlanmış *V. anguillarum* suşlarının, hem saha izolatları hem de kültür koleksiyonu örnekleri üzerinden değerlendirilerek aşı geliştirme sürecine dahil edilmesi, bilimsel açıdan hedef odaklı, epidemiyolojik olarak temsili ve sahaya özgü bir koruyuculuk stratejisi sunmaktadır. Bu yaklaşım, özellikle **denizlerde gökkuşağı alabalığı üretiminin artış gösterdiği son yıllarda stratejik öneme sahip bir müdahale aracı** olarak değerlendirilmektedir.

Bu yaklaşım ile hem güncel sirkülasyondaki virülent tipler hedeflenmiş, hem de uzun yıllardır Türkiye'de hastalık yapan suşların bağışıklık sistemine adapte edilmesi amaçlanmıştır. Böylece geliştirilecek kombine inaktif emülsiyon aşının, farklı biyotiplere ve antijenik varyantlara karşı geniş spektrumlu ve sahaya uyumlu koruma sağlaması hedeflenmiştir.

Bu proje kapsamında geliştirilecek prototip aşılara temel teşkil edecek hedef bakteriyel etkenler olarak *Y. ruckeri*, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* türleri belirlenmiştir. Her bir patojenin farklı virulens profilleri, serotip çeşitliliği, antijenik yapıları ve konak-patojen etkileşim mekanizmaları göz önünde bulundurularak, 4. iş paketi kapsamındaki tüm analiz ve değerlendirmeler bu türlerin her biri için ayrı başlıklar altında sunulmuştur.

Bu bağlamda, izolatların fenotipik ve genotipik karakterizasyonları, hiperimmün serum eldesi, serotiplendirme çalışmaları, protein profili analizleri (SDS-PAGE, Western blot), antijen

tanımlamaları ve tüm genom sekanslama çalışmaları, her bir hedef bakteri için sistematik bir şekilde yapılandırılmış ve değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım, aşı geliştirme sürecinde tür-spesifik farklılıkların dikkate alınmasını ve en uygun aday suşların belirlenmesini sağlamıştır.

Bu nedenle, 3. iş paketi sonuçları proje raporunda aşağıda belirtilen üç ana başlık altında ayrı ayrı ele alınmıştır:

1. 3.4.1.*Y. ruckeri* Aşı Suşlarının Seçimine Yönelik Çalışmalar
2. 3.4.2*. L. garvieae* ve *L. petauri* Aşı Suşlarının Seçimine Yönelik Çalışmalar
3. 3.4.3.*V. anguillarum* Aşı Suşlaerının Seçimine Yönelik Çalışmalar

Bu yapılandırma ile her bir bakteriyel etkenin özgün biyolojik özellikleri dikkate alınarak kapsamlı ve derinlemesine analiz yapılması sağlanmıştır.

4.4.1 *Y. ruckeri* Aşı Suşlarının Seçimine Yönelik Çalışmalar *(Y. ruckeri* İzolatlarının Fenotipik (Virulens), Serotipik (Hiperimmun Serum Eldesi, Aglütinasyon Testleri) Peoteomik (SDS PAGE, Westernblot) ve Genomik Özellikleri (Tüm Genom Sekans, Genom Biyoinformatik Analizi)

Bu çalışmada, Türkiye genelinde farklı coğrafi bölgelerde yer alan alabalık işletmelerinden 2013-2023 yılları arasında izole edilen toplam 69 saha suşu (*Y. ruckeri* serotip O1) değerlendirmeye alınmıştır. Ayrıca, referans amaçlı olarak *Y. ruckeri* O1 BT1 (NCTC 12266) ve saha kökenli bir BT2 suşu kullanılmıştır. Tüm suşların izolasyonu, klinik belirti gösteren gökkuşağı alabalıklardan yapılmış olup, olgular çoğunlukla stres, düşük su kalitesi ve sıcaklık dalgalanmalarının etkili olduğu dönemlerde meydana gelmiştir.

İzolatların coğrafi dağılımları şu şekildedir: Muğla (n=10), Kayseri (n=13), Sivas (n=9), Sakarya (n=20), Düzce (n=14), Trabzon (n=2), Rize (n=1). İzolatlar, *Y. ruckeri*'ye özgü fenotipik testler ve moleküler doğrulama (YER8/YER10 primer çifti ile PCR) ile tanımlanmıştır.

4.4.1.1 *Y. ruckeri* izolatlarının Fenotipik Virülens Özelliklerinin (FVÖ) Belirlenmesi (Jelatinaz, lipaz, hemolizin, proteaz ve DNase üretimi)

Proje kapsamında izole edilen *Y. ruckeri* serotip O1 biyotip 1 (BT1) ve biyotip 2 (BT2) suşlarının fenotipik virulens özellikleri jelatinaz, lipaz, hemolizin, proteaz (kazeinaz) ve DNase üretimi yönünden değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde 69 saha izolatı (n=46 BT1, n=23 BT2) ve 2 referans suş fenotipik testlere tabi tutulmuştur.

Çalışma kapsamında Türkiye'nin altı farklı ilinden elde edilen 69 *Y. ruckeri* saha izolatı, motilite, lipaz (Tween 20/80), jelatinaz, kazeinaz ve sorbitol fermantasyonu gibi fenotipik virulens testlerine tabi tutulmuştur. İzolatların kökenlerine ve fenotipik virulens özelliklerine ilişkin dağılım aşağıda Tablo 27 ve Tablo 28'de sunulmuştur.

Tablo 27. *Y. ruckeri* izolatlarının illere göre dağılımı ve fenotipik virulens özellikleri

İl	İzolat Sayısı	Hareket	Tween 20-80	Jelatinaz	Kazeinaz	Hemoliz
Muğla	10	6	6	5	5	1
Kayseri	13	9	9	7	6	2
Sivas	9	7	7	5	5	1
Sakarya	20	14	14	13	12	0
Düzce	14	8	8	9	9	1
Trabzon	2	1	1	1	1	1
Rize	1	1	1	1	1	0
Toplam	69	46	46	41	39	6

Tablo 28*. Y. ruckeri* Suşlarının Fenotipik Özellikleri

Test	**Referans Suşları pozitif sayım (*n* = 2)**	**Saha Suşları pozitiflik oranı (%) (n = 69)**	**Pozitif Sonuçlu Suşların Yüzdesi (%)**
Gram Boyama	−	−	100
Hareketli	1	46	67
Hareketsiz	1	23	33
Oksidaz	−	−	100
Katalaz	+	+	100
O/F	F	F	100
Güçlü α-Hemoliz	2	30 (12 hareketsiz)	43
Tween 20 Hidroliz	1	46	67
Tween 80 Hidroliz	1	46	67
Jelatin Hidrolizi	2	41 (12 hareketsiz)	59
Kazein Hidrolizi	2	39 (10 hareketsiz)	57

Kısaltmalar: F: Fermentatif, −: negatif.

Bu sonuçlara göre:

- Jelatinaz ve Kazeinaz Aktivitesi: Jelatin (%3) ve yağsız süt (%5) içeren TSA besiyerlerinde yapılan değerlendirmede *Y. ruckeri* suşlarında jelatinaz aktivitesi %59 (BT1 suşlarda %44, BT2 suşlarda %15) kazeinaz aktivitesi %57 (BT1 sularda %43, BT2 suşlarda %14) oranında pozitif olarak belirlenmiştir.

- Lipaz Aktivitesi: Tween 20 ve Tween 80 kullanılarak yapılan lipaz aktivitesi testlerinde, BT1 izolatlarının %100'ünnde lipolitik aktivite pozitif olarak değerlendirilmiştir. BT2 suşlarında lipolitik aktivite tespit edilmemiştir
- Hemolizin Aktivitesi: %5 koyun kanı içeren kanlı agarda yapılan inkübasyon sonrası, BT1 suşlarının %26'sı' α-hemolitik reaksiyon sergilemiş, BT2 suşlarında ise bu oran %17'i olarak belirlenmiştir.
- DNase Aktivitesi: DNase agar testlerinde *Y. ruckeri* O1 BT1 ve BT2 izolatları aktivite göstermemiştir.
- Bu bulgular, biyotipler arası virulens potansiyeli farklarını ortaya koymakta ve aşı adayı suşların seçimi açısından kritik veriler sunmaktadır.

4.4.1.2 *Y. ruckeri* Referans/Standart Suşları için Antiserum (Hiperimmun Serum) Elde Edimesi

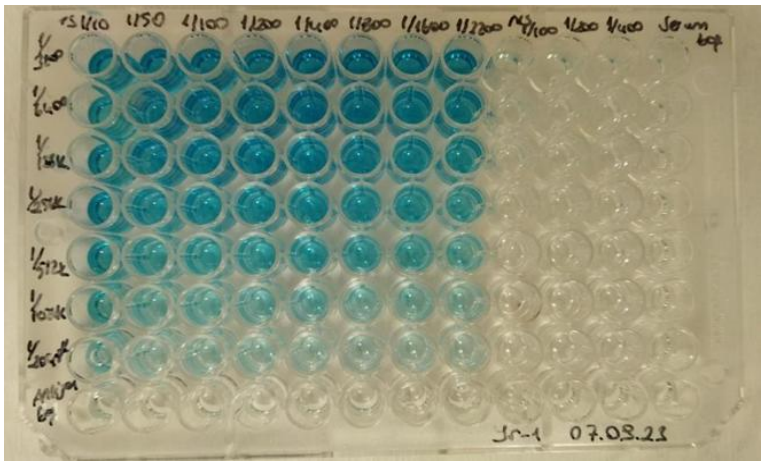
Proje kapsamında, hedef bakteriyel etkenlere karşı özgül antikor yanıtının elde edilmesi amacıyla hiperimmün serum üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla *Y. ruckeri* (O1 BT1 ve O1 BT2), *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* (O1, O2a, O2b) referans suşları formalin ile inaktive edilerek Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına farklı protokollerle uygulanmıştır. Tüm prosedürler yerel etik kurul onayı ile ATAFEN A.Ş. deney hayvanları ünitesinde gerçekleştirilmiştir.

Proje kapsamında, *Y. ruckeri*'nin serotip O1 biyotip 1 (BT1) ve biyotip 2 (BT2) suşlarına karşı özgül hiperimmün serum üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, referans suşlar (NCTC 12266 - BT1; saha kökenli BT2) formalin (%0.5, v/v) ile inaktive edilerek toplamda 36 gün süren bir immünizasyon protokolü kapsamında Yeni Zelanda beyaz tavşanlarına uygulanmıştır.

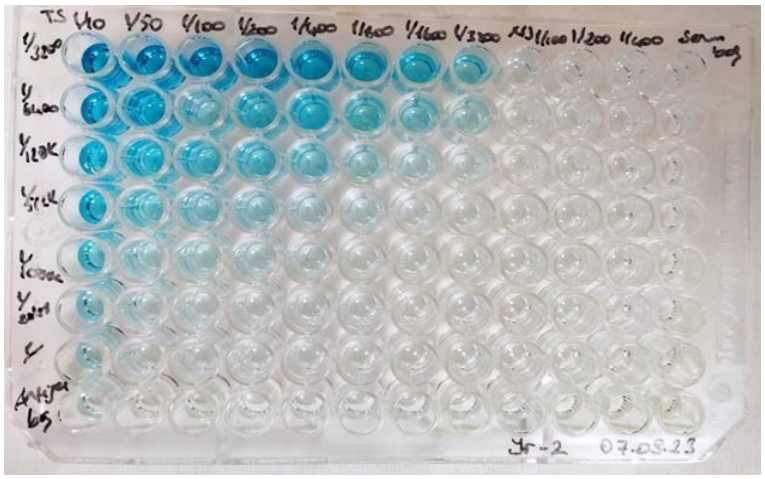
İmmünizasyon programı doğrultusunda, artan dozlarda intravenöz enjeksiyonlar ile tavşanlara antijen verilmiş, son enjeksiyondan 14 gün sonra marjinal kulak venasından alınan kan örneklerinden hiperimmün serum elde edilmiştir. Serumlar 0.45 µm filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve -70 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.4.1.2.1 Serumların Etkinliğinin Belirlenmesi:

Elde edilen hiperimmün serumların antijen tanıma kapasitesi, lam ve mikroplak aglütinasyon testlerinin yanı sıra, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi ile değerlendirildi. ELISA analizlerinde elde edilen sonuçlara ilişkin plak görüntüleri Şekil 50 ve 51'de gösterilmiştir.



Şekil 50 ELISA analizi ile *Y. ruckeri* O1 BT1 (NCTC 12266) antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü.



Şekil 51 ELISA analizi ile *Y. ruckeri* O1 BT1 (NCTC 12266) antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü ..

Yapılan ELİSA çalışmalarında sonuç olarak;

- *Y. ruckeri* serotip O1 ve biotip 1 ve biyotip 2'nin antijen ve serum kontrol kuyucuklarında non-spesifik bağlanmalar gözlenmedi.
- Değerlendirmede kullanılan negatif serumların absorbans değerleri 0,150'nin altında bulundu.

ELISA analizleri, her iki biyotipin inaktive hücrelerinden hazırlanan antijenlerle gerçekleştirilmiş ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

- BT1 hiperimmün serumları için optimum dilüsyon: **1:200**
- BT2 hiperimmün serumları için optimum dilüsyon: **1:200**

Bu sonuçlar, hem BT1, hem de BT2 suşlarına karşı güçlü bir antikor yanıtı oluştuğunu ortaya koymuş ve bu serumların hem serotiplendirme hem de antijenik karşılaştırma(Westernblot) çalışmalarında kullanılabilirliğini teyit etmiştir.

Sonuç olarak, *Y. ruckeri*'ye karşı elde edilen hiperimmün serumlar, yüksek özgüllük ve uygun titre düzeyleri ile hem fenotipik hem serolojik analizlerde güvenilir bir referans materyal sağlamıştır. Elde edilen serumlar, mikroplak aglütinasyon ve Western blot analizlerinde yüksek özgüllük göstermiştir. Bu bulgular, geliştirilecek prototip aşının hedef suşlara karşı bağışıklık oluşturma potansiyelinin değerlendirilmesinde kritik rol oynamıştır.

4.4.1.2.2 Serotiplendirme ve Aglütinasyon Analizleri

Bu çalışmada, Türkiye'nin altı farklı ilinden elde edilen 69 *Y. ruckeri* saha izolatı ile iki referans suş (O1 BT1 ve O1 BT2) kullanılarak serotiplendirme ve antijenik profil analizleri gerçekleştirilmiştir. Suşlar arasında serotip ve biyotip düzeyinde serolojik farklılıkların varlığı detaylı olarak değerlendirilmiştir.

4.4.1.3 Serotiplendirme (Mikroplak ve Lam Aglütinasyon Testleri):

Serotiplendirme testleri, saha suşlarının tamamının serotip O1 ile yüksek düzeyde uyumlu olduğunu ortaya koymuştur. Ancak, BT1 ve BT2 biyotipleri arasında belirgin aglütinasyon titre farklılıkları gözlenmiştir (Tablo 29):

- **BT1 Suşları:** O1 BT1 antiserumu ile 1:1280 dilüsyona kadar kuvvetli pozitif aglütinasyon tepkisi vermiştir. Bu durum, BT1'in serolojik olarak baskın bir biyotip olduğunu göstermektedir.
- **BT2 Suşları:** Aynı antiserum ile 1:320–1:640 aralığında daha zayıf tepkiler vermiştir. BT2'ye özgül hiperimmün serumla yapılan testlerde ise daha güçlü aglütinasyon yanıtları elde edilmiştir. Bu bulgu, BT2 suşlarının antijenik olarak BT1'den farklılaştığını ve serolojik olarak ayırt edilebildiğini göstermektedir.

Tablo 29. *Y. ruckeri* O1 BT1 ve O1 BT2 İzolatlarının Tam Hücre (WC) Tavşan Antiserumları ile Mikroplak (Kantitatif) Aglütinasyon Sonuçları

İzolat No	**O1 BT1 Antiserum**					**O1 BT2 Antiserum**				
	1/80	**1/160**	**1/320**	**1/640**	**1/1280**	**1/80**	**1/160**	**1/320**	**1/640**	**1/1280**
NCTC 12266	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
Y89	+	+	+	−	−	+	+	−	−	−
Y260	+	+	+	−	−	+	+	−	−	−
Y121	+	+	+	w	−	+	+	+	−	−
Y2022–241	+	+	+	−	−	+	+	−	−	−
Y2022–266	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
Y2022–238	+	+	+	−	−	+	+	−	−	−
Y2022–239	+	−	−	−	−	≥1/40	−	−	−	−
Y2023–491	+	+	+	−	−	+	+	−	−	−

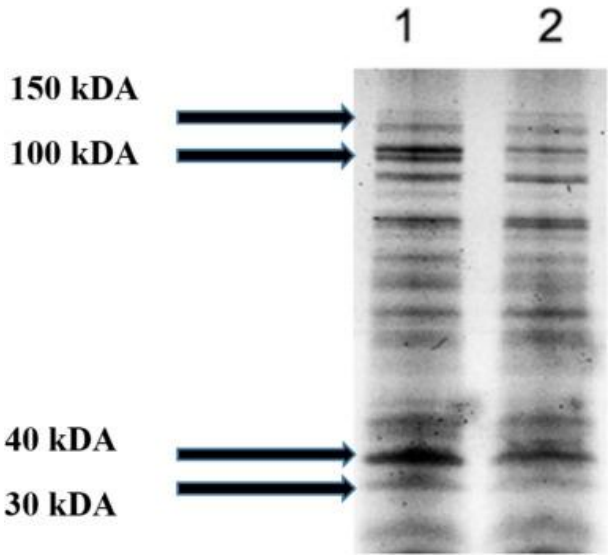
Referans BT2	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+
Y75–2013	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+
Y93	+	+	−	−	−	+	+	+	−	−
Y2022-518	+	+	+	w	−	+	+	+	+	w
Y2022–153	+	+	+	−	−	+	+	+	w	−
Y2022–154	+	+	+	−	−	+	+	+	w	−
Y248	+	+	−	−	−	+	+	+	−	−
Y254	+	+	−	−	−	+	+	+	+	−
Y2022–430	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−

Not: “+” pozitif reaksiyonu, “-” negatif reaksiyonu ve “w” zayıf reaksiyonu göstermektedir. BT: Biyotip, WCPT: Tüm hücre protein tipi; *: Aglütinasyonda yüksek reaksiyon gösteren izolatlar.

Bu veriler, saha izolatlarının büyük çoğunluğunun *Y. ruckeri* serotip O1 ile uyumlu olduğunu ortaya koyarken, BT1 ve BT2 biyotipleri arasında aglütinasyon titreleri açısından gözlenen farklılıklar, BT2 suşlarının antijenik olarak farklılaştığını ve serolojik olarak ayırt edilebildiğini göstermektedir; bu durum, mevcut monovalan aşıların etkinliği açısından BT2 suşlarının dikkate alınması gerektiğini ve biyotip temelli aşılama stratejilerinin geliştirilmesinin önem arz ettiğini ortaya koymaktadır.

4.4.1.4 *Y. ruckeri* BT1 ve BT2 suşlarının Tüm Hücre Proteinlerinin(WCPT) Belirlenmesi

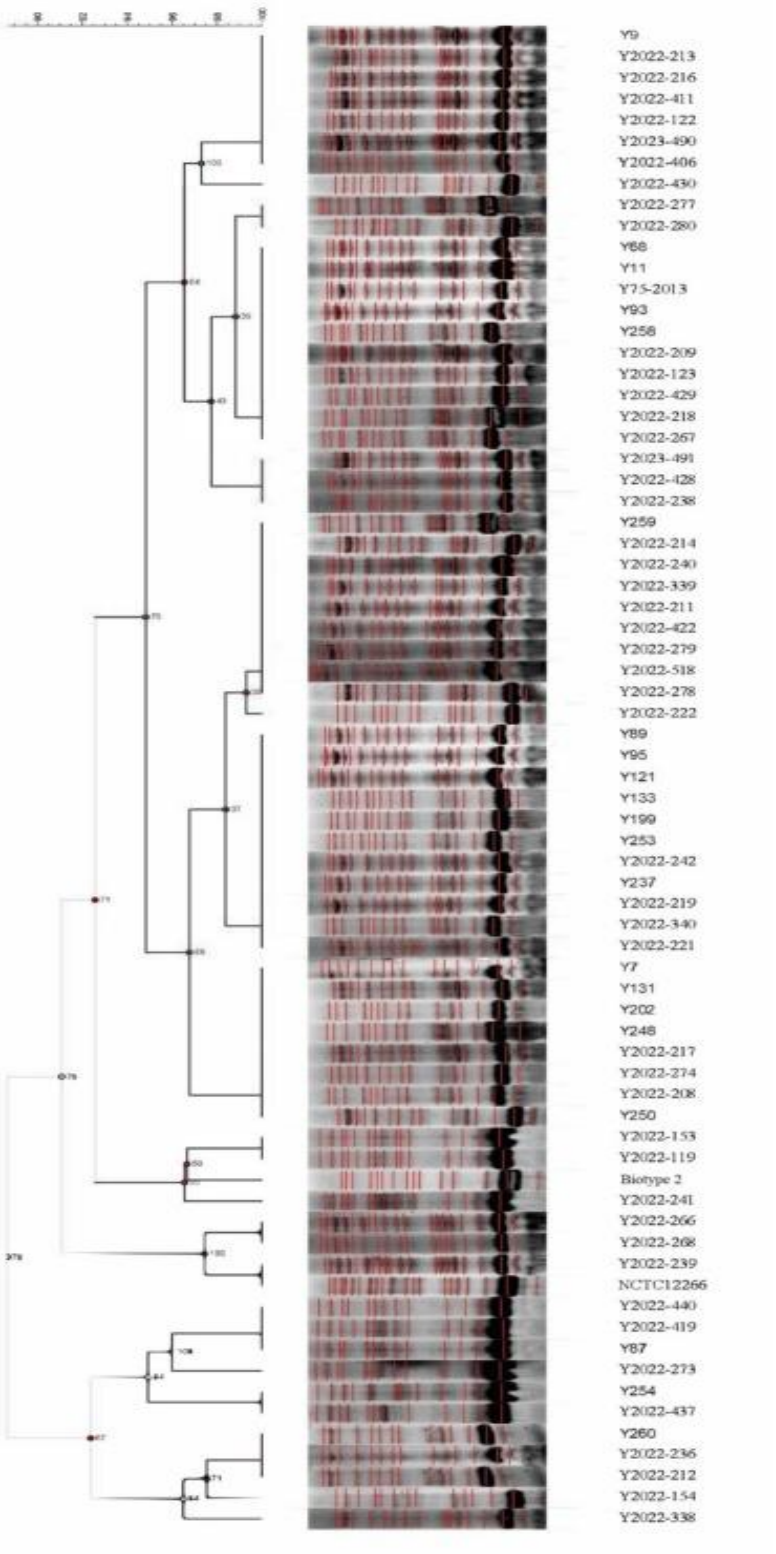
Y. ruckeri referans suşlarının (NCTC 12266, BT2 saha suşu) BT1 (*n* = 46) ve BT2 (*n* = 23) saha suşlarıyla birlikte tüm hücre protein tipleri (WCPT), SDS PAGE analizi ile belirlendi (Şekil 52 ve 53). Belirlenen tüm protein profilleri (bantları) Bionumerics 7.0 yazılımında (Applied Maths, Belgium) karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda, analize tabi SDS PAGE analizi, tüm hücre protein desenlerinin 14 ila 120 kD arasında değişen bantlar oluşturdu ve ortak majör protein bantlarının yaklaşık 20, 30, 40, 45, 60, 70, 75, 80, 90, 100 ve 120 kD moleküler ağırlıklarda (mw) olduğu gözlendi. UPGMA kümeleme analizine dayanan WCPT dendrogramı Şekil 52’de sunuldu.



Şekil 52. *Y. ruckeri* O1 BT1 ve O1 BT2 suşlarının SDS PAGE protein bantları Şerit 1: NCTC 12266, Şerit 2: Referans BT2.

Tüm *Y. ruckeri* serotip O1 BT1 ve BT2 suşları, %90 benzerlik indeksine göre altı WCPT grubuna ve %100 benzerlik indeksine göre on dokuz WCPT grubuna ayrıldı. Sadece BT1 özellikleri gösteren altı saha izolatı (Y022–239, Y2022–266, Y2022–268, Y87–2014) referans BT1 izolatı (NCTC 12266) ile birlikte WCPT grup 4'te kümelenirken, diğer WCPT gruplarındaki BT1 ve BT2 izolatları ortak kümeler oluşturdu (Şekil 53, Tablo 30).

Tüm *Y. ruckeri* serotip O1 BT1 (*n* = 46) ve BT2 (*n* = 23) suşları %90 benzerlik indeksine göre altı WCPT grubuna ve %100 benzerlik indeksine göre on dokuz WCPT grubuna ayrıldı. Sadece BT1 özellikleri gösteren beş saha izolatı (Y2022–239, Y2022–266, Y2022–268, Y87–2014) referans BT1 izolatı (NCTC12266) ile birlikte WCPT grup 4'te kümelenirken, diğer WCPT gruplarındaki BT1 ve BT2 izolatları ortak kümeler oluşturdu (Şekil 53). *Y. ruckeri* izolatlarının WCPT sonuçları incelendiğinde, en yaygın tipin WCPT 2 (30 izolat) olduğu, bunu WCPT 1 (23 izolat), WCPT 5 ve WCPT 6 (5 izolat) izlediği bulundu; WCPT 3 ve WCPT 4 (her biri 4 izolatla) bkz. (Tablo 30).



Şekil 53 *Y. ruckeri* İzolatlarının Tüm Hücre Proteinlerinin UPGMA Kümeleme Analizi Dendrogramı .

Tablo 30. SDS PAGE tam hücre protein tipleri ile *Y. ruckeri* Serotip O1 İzolatlarının biyotipleri arasındaki ilişki.

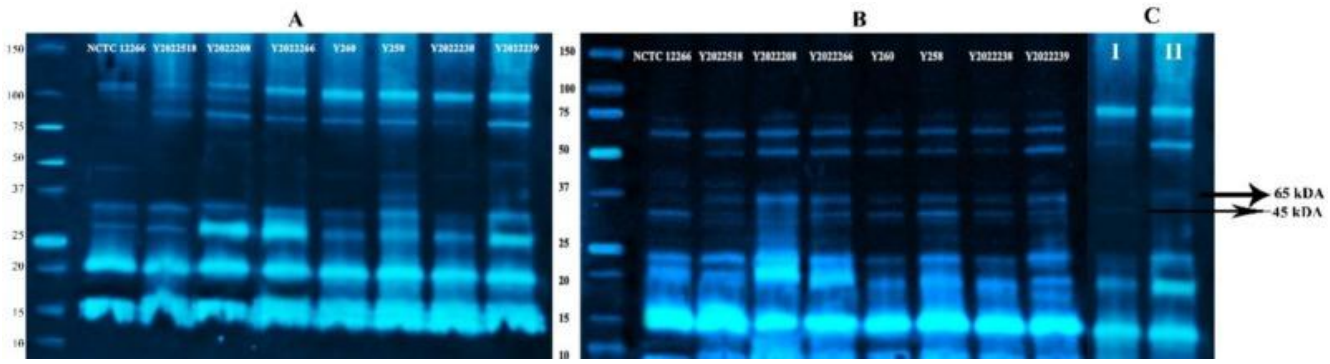
İzole Kod	WCPT	BT	İzole Kod	WCPT	BT	İzole Kod	WCPT	BT
Y9	1	1	Y89	2	1	Y2022–279	2	1
Y11	1	1	Y95	2	1	Y2022–340	2	1
Y68	1	2	Y121	2	2	Y2022–406	2	2
Y75–2013	1	2	Y2022–123	2	2	Y2022–422	2	1
Y93	1	2	Y2022–217	2	1	Y2022–518	2	2
Y2022–122	1	2	Y131	2	1	Referans BT2	3	2
Y123–2014	1	1	Y133	2	1	Y2022–119	3	2
Y2022–209	1	1	Y199	2	1	Y2022–153	3	2
Y2022–213	1	1	Y2022–339	2	1	Y2022–241	3	1
Y2022–216	1	1	Y2022–208	2	1	NCTC 12266	4	1
Y2022–218	1	2	2022-211 Yılı	2	1	Y2022–239	4	1
Y2022–238	1	1	Y2022–214	2	1	Y2022–266	4	1
Y258	1	1	Y2022–219	2	1	Y2022–268	4	1
Y2022–267	1	1	Y2022–221	2	1	Y87	5	1
Y2022–277	1	1	Y2022–222	2	1	Y254	**5**	2
Y2022–280	1	1	Y237	2	1	Y2022–273	**5**	2
Y2022–411	1	2	Y2022–240	2	1	Y2022–419	**5**	2
Y2022–428	1	2	Y2022–242	2	1	Y2022–440	**5**	2
Y2022–429	1	2	Y248	2	2	Y2022–154	**6**	2
Y2022–430	1	2	Y250	2	2	Y212–2015	**6**	1
Y2022–437	1	2	Y253	2	2	Y2022–236	**6**	1
Y2023–490	1	1	Y259	2	1	Y260	**6**	1
Y2023–491	1	1	Y2022–274	2	2	Y2022–338	**6**	1
Y7	2	1	Y2022–278	2	1			

WCPT: tüm hücre protein tipleri; BT: biyotip; WCPT 1 (n = 23); WCPT 2 (*n* = 30); WCPT 3, n = 4); WCPT 4 (n = 4); WCPT 5 n = 5); WCPT 6 (n = 5); BT1 (n = 46); BT2 (n = 23).

Sonuç olarak; SDS-PAGE temelli tüm hücre protein analizi, *Y. ruckeri* serotip O1 BT1 ve BT2 suşları arasında protein profili bakımından belirgin farklılıklar ortaya koymuş, 20–120 kDa aralığında tespit edilen majör protein bantları her iki biyotipin moleküler çeşitliliğini yansıtmıştır. UPGMA dendrogram analizine göre tanımlanan WCPT kümeleri, BT1 ve BT2 suşlarının belirli gruplarda birlikte kümelenmesine rağmen, yalnızca BT1 karakteristiği gösteren saha izolatlarının referans BT1 suşu (NCTC 12266) ile %100 benzerlik düzeyinde WCPT grup 4'te toplanması, BT1 biyotipinin protein düzeyinde daha homojen bir yapıya sahip olduğunu düşündürmektedir. Öte yandan, BT2 suşlarının daha geniş WCPT kümelerine dağılması, bu biyotipin antijenik çeşitliliğini ve saha suşları arasındaki moleküler heterojenliği ortaya koymuştur. Elde edilen bu bulgular, protein profili temelli WCPT analizinin *Y. ruckeri* suşlarının biyotip ve antijenik düzeyde ayrımında güvenilir bir tanımlayıcı araç olduğunu ve aşı suşu seçiminde önemli bir kriter olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

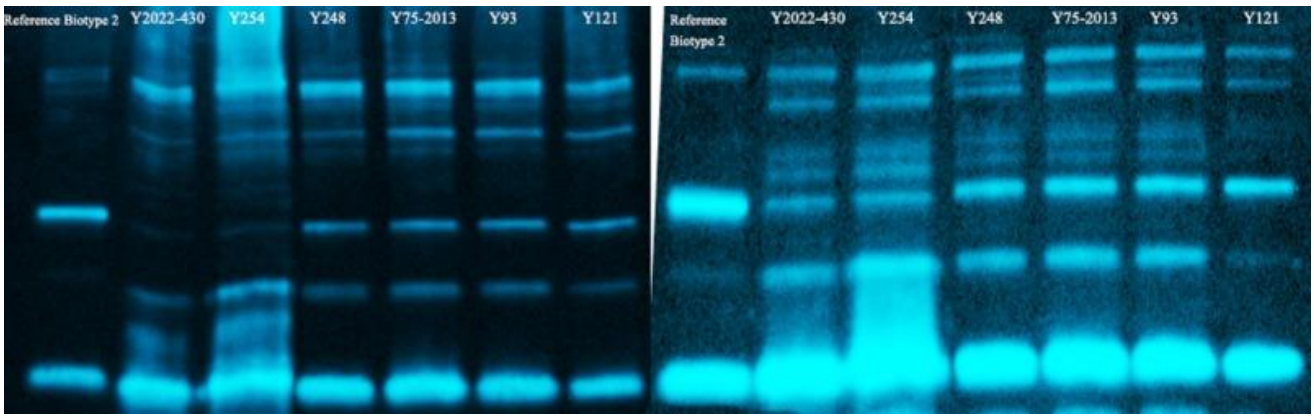
4.4.1.5 *Y. ruckeri* Serotipi O1 BT1 ve BT2 İzolatlarının Western Blot Analizi

Fenotipik virülans, mikroplak aglütinasyonu ve SDS-PAGE WCPT'ye dayanarak, farklı orijinlerden gelen izolatlar Western blot analizi için seçildi. O BT1 ve BT2 izolatları, 60, 70, 80 ve 90 kDa WA protein bantları BT1 ve BT2 antiserumları arasında farklılıklar gösterdi. BT2 antiserumu ile elde edilen 60 ve 70 kDa protein bantları O1 BT1 antiserumu ile tespit edilemedi. Y2022–239 izolatında, O1 BT1 antiserumu ile elde edilen 65 kDa MW protein bantları diğer izolatlarda gözlenmedi. Ancak, O1 BT2 izolatları ayrı ayrı O1 BT1 ve BT2 antiserumları ile reaksiyona sokulduğunda, ortak 35 kDa MW protein bantları elde edildi. Bu protein bandının (35 kDa) O1 BT2 izolatlarında aşırı ifade edildiği kaydedildi. Elde edilen protein bantları Şekil 54, Tablo 31, Şekil 55, Tablo 32'de gösterilmektedir.



Şekil 54. (A): *Y. ruckeri* BT1 antiserumu ile muamele edilen BT1 ve BT2 (Y2022–518)

izolatlarının Western Blot analiz sonuçları; (B): *Y. ruckeri* BT2 antiserumu ile muamele edilen BT1 ve BT2 (Y2022–518) İzolatlarının Western Blot analiz sonuçları; (C): *Y. ruckeri* BT1 antiserumu ile muamele edilen NCTC12266 (I) ve Y2022–239 (II) izolatlarının Western Blot analiz sonuçları.



Şekil 55. (A): *Y. ruckeri* BT2 antiserumu ile muamele edilen BT2 ve BT1(Y121) şzolatlarının Western Blot analiz sonuçları; (B): *Y. ruckeri* BT2 antiserumu ile muamele edilen BT2 ve temsili BT1(Y121) izolatlarının Western Blot analiz sonuçları.

Tablo 31. Western Blot Analizinde BT1 ve BT2 antiserumlarına karşı Serotip O1 BT1 suşlarında Antijenik Protein Bantlarının Dağılımı.

İzole et (O1 BT1)	**BT-WCPT**	**O1 BT1 antiserum**									Boş Hücre
		Antijenik protein bantlarının moleküler ağırlığı (kDA)									Boş Hücre
NCTC12266	1–4	20	30	35	45	–	–	–	80	–	120
Y258	1–1	20	30	35	45	–	–	–	80	–	120
Y260	1–6	20	30	35	45	–	–	–	80	–	120
Y2022–208	1–2	20	30	35	–	–	–	–	80	–	120
Y2022–238	1–2	20	30	35	45	–	–	–	80	–	120
Y2022–239	1–4	20	30	35	–	55	–	–	80	–	120
Y2022–266	1–4	20	30	35	–	–	–	–	80	–	120
Y2022–518	1–2	20	30	35	–	–	–	–	80	–	120
İzole et (O1 BT1)	BP-WCPT	O1 BT2 antiserumları Antijenik protein bantlarının moleküler ağırlığı (kDA)									
NCTC12266	1–4	20	–	35	45	–	–	–	–	90	120
Y258	1–1	20	–	35	45	–	60	70	–	90	120
Y260	1–6	20	–	35	45	–	60	70	–	90	120
Y2022–208	1–2	20	–	35	45	–	60	70	–	90	120
Y2022–238	1–2	20	–	35	45	–	60	70	–	90	120
Y2022–239	1–4	20	–	35	45	–	–	–	–	90	120
Y2022–266	1–4	20	–	35	45	–	60	70	–	90	120
Y2022–518	1–2	20	–	35	45	–	60	70	–	90	120

WCPT: tüm hücre protein tipleri; BT: biyotip.

Tablo 32. Western Blot Analizinde BT1 ve BT2 antiserumlarına karşı serotipi O1 BT2 suşlarında antijenik protein bantlarının dağılımı.

İzole et (O1 BT2)	**BT-WCPT**	**O1 BT1 antiserumları**								
		Antijenik protein bantlarının moleküler ağırlığı (kDA)								
Biyotip 2	2–3	20	30	35	45	–	–	80	–	120
Y75–2013	2–1	20	–	35	45	–	–	80	–	120
Y93	2–1	20	–	35	45	–	–	80	–	120
Y121	1–2	20	–	35	45	–	–	80	–	120
Y248	2–2	20	–	35	45	–	–	80	–	120
Y254	2–5	20	–	35	45	–	–	80	–	120
Y2022–430	2–1	20	30	35	45	–	–	80	–	120
İzole et (O1 BT2)	BP-WCPT	O1 BT2 antiserumları								
		Antijenik protein bantlarının moleküler ağırlığı (kDA)								
Biyotip 2	2–3	20	–	35	45	–	–	–	90	120
Y75–2013	2–1	20	–	35	45	60	70	–	90	120
Y93	2–1	20	–	35	45	60	70	–	90	120
Y121	1–2	20	–	35	45	60	70	–	90	120
Y248	2–2	20	–	35	45	60	70	–	90	120
Y254	2–5	20	–	35	45	60	70	–	90	120
Y2022–430	2–1	20	–	35	45	–	–	–	90	120

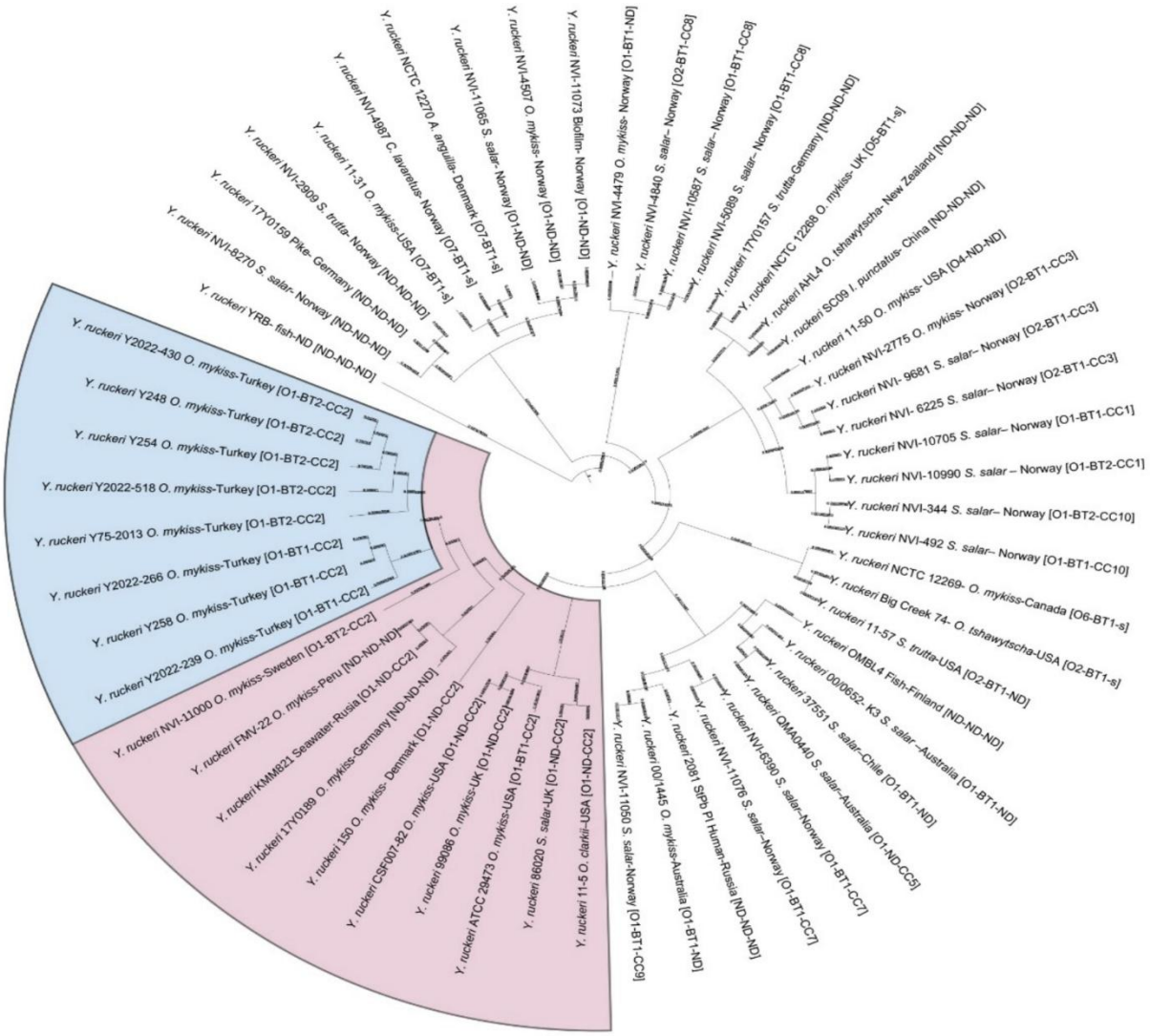
1: Y75–2013; 2: Y93; 3: Y248; 5: - Bant yok.

Sonuç olarak; Western blot analizleri, ***Y. ruckeri*** serotipi O1'e ait BT1 ve BT2 suşlarının antijenik profilleri arasında belirgin farklılıklar olduğunu ortaya koymuş; özellikle BT2 antiserumları ile tespit edilen 60 ve 70 kDa protein bantlarının BT1 antiserumlarıyla tanımlanamaması, biyotipler arasında özgül protein ekspresyonuna işaret etmektedir. Ayrıca BT2 izolatlarında aşırı ifade edilen 35 kDa protein bandı, bu biyotipin immunolojik yanıt profiline katkı sağlayan önemli bir antijenik belirteç olarak değerlendirilmiştir. BT1 izolatlarında referans

suşla ortak majör bantların varlığına rağmen, bazı izolatlara özgü farklı moleküler ağırlıkta bantların gözlenmesi (örneğin Y2022–239'da 65 kDa) saha kaynaklı suşlar arasında da antijenik varyasyonların bulunduğunu göstermektedir. Bu bulgular, BT1 ve BT2 biyotipleri arasında hem kalitatif hem kantitatif düzeyde antijenik farklılıklar olduğunu ve bu durumun aşı geliştiriciler açısından dikkate alınması gereken önemli bir parametre olduğunu ortaya koymaktadır.

4.4.1.6 Genomik analiz ve Genom Biyoinformatik Analiz

BV-BRC'nin bakteriyel genom ağacı Olson vd. 2023; Olson ve ark., 2023) tarafından özetlenen metodoloji izlenerek elde edildi. *Y. ruckeri* suşları Y75–2013, Y248, Y254, Y258, Y2022–239, Y2022–266, Y2022–430 ve Y2022–518'in genomları sırasıyla PRJNA1140746, JBAJHQ000000000, JBAJHP000000000, JBAJHO000000000, CP163505, CP163507, JBAJHN000000000 ve JBAJHM00000000000 erişim numaraları altında NCBI GenBank veri tabanına yüklendi. Suşların genom boyutlarının yaklaşık 3,8-4,0 Mb olduğu, GC içeriğinin ise %47,3 ile %47,5 arasında değiştiği bulundu. Genom tabanlı TYGS raporlarına göre tüm izolatlar *Y. ruckeri* olarak tanımlandı. Suşların genomları da dahil olmak üzere 56 genomda toplam 1000 tek kopya gen tanımlandı. Bunu takiben*, Y. ruckeri* için kodon ağacını oluşturmak üzere 383.139 amino asit ve 1.149.417 nükleotid hizalandı (Şekil 56).



Şekil 56. Gökkuşağı Alabalığından İzole Edilen *Y. ruckeri* Suşlarının Genom Tabanlı Filogenetik Analizi. Mavi işaretli suşlar GenBank'ta kayıtlı Türk serotip O1 CC2 suşlarını, pembe işaretli suşlar GenBank'ta kayıtlı diğer ülkelerden kayıtlı serotip O1 CC2 suşlarını temsil eder.

Çalışmamızda, O1 BT1 ve O1 BT2 izolatlarının genom dizileri, GenBank'ta bulunan farklı özelliklere sahip (serotip, biyotip, ülke, konukçu ve yıl) 48 *Y. ruckeri* suşunun dizileriyle karşılaştırıldığında, Türk izolatlarının biyotipler arasında önemli filogenetik farklılıklar göstermediği gözlendi. Ancak, birbirlerinden ayrı kümelendiler ve gökkuşağı alabalığından elde edilen O1 izolatlarını da içeren küresel olarak virülan CC2 soyunun bir parçasıydılar (Şekil 56). Bu sonuçlar, çalışmamızda gökkuşağı alabalığında intraperitoneal enfeksiyon yoluyla virülan olduğu kanıtlanan *Y. ruckeri* suşlarına (Y248, Y258, Y2022–239, Y254, Y2022–266, Y2022–430) ek olarak, O1 BT1 Y2022–266'ya benzer yüksek antikor titreleri gösteren Y75–2013 ve Y2022–518 suşlarının da potansiyel olarak virülan olduğunu göstermektedir.

Genomik analiz bulguları, çalışmada incelenen *Y. ruckeri* O1 BT1 ve O1 BT2 izolatlarının 3,8–4,0 Mb genom büyüklüğüne ve %47,3–47,5 GC içeriğine sahip olduğunu ortaya koymuş; bu izolatların GenBank veritabanında kayıtlı küresel *Y. ruckeri* suşlarıyla karşılaştırılmasında biyotipler arasında belirgin filogenetik ayrışma görülmemekle birlikte, Türk kökenli suşların kendi içinde genetik olarak yakınlık göstererek yurt dışı izolatlardan ayrı bir genetik küme oluşturduğu saptanmıştır. Tüm Türk izolatlarının, gökkuşağı alabalığında yaygın enfeksiyonlara neden olan ve küresel ölçekte virülansla ilişkilendirilmiş CC2 soyuna ait olması, bu suşların epidemiyolojik önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca, özellikle intraperitoneal enfeksiyonla yüksek patojenite gösteren Y248, Y258, Y2022–239, Y254, Y2022–266, Y2022–430 ve yüksek antikor yanıtı oluşturan Y75–2013 ile Y2022–518 suşlarının bu kümelenme içinde yer alması, bu izolatların potansiyel olarak virülan ve aşı adayı nitelikli genotipler olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, biyotip ayrımına rağmen genomik düzeydeki yerel adaptasyonların, fenotipik virülansla birleşerek epidemiyolojik analizlerde ve aşılama stratejilerinde dikkate alınması gerektiğini vurgulamaktadır.

Çalışmada yer alan *Y. ruckeri* O1 BT1 ve BT2 suşlarına ilişkin biyotip, serotip, klonal kompleks ve virülans profillerini belirlemek amacıyla geniş kapsamlı bir genom biyoinformatik analiz gerçekleştirilmiş; flhC ve fliP genlerindeki amino asit varyasyonları, virülans faktörlerinin dağılımı ve antimikrobiyal direnç genlerinin varlığı, hem yerli hem de uluslararası referans suşlarla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Biyotip farklılıklarını ayırt etmek için, Tablo 33'de ayrıntılı olarak açıklandığı gibi, farklı serotiplere, biyotiplere ve klonal komplekslere sahip izolatların genomlarından *flh* C ve *fli* P genlerini çıkardık. Daha sonra bu genlerdeki amino asit dizisi varyasyonlarını analiz ettik. Analizlerde, bu çalışmada ilk kez, daha önce bildirilen (Riborg ve ark., 2022) 43. kodondaki amino asit değişimine ek olarak, *flh* C'nin 157. kodonunda bir amino asit değişimi belirledik. Veriler, Atlantik somonunun (*S. salar*) O1 B1 izolatlarının (NHV-3758, NVI-492) CC1 ve CC10'daki flhC kodonları 143 ve 157 ile fliP kodon 224'te sırasıyla glisin (G), valin (V) ve alanin (A) amino asitlerine sahip olduğunu ortaya koydu. Bu amino asitlerin aynı klonal komplekslerden (CC1, CC10) gelen BT2 izolatlarında (NHV-10990, NVI-344) G, V, D (aspartik asit) ve V, V, A ile değiştirildiği bulundu. Bu, Atlantik somonu O1 BT1 ve BT2 izolatları arasında ayrım yapmak için daha önce bildirilen yöntemi (Riborg ve ark., 2023) *doğruladı. Ancak, bu çalışmada temsil edilen tüm izolatların ilgili flh* C ve *fli* P kodonlarında aynı G, I (izolösin) ve Amino asitlere sahip olması nedeniyle CC2 soyundaki gökkuşağı alabalığı O1 BT1 ve BT2 izolatlarında biyotipler arasında ayrım yapmak mümkün olmadı (Tablo 33). Ayrıca, farklı balık türlerinden (*S. salar, Oncorhynchus tshawytscha, Anguilla anguilla, O. mykiss)* O2, O5, O6 ve O7 serotiplerine sahip BT1 izolatlarının flh *C* (kodonlar 143-157) ve *fli* P (kodon 224) amino

asit profillerinin, Atlantik somonu CC1 BT1 izolatlarının profillerine benzer olduğu bulundu (Tablo 33).

Tablo 33. *Y. ruckeri* izolatları için flh C'nin 143, 157 kodonları ve fli P'nin 224 kodonlarındaki amino asit pozisyonları ve DNA dizi verileri, GenBank veri tabanında bulunan farklı serotipler, biyotipler ve klonal komplekslerden elde edilen izolatlarla karşılaştırıldı (n =48).

Suş	Serotip/Biyotip/CC	Konak	*flh* C		*uç* P
			Amino asit pozisyonu		
			143	157	224
NHV-3758	O1/BT1/CC1	*Salmo salar*	G	V	A
NVI-492	O1/BT1/CC10	*Salmo salar*	G	V	A
NHV-10990	O1/BT2/CC1	*Salmo salar*	G	V	D
NVI-344	O1/BT2/CC10	*Salmo salar*	V	V	A
Büyük Dere 74	O2/BT1/S	*Oncorhynchus tshawytscha*	G	V	A
NCTC12270	O7/BT1/S	*Angulus angulus*	G	V	A
NCTC12268	O5/BT1/S	*Oncorhynchus mykiss*	G	V	A
NCTC12269	O6/BT1/S	*Oncorhynchus mykiss*	G	V	A
NCTC12266	O1/BT1/CC2	*Oncorhynchus mykiss*	G	I	A
NVI-11000	O1/BT2/CC2	*Oncorhynchus mykiss*	G	I	A
Y75–2013	O1/BT1/CC2	*Oncorhynchus mykiss*	G	I	A
Y2022–239	O1/BT1/CC2	*Oncorhynchus mykiss*	G	I	A
Y2022–266	O1/BT1/CC2	*Oncorhynchus mykiss*	G	I	A
Y248	O1/BT1/CC2	*Oncorhynchus mykiss*	G	I	A
Y254	O1/BT1/CC2	*Oncorhynchus mykiss*	G	I	A
Y2022–518	O1/BT1/CC2	*Oncorhynchus mykiss*	G	I	A
Y2022–430	O1/BT1/CC2	*Oncorhynchus mykiss*	G	I	A
Y258	O1/BT1/CC2	*Oncorhynchus mykiss*	G	I	A

G: glisin; V: valin; A: alanin; I: izolösin amino asitleri; BT: Biyotip; CC: Klonal kompleks.
Bu çalışmada, gökkuşağı alabalığında virülent olarak tanımlanan altı *Y. ruckeri* O1 BT1 (Y258, Y2022–266, Y2022–239) ve O1 BT2 (Y75–2013, Y248, Y254, Y2022–430, Y2022–518) izolatının yanı sıra, yüksek antijenik ve serolojik aktiviteye sahip Y2022–518 (O1 BT2) ve Y75–2013 (O1 BT2) izolatlarının tüm genom dizileri belirlendi. Elde edilen genom dizilerindeki virülans genlerinin, NCBI GenBank'ta bulunan 48 *Y. ruckeri* izolatınınkilerle karşılaştırmalı analizleri, bu çalışmada temsil edilen tüm *Y. ruckeri* suşlarında (n = 8) tutarlı bir virülans faktörü setinin varlığını ortaya koydu (Tablo 34).

Tablo 34. Riborg ve ark. (2023) tarafından bildirilen varsayımsal faktörler listesine göre *Y. ruckeri* O1 BT 1 ve BT2 suşlarımızda virülans genlerinin varlığı/yokluğu

Gen Kümesi	**Sınıflandırma**	***Y. ruckeri* O1 BT1 Suşu**			***Y. ruckeri* O1 BT2 Suşu**				
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Evet	Tip III salgı sistemi	+	+	+	+	+	+	+	+
Yst1	Tip II salgı sistemi	+	+	+	+	+	+	+	+
VirB / VirD	Tip IV salgı sistemi	+	+	+	+	+	+	+	+
Tc	Toksin kompleksi	−	−	−	−	−	−	−	−
Yılım	IAT-işgalci	+	+	+	+	+	+	+	+
YrInv	IAT-işgalci	+	+	+	+	+	+	+	+
Bir. İşgal	IAT-işgalci	−	−	−	−	−	−	−	−
YraS	HSF/SDS	−	−	−	−	−	−	−	−
bağırsak/srI	Sorbitol kullanım kümesi	−	−	−	−	−	−	−	−
O1-LPS	O-antijen biyosentez kümesi	+	+	+	+	+	+	+	+
yrp1	Proteaz	+	+	+	+	+	+	+	+
yrpAB	Peptidaz	+	+	+	+	+	+	+	+
yhlBA	hemolizin	+	+	+	+	+	+	+	+
Ruckerbactin	Siderofor demir edinimi	+	+	+	+	+	+	+	+

Gen Kümesi	Sınıflandırma	*Y. ruckeri* O1 BT1 Suşu			*Y. ruckeri* O1 BT2 Suşu				
		1	2	3	4	5	6	7	8
cdsAB	L-sistein edinimi	+	+	+	+	+	+	+	+
znuABC	Çinko edinimi	+	+	+	+	+	+	+	+
barA-uvrY	Tepki düzenleyici	+	+	+	+	+	+	+	+
omp F	Dış zar proteini	+	+	+	+	+	+	+	+
Fil. hema.	Dış zar proteini	+	+	+	+	+	+	+	+
Biyofilm	Varsayılan salgılanan polimer	+	+	+	+	+	+	+	+
lpxD	lipid A biyosentezi	+	+	+	+	+	+	+	+
flhDC	Kamçı salgısı	+	+	+	+	+	+	+	+

1: Y2022–239 (Ch1); 2: Y258 (Ch2), 3: Y2022–266 (Ch3), 4: Y75–2013; 5: Y2022–518; 6: Y248 (Ch4); 7: Y2022–430 (Ch5); 8: Y254 (Ch6); **TP:** kesilmiş protein; **Un. invasin:** İsimsiz invasin; **Fil. Hema.:** Filamentöz hemaglutinin; **Biyofilm:** Biyofilm polimer kümesi.

Bu sonuçlara göre çalışmamızda temsil edilen O1 BT1 ve O1 BT2 suşlarının; tip III salgı sistemi Ysa; tip II salgı sistemi *Yst* 1; tip IV salgı sistemi *Vir* B/ *Vir* D; ototransporter (IAT-invasin) *yrI* lm *YrI* nv; O-antijen biyosentez kümesi O1-LPS; proteaz *yrp* 1; peptidaz *yrp* AB; hemolizin *yhl* BA; siderofor demir kazanımı Ruckerbactin; L-sistein kazanımı *cds* AB; çinko kazanımı *znu* ABC; cevap düzenleyici *bar* A- *uvr* Y; dış zar proteini *omp* F; filamentöz hemaglutinin; varsayılan salgılanan polimer biyofilm polimer kümesi; lipid A biyosentezi lpxD; ve kamçı salgısı flhDC operonu genlerini barındırdığı belirlenmiştir. Suşlar arasında bu genler açısından bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca gökkuşağı alabalığında intraperitoneal enfeksiyonda nispeten düşük bir ölüm oranı (%30) gösteren Y2022–239 suşunun da diğer suşlarda tespit edilen aynı virülans genlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada analiz edilen *Y. ruckeri* suşlarının (Y75–2013, Y248, Y254, Y258, Y2022–239, Y2022–266, Y2022–430 ve Y2022–518) antimikrobiyal direnç (AMR) genleri NCBI veri tabanındaki referans AMR genleri ile eşleştirildiğinde;

tüm suşların sul 2, Yrc -1, APH (6)-Id, dfr A14, CRP (pulvomisine direnç sağlayan *Escherichia coli* EF-Tu mutantları), *rsm* A, *Klebsiella pneumoniae Kpn* H ve *Klebsiella pneumoniae Kpn* F genlerini taşıdığı belirlendi. Bu AMR genlerinin suşlar arasında tamamen benzer olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada yürütülen kapsamlı genom biyoinformatik analizler, *Y. ruckeri* O1 BT1 ve BT2 izolatlarının flhC ve fliP genlerindeki amino asit dizilimlerinin CC2 klonal soyu içinde tamamen korunduğunu ve bu bağlamda biyotipler arası moleküler ayrımın mümkün olmadığını ortaya koymuştur. Virülans genleri yönünden yapılan karşılaştırmalı analizlerde ise sekiz saha izolatının tamamında Tip II, III ve IV salgı sistemleri, IAT-invasin gen kümeleri, O-antijen biyosentezi, hemolizin, proteaz, peptidaz ve metal iyonu alımına ilişkin tüm belirteçlerin tam olarak korunduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, antimikrobiyal direnç analizleri bu suşların sul2, Yrc-1, dfrA14 gibi ortak direnç genleri taşıdığını göstermiştir. Elde edilen bu yüksek düzeydeki genetik ve fonksiyonel benzerlik, saha suşlarının hem patojenite hem de çevresel direnç bakımından oldukça homojen bir yapıda olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, özellikle aşı geliştirme süreçlerinde antijenik stabiliteye dayalı formülasyonların belirlenmesi, çapraz koruma potansiyelinin değerlendirilmesi ve etkinlik (potens) testlerinin hedefe yönelik tasarlanması açısından büyük önem taşımakta; ayrıca yerli suşlara dayalı aşı geliştirme stratejilerinin bilimsel temelini güçlendirmektedir.

4.4.1.7 İn-Vivo Virulens Testleri ve *Y. ruckeri* serotip O1 BT1 ve BT2 Eprüvasyon Suşlarının Seçim Kriterleri

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarında yersiniosis enfeksiyonlarına neden olan *Y. ruckeri*'nin serotip O1 biyotip 1 (BT1) ve biyotip 2 (BT2) suşlarının virülens potansiyeli deneysel olarak araştırılmıştır. Farklı coğrafi bölgelerden elde edilen saha izolatları, hareketlilik, koyun kanında hemoliz, Tween, jelatin ve kazein hidrolizi gibi fenotipik özellikleri, serolojik, antijenik ilişkileri, tüm hücre ve antijenik protein profilleri ve genom bioinformatik verileri bütüncül bir yaklaşımla ele alınarak karakterize edilmiştir.

Bu yaklaşımla yapılan değerlendirme sonucunda, her biyotipten üçer temsilci izolat seçilmiştir:

- **BT1 suşları:** Y2022–239 (Sivas), Y258 (Trabzon), Y2022–266 (Düzce),
- **BT2 suşları:** Y248 (Muğla), Y2022–430 (Sakarya), Y254 (Kayseri).

Saflığı doğrulanan izolatlar %5 koyun kanlı agarda 22 °C'de 24 saat inkübe edilmiş, seçilen koloniler TSB besiyerine aktarılarak 22 °C'de 24 saat çalkalamalı inkübatörde 220 rpm'de kültüre edilmiştir. Her kültürün canlı bakteri sayısı (cfu/mL) seri dilüsyon yöntemiyle TSA'da belirlenmiş ve eş zamanlı olarak optik yoğunluk (OD) 620 nm'de ölçülerek tüm inokulumlar 0,1 OD'ye standardize edilmiştir. Virülens testlerinde, 30 gökkuşağı alabalığından oluşan her deney grubuna yaklaşık 10^7 cfu/balık dozunda bakteri süspansiyonu, 0,32 mL/L fenoksietanol ile anestezi sonrası intraperitoneal (ip) olarak 0,1 mL hacminde uygulanmıştır. Kontrol gruplarına ise aynı hacimde %0,85 NaCl solüsyonu verilmiştir. Tüm balıklar 21 gün boyunca gözlenmiş, mortalite durumları ve klinik semptomlar kaydedilmiş, ölen balıkların böbreklerinden yeniden izolasyon gerçekleştirilmiştir.

Deney süresince kullanılan su parametreleri (sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen) sürekli izlenmiş olup, alabalığın stres eşiğini aşmayacak şekilde düzenlenmiştir. Böylece virülens değerlendirmesinde çevresel değişkenlerin etkisi minimize edilmiştir.

Bu çalışmada, serotip O1'e ait *Y. ruckeri* BT1 ve BT2 suşlarının gökkuşağı alabalığında oluşturduğu patogenez ve mortalite düzeyleri in vivo enfeksiyon modeli ile değerlendirildi. Deney gruplarında kullanılan BT1 suşları Y2022–239 (Ch1, Sivas), Y258 (Ch2, Trabzon) ve Y2022–266 (Ch3, Düzce); BT2 suşları ise Y248 (Ch4, Muğla), Y2022–430 (Ch5, Sakarya) ve Y254 (Ch6, Kayseri) olarak tanımlanmıştır. BT1 grubundaki enfekte balıklarda renk koyulaşması, bilateral veya unilateral ekzoftalmus, ağız, ventral yüzgeçler ve anüs çevresinde peteşiyal kanamalar gibi klasik yersiniosis semptomları gözlenmiştir (Şekil 57: A,B). Buna karşılık BT2 suşlarıyla enfekte edilen gruplarda daha ağır klinik bulgular gelişmiş; karın şişkinliği (assit), karın boşluğunda sarımsı sıvı birikimi, hepatosplenomegali ve dil, alt çene bölgesinde kanamalar belirgin olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 57 C). Bu semptomlar, BT2 suşlarının daha invaziv bir enfeksiyon seyri izlediğini ortaya koymuştur.



Şekil 57. *Y. ruckeri* serotip O1 BT1 ve BT2 suşlarıyla Gökkuşağı alabalığında yapılan deneysel enfeksiyonda (A): *Y. ruckeri* O1 BT1 ile enfekte gökkuşağı alabalığında renk koyulaşması ve ekzoftalmus ; (B): *Y. ruckeri* O1 BT1 ile enfekte gökkuşağı alabalığında ağız, karın yüzgeçleri ve anüs çevresinde kanamalar ; (C): *Y. ruckeri* O1 BT2 ile enfekte gökkuşağı alabalığında dil ve alt çenede kanamalar.

Virülens denemelerinde tüm suşlar, gökkuşağı alabalıklarında mortaliteye neden olmuş; ancak mortalite düzeyleri suşlara göre değişkenlik göstermiştir. Sağkalım analizleri, suşlar arasındaki virülens düzeyini istatistiksel olarak da ortaya koymuştur. BT1 suşları için 21 günlük deney süresinde gözlenen sağkalım oranları şu şekilde belirlenmiştir:

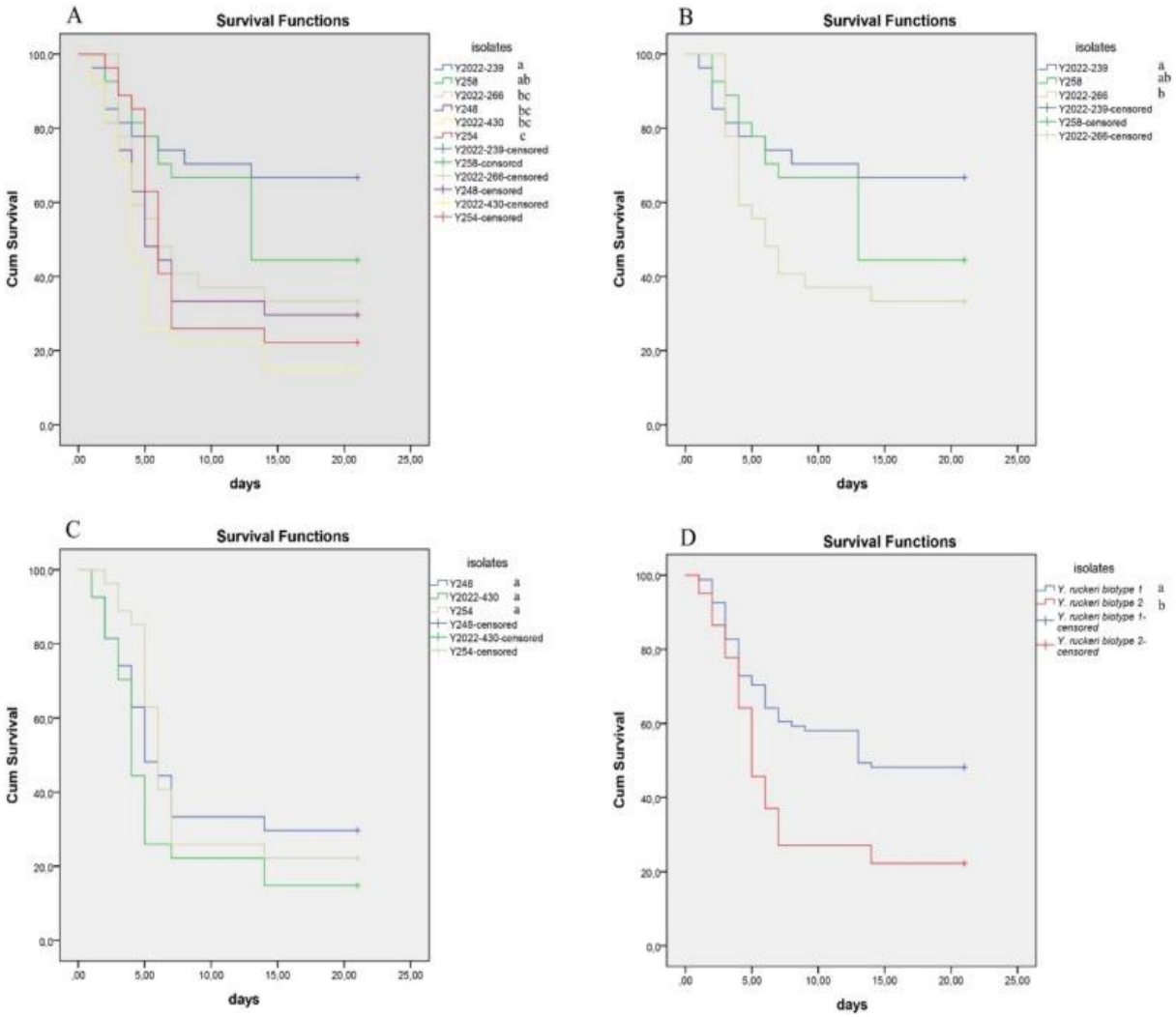
- **Y2022–266:** %33,3 (% 66,7 mortalite)
- **Y258:** %44,4

- **Y2022–239:** %66,7 (%33,3 mortalite)

BT1 suşları arasında özellikle Y2022–239 ile Y2022–266 suşları arasında sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Şekil 58, p<0,05). BT2 suşlarına ait sağkalım oranları ise:

- **Y2022–430:** %14,8 (%85,2 mortalite)
- **Y254:** %22,2
- **Y248:** %29,6

BT2 grubu içindeki suşlar arasında sağkalım oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 58). BT1 ve BT2 suşlarının karşılaştırmalı sağkalım analizinde, BT2 suşları ile enfekte edilen gruplarda sağkalım oranlarının BT1 suşlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 58, p<0,05). Bu bulgu, BT2 suşlarının daha yüksek virülens potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 58. 21 günlük enfeksiyon periyodunda gökkuşağı alabalıklarının Kaplan–Meier sağkalım eğrileri.(A): BT1 izolatlarına ait sağkalım eğrileri (Y2022–239, Y258, Y2022–266); (B): BT2 izolatlarına ait sağkalım eğrileri (Y248, Y2022–430, Y254); (C): Tüm izolatların toplu

sağkalım eğrileri; (D): BT1 ve BT2 grupları arası karşılaştırmalı sağkalım sonuçları ($p<0,05$). Şekillerde grup etiketleri üzerindeki küçük harf farkları, gruplar arası istatistiksel anlamlılıkları ifade etmektedir.

Bu çalışmada, *Y. ruckeri* serotip O1'e ait biyotip 1 (BT1) ve biyotip 2 (BT2) suşlarının gökkuşağı alabalığında oluşturduğu patogenez ve mortalite potansiyelleri in vivo enfeksiyon modeli kullanılarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. BT1 grubunda yer alan suşlar klasik yersiniosis semptomlarına neden olurken, BT2 suşları ile enfekte edilen balıklarda daha ağır klinik bulgular ve sistemik yayılım belirtileri gözlenmiştir. BT2 ile enfekte gruplarda abdominal distansiyon, **asites** (karın boşluğunda sıvı birikimi), hepatosplenomegali ve mukozal kanamalar gibi invaziv enfeksiyon bulgularının öne çıkması, bu biyotipin patojenite düzeyinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Kaplan–Meier sağkalım analizleriyle desteklenen virülans verileri, BT1 suşlarının mortalite oranlarının suşa bağlı olarak %33,3 ile %66,7 arasında değiştiğini, buna karşılık BT2 suşlarında mortalitenin %70'in üzerinde seyrederek daha belirgin bir **mortalite düzeyi** oluşturduğunu ortaya koymuştur. Özellikle BT1 suşları arasında Y2022–239 ile Y2022–266 suşları arasında sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmışken ($p<0,05$), BT2 grubu içindeki suşlar arasında benzer bir fark gözlenmemiştir. BT1 ve BT2 grupları arasında yapılan karşılaştırmalı analizde ise, BT2 suşları ile enfekte edilen gruplarda mortalite oranlarının BT1 suşlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 58, $p<0,05$). Bu bulgular, *Y. ruckeri* BT2 suşlarının yalnızca daha agresif klinik tabloya yol açmakla kalmayıp, aynı zamanda daha yüksek mortaliteye neden olduğunu göstermekte; BT2'nin gökkuşağı alabalığında daha invaziv ve öldürücü bir enfeksiyon seyri izlediğini doğrulamaktadır. Elde edilen veriler, hastalık kontrol programları ve aşı geliştirme stratejilerinde biyotip farklılığının dikkate alınması gerektiğini güçlü biçimde ortaya koymakta; BT2 suşlarının sahada daha ciddi enfeksiyon tablolarına neden olabileceğini işaret etmektedir. Bu doğrultuda, *Y. ruckeri* BT1 biyotipine ait Y258 (Y286 aynı dönem, aynı balık izolatı) suşu ile BT2 biyotipine ait Y2022–430 suşunun; aşı formülasyonunda kullanılan ana tohum (master seed) suşlarından genetik ve coğrafi köken açısından farklılık göstermeleri, saha koşullarında yüksek mortalite oranları ve karakteristik klinik bulgularla seyreden enfeksiyon tabloları oluşturmaları, ayrıca in vivo enfeksiyon modelinde güvenilir, tekrarlanabilir ve biyotipe özgü virülens profili sergilemeleri nedeniyle, eprüvasyon (çalışma tohum) suşları olarak seçilmesine karar verilmiştir.

4.4.2 *L. garvieae* ve *L. petauri* Aşı Suşlarının Seçimine Yönelik Çalışmalar *(L. garvieae ve L. petauri* İzolatlarının Fenotipik (Virulens), Serotipik (Hiperimmun Serum Eldesi, Aglütinasyon Testleri) Peoteomik (SDS PAGE, Westernblot) ve Genomik Özellikleri (Tüm Genom Sekans, Genom Biyoinformatik Analizi)

4.4.2.1 *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarının Fenotipik Virülens Özellikleri (FVÖ)

Bu çalışmada, 2013–2023 yılları arasında Türkiye genelindeki çeşitli gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss) işletmelerinden izole edilen toplam 134 *Lactococcus* spp. saha izolatı fenotipik virülens özellikleri (FVÖ) açısından değerlendirilmiştir. Bu izolatların 40'ı *L. garvieae* (LG), 94'ü ise *L. petauri* (LP) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca referans kontrol grubu olarak, *L. garvieae* ATCC 43921 ve *L. petauri* LMG 10300T suşları kullanılmıştır. Tüm saha izolatları, klinik belirti gösteren gökkuşağı alabalıklarından elde edilmiş olup, izole edilen dönemlerde genellikle düşük su kalitesi, ani sıcaklık değişimleri (özellikle ≥15 °C) ve diğer stres faktörlerinin etkili olduğu tespit edilmiştir. *L. garvieae* izolatlarının tamamı Ege Bölgesi'ndeki işletmelerden (Muğla ve Kütahya) elde edilmiştir. Öte yandan, 2013–2017 yılları arasında izole edilen ve aşı geliştirme çalışmaları kapsamında temsilî olarak seçilen 17 *L. petauri* suşu ise Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerini temsilen 8 farklı ilden (Muğla, Kütahya, Elazığ, Trabzon, Rize, Gümüşhane, Kayseri ve Sivas) seçilmiştir. Suşların fenotipik virülens karakterizasyonu kapsamında hemoliz, kazeinaz (proteinaz), jelatinaz, DNAse ve lipaz (Tributyrin Agar) aktiviteleri değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde DNAse ve lipaz aktiviteleri her iki türde de negatif sonuç verirken, hemoliz, proteinaz ve jelatinaz aktiviteleri açısından suşlar arasında anlamlı varyasyonlar gözlenmiştir. **Özellikle hemoliz, proteinaz ve jelatinaz testlerinin tamamında pozitif reaksiyon gösteren izolatlar**, potansiyel olarak yüksek virülens özellikleri taşıdıkları değerlendirilerek, aşı geliştirme çalışmalarında aday suşlar olarak seçilmiştir. Bu izolatlar, ileri antijenik karakterizasyon, hiperimmün serum üretimi ve immunolojik testlerde kullanılmak üzere tanımlanmıştır. Seçilen izolatlara ait fenotipik virülens profilleri Tablo 35 ve 36'da sunulmaktadır.

Tablo 35. Prototip aşı üretmek için seçilen *L. garvieae* izolatlarının izolasyon bilgileri ve FVÖ profilleri

İzolat kodu	İzolasyon yılı	İzolasyon bölgesi	Hemolizin	Kazeinaz	Jelatinaz
L17	2013	Muğla	alfa	+	+
L18	2013	Muğla	alfa	+	+
L25	2013	Muğla	alfa	+	+
L37 (ÖS-37)	2013	Muğla	alfa	+	+

L36	2013	Muğla	alfa	+	+
L39 (S-39)	2013	Muğla	alfa	+	+
L52	2014	Muğla	alfa	+	+
L67	2014	Kayseri	alfa	+	+
L72	2014	Kütahya	alfa	+	+
L89	2014	Muğla	alfa	+	+
ATCC43921	-	-	alfa	-	-

Tablo 36. Prototip aşı üretmek için seçilen *L. petauri* izolatlarının izolasyon bilgileri ve FVÖ profilleri

İzolat kodu	**İzolasyon yılı**	**İzolasyon bölgesi**	**Hemolizin**	**Proteniaz**	**Jelatinaz**
L1	2014	Muğla	alfa	+	+
L39 (s-39)	2014	Muğla	alfa	+	+
L63	2014	Muğla	alfa	+	+
L66	2014	Muğla	alfa	+	+
L81	2014	Sivas	alfa	+	+
L140	2014	Muğla	alfa	+	+
L151	2014	Gümüşhane	alfa	+	+
L152	2014	Rize	alfa	+	+
L202288	2022	Kayseri	alfa	+	+
L202296	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022162	2022	Kayseri	alfa	+	+
L2022181	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022182	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022184	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022195	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022197	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022202	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022257	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022263	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022270	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022282	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022283	2022	Sivas	alfa	+	+

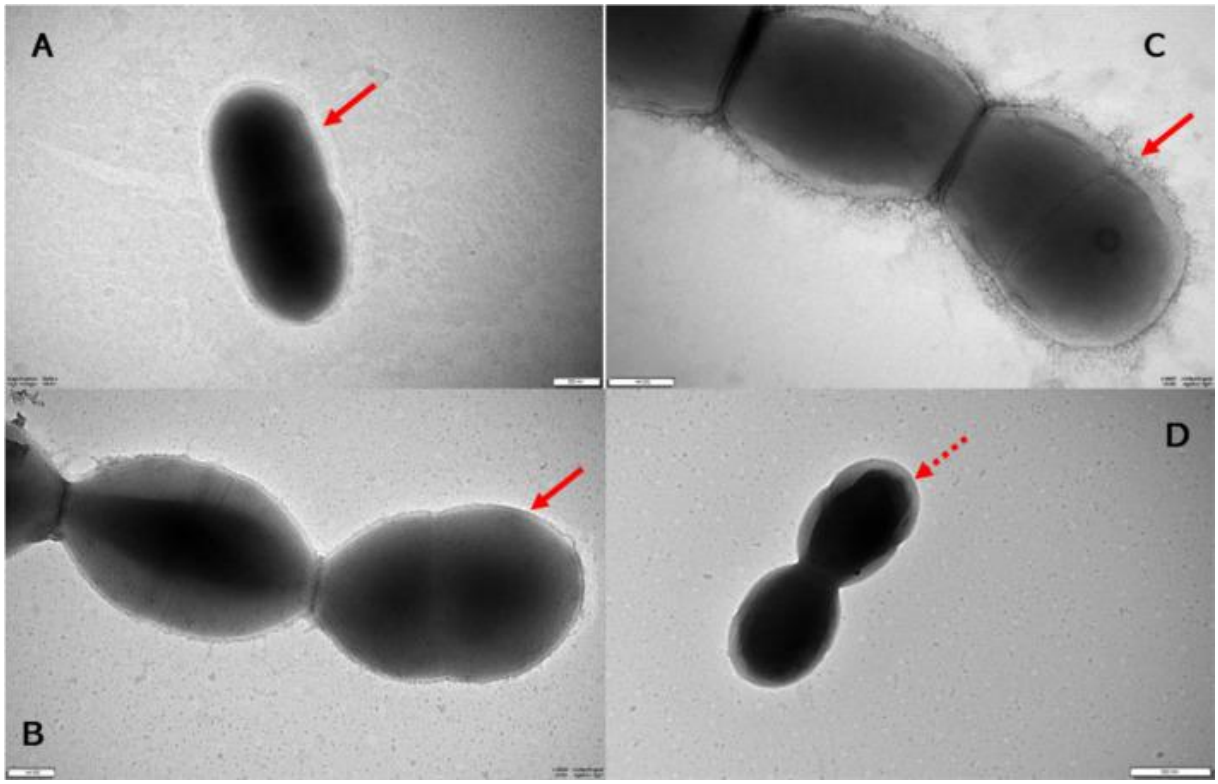
L2022289	2022	Kayseri	alfa	+	+
L2022296	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022298	2022	Kayseri	alfa	+	+
L2022299	2022	Kayseri	alfa	+	+
L2022305	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022325	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022336	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022368	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022369	2022	Sivas	alfa	+	+
L2022434	2022	Sivas	alfa	+	+

Bu çalışmada, 2013–2023 yılları arasında Türkiye'nin farklı bölgelerindeki gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss) yetiştiriciliği yapılan işletmelerden elde edilen toplam 134 Lactococcus spp. saha izolatı fenotipik virülens özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Moleküler ve fenotipik tanımlamalar sonucunda bu izolatların 40'ı *L. garvieae*, 94'ü ise *L. petauri* olarak sınıflandırılmıştır. Tüm izolatların klinik belirti gösteren balıklardan elde edilmesi ve izole edildikleri dönemlerde düşük su kalitesi, ani sıcaklık değişimleri ve çevresel stres faktörlerinin etkili olduğunun belirlenmesi, hastalığın ortaya çıkışında çevresel etkenlerin rolünü desteklemektedir. Fenotipik virülens değerlendirmelerinde DNAse ve lipaz aktiviteleri tüm suşlarda negatif bulunurken, hemoliz, proteinaz ve jelatinaz aktiviteleri arasında türler ve izolatlar düzeyinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Özellikle bu üç testte de pozitif reaksiyon gösteren suşların yüksek virülens potansiyeline sahip olduğu değerlendirilmiş ve bu özellikleri nedeniyle söz konusu suşlar, aşı geliştirme çalışmaları kapsamında aşı suşu adayları olarak seçilmiştir. Çalışmada tanımlanan bu virülan suşlar, ileri düzey antijenik karakterizasyon, hiperimmün serum üretimi ve bağışıklık yanıtı testlerinde kullanılmak üzere arşivlenmiş ve karakterize edilmiştir. Bu bulgular, Türkiye'deki *Lactococcus spp.* enfeksiyonlarının epidemiyolojik yapısını, suşların bölgesel dağılımını ve virülens potansiyelini ortaya koyarak, etkili bir aşı geliştirilmesi ve hastalık kontrol stratejilerinin oluşturulması açısından önemli bir temel teşkil etmektedir.

4.4.2.2 *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarında Kapsül Oluşumunun Elektron Mikroskobu ile Değerlendirilmesi

Çalışmada, *L. garvieae* ve *L. petauri* suşlarında kapsül formasyonunun varlığını belirlemek amacıyla transmisyon elektron mikroskobu (TEM) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, *L. petauri* suşları L1 ve referans suş LMG 30040T ile *L. garvieae* suşları L67 ve saha suşu ÖS-37, kapsül benzeri yapı oluşumu açısından değerlendirilmiştir. TEM görüntüleme sonucunda,

her iki türden söz konusu suşların yüzeylerinde belirgin şekilde sınırlı, amorf ve ince bir tabaka şeklinde tanımlanabilecek **mikrokapsül benzeri** yapıların bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 59 A–C). Bu morfolojik yapıların varlığı, kapsüler glikoprotein içeriğine bağlı olarak hücre yüzeyinde oluşan fizyolojik kapsül yapılarına işaret etmektedir.



Şekil 59. *L. petauri* izolatları L1'de (A), LMG 30040^{T}'de (B) ve *L. garvieae* izolatı L67'de (C) kapsül benzeri yapı veya mikro kapsüllenmişlik (düz kırmızı ok) gösteren seçilmiş *L. garvieae* ve *L. petauri* bakteri hücrelerinin elektron mikroskobu görüntüsü ve *L. garvieae* ATCC 43921^{T}'de (D) bu yapıların yokluğu (noktalı kırmızı ok) .

Buna karşılık, diğer saha suşlarının tamamında, örneğin referans *L. garvieae* ATCC 43921 suşunda benzer kapsül, mikrokapsül veya kapsül benzeri yapılar gözlenmemiştir (Şekil 59D). Bu durum, kapsül formasyonunun tüm izolatlarda sabit olmadığını ve tür/izolat düzeyinde farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bulgular, kapsül oluşumunun yalnızca belirli suşlarda gözlenmesi nedeniyle, bu fenotipin suş özgüllüğüne sahip olabileceğini ve potansiyel olarak virülens düzeyine katkı sağlayan bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

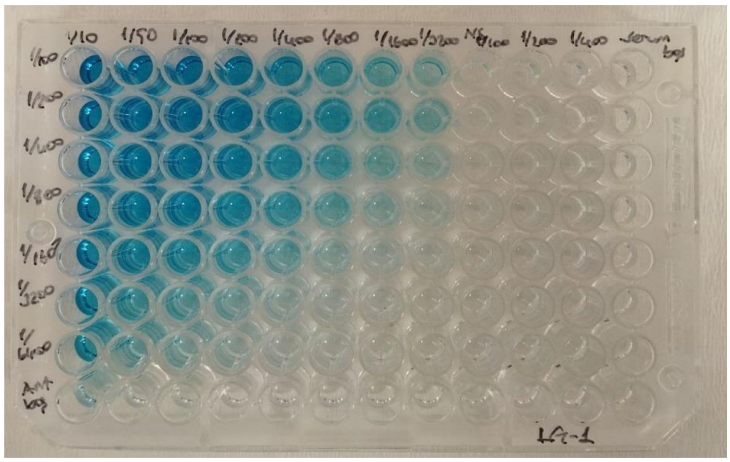
Ayrıca bu çalışma, önceki literatürde bildirilen bulgularla da uyumludur. Ooyama ve ark. (2002) ile Rao ve ark. (2021) tarafından bildirilen kapsül benzeri yapılar ile karşılaştırıldığında, kapsül oluşumunun genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak ifade edildiği ve her suşta gözlenmediği anlaşılmaktadır. Elde edilen bu veriler, aşı geliştirme çalışmaları açısından değerlendirildiğinde, kapsül pozitif izolatların antijenik açıdan farklılık gösterebileceğini ve bu farklılığın bağışıklık yanıtında etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada, *L. garvieae* ve *L. petauri* suşlarında kapsül oluşumunun varlığı transmisyon elektron mikroskobu ile değerlendirilmiş ve yalnızca bazı saha ve referans suşlarında mikrokapsül benzeri yapılar gözlenmiştir. Bu yapıların her iki türde de sınırlı, amorf ve ince tabaka şeklinde hücre yüzeyinde bulunması, kapsüler glikoprotein içeriğine bağlı fizyolojik kapsül oluşumunu düşündürmektedir. Kapsül benzeri yapıların yalnızca belirli suşlarda saptanması, bu fenotipin suş spesifik olduğunu ve genetik ile çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymuştur. Bulgular, kapsül formasyonunun potansiyel bir virülens belirteci olabileceğini ve kapsül pozitif izolatların aşı geliştirme süreçlerinde antijenik çeşitlilik açısından dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

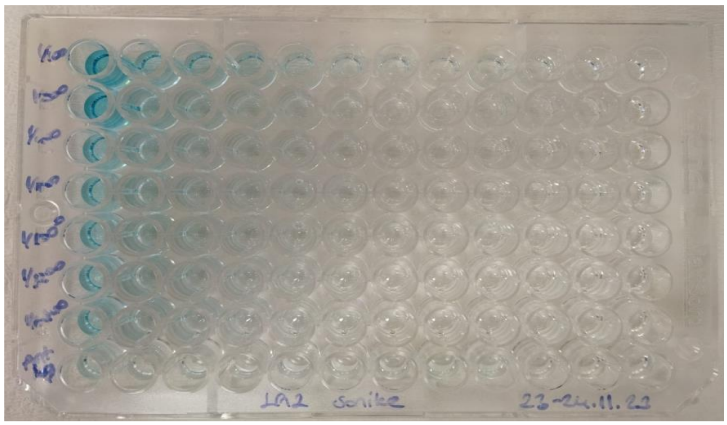
4.4.2.3 *L. garvieae* ve *L. petauri* İzolatlarının Serotipik (Hiperimmun Serum Eldesi) Özellikleri

Bu çalışmada, *L. garvieae* (ATCC 43921T), mikrokapsüllü saha suşu ÖS-37 ve *L. petauri* (LMG 30040T) ile kapsülsüz saha suşu S-39'a karşı tavşanlarda geliştirilen hiperimmün serumlar, izolat düzeyinde tür ayrımı ve çapraz reaksiyon analizleri amacıyla değerlendirilmiştir. Hiperimmün serumların antikor titreleri, indirekt ELISA yöntemi ile ölçülmüş olup, tüm antijen ve serum kontrol kuyularında nonspesifik bağlanma tespit edilmemiştir.

ELISA analizinde; *L. garvieae* için antijen dilüsyonu 1/1600, serum 1/200 ve konjugat 1/20.000; *L. petauri* için ise sırasıyla 1/1200, 1/10 ve 1/20.000 olarak belirlenmiştir. Bu dilüsyonlar Western blot analizlerinde de geçerliliğini korumuştur. Elde edilen ELİSA plak sonuçları Şekil 60 ve 61'de sunulmuştur.



Şekil 60. ELISA analizi ile *L. garvieae* (ATCC 43921) antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü.



Şekil 61. ELISA analizi ile *L. garvieae* (ATCC 43921) antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü

4.4.2.4 *L. garvieae* ve *L. petauri* İzolatlarının Serolojik Özellikleri

Bu çalışmada, *L. garvieae* (ATCC 43921T) referans suşu, mikrokapsüllü saha suşu ÖS-37, *L. petauri* (LMG 30040T) referans suşu ve kapsülsüz saha suşu S-39'a karşı tavşanlarda geliştirilen dört ayrı hiperimmün serum kullanılarak aglütinasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen antiserumlarla yapılan reaksiyonlar sonucunda tür içi ve türler arası serolojik yanıt profilleri değerlendirilmiş; izolatlar düzeyinde çapraz reaktivite düzeyi ortaya konmuştur. Bu aglütinasyon testlerine ait bulgular Tablo 37'de özetlenmiş olup, *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatları arasında antijenik ayrışma düzeyi ile mikrokapsül yapılarının immün yanıt üzerindeki etkisi kapsamlı biçimde analiz edilmiştir. *L. garvieae* referans antiserumu (LG1), yalnızca homolog suşla reaksiyon gösterirken; *L. petauri* referans antiserumu (LP-1), tüm kapsüllü ve kapsülsüz *L. petauri* saha suşlarıyla pozitif reaksiyon vermiş, hiçbir *L. garvieae* izolatı ile aglütine olmamıştır. Bu sonuç, *L. petauri* suşlarının yüksek antijenik homojenliğini ve tür-spesifik immün yanıt potansiyelini yansıtmaktadır. Mikrokapsüllü *L. garvieae* saha suşu ÖS-37'ye karşı elde edilen antiserum ise, ATCC 43921T dışındaki tüm *L. garvieae* saha suşlarıyla ve ayrıca referans dahil tüm *L. petauri* suşlarıyla aglütinasyon göstermiştir. Bu geniş çapraz reaktivite, mikrokapsül yapıların hem türler arası korunmuş epitoplar taşıdığını hem de bu yapıların bağışıklık yanıtında baskın rol oynadığını düşündürmektedir. Benzer şekilde, kapsülsüz *L. petauri* saha suşu S-39'dan elde edilen antiserum da, tüm *L. petauri* izolatlarıyla ve yalnızca kapsülsüz *L. garvieae L18 suşu ile* aglütinasyon göstermiştir.

Tablo 37. *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatlarının aglutinasyon test sonuçları

İzolat	LG-1 Serum* 1/40	LG-1 Serum* 1/80	LG-1 Serum* 1/160	LP-1 Serum* 1/40	LP-1 Serum* (1/80)	LP-1 Serum* 1/160	ÖS-37 Serum* 1/40	ÖS-37 Serum* 1/80	ÖS-37 Serum* 1/160	S-39 Serum* 1/40	S-39 Serum* 1/80	S-39 Serum* 1/160
LG1	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+	+	+
ÖS37	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−
L18	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+
L39	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−
L52	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−
L67	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−
L72	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−
L89	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−
LP-1	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S-39	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
296	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+
L1	−	−	−	w	w	−	+	+	+	+	+	+
L140	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+
L150	−	−	−	+	w	−	+	+	+	+	+	+
L151	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L152	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+

LG1: *L. garvieae* ATCC 43921^{T}; LP-1: *L. petauri* LMG 30040^{T}; ÖS- 37, L18, L39, L52, L, 67 L72 ve L89 *L. garvieae* saha suşları; S-39, L1, L2 L150, L151, L152 *L. petauri* saha suşları; *:antiserum.

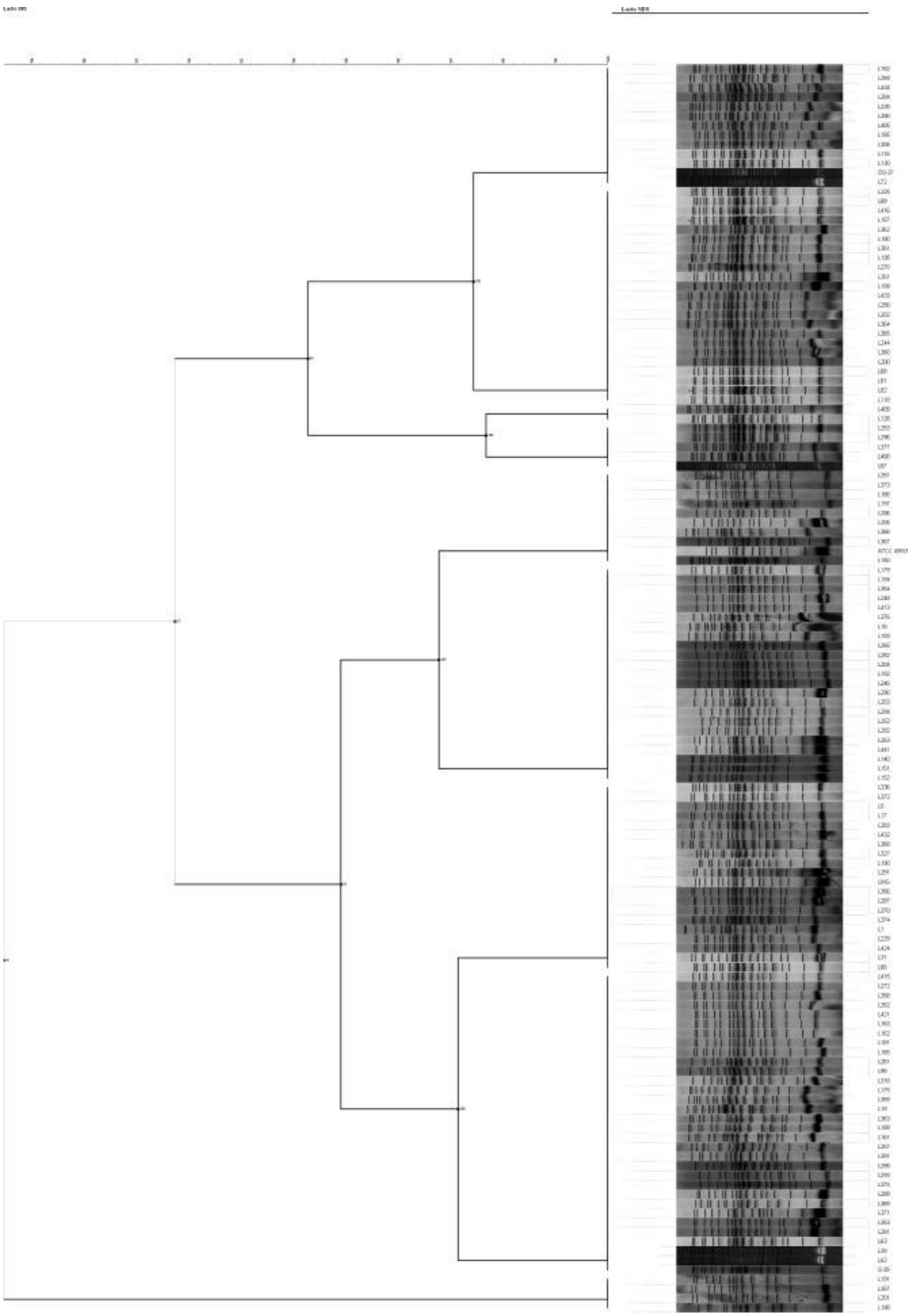
Bu veriler, *L. garvieae* ve *L. petauri* arasında belirgin antijenik ayrışmayı ortaya koymakla birlikte, **mikrokapsüllü *L. garvieae* suşlarının iki tür arasında çapraz reaksiyon gösteren ortak epitoplara sahip olduğunu** ortaya koymaktadır. **Bu durum, özellikle kapsül yapıları taşıyan suşların kombine aşı formülasyonlarında kullanılmasını bilimsel açıdan rasyonel ve stratejik kılmaktadır.** Mikrokapsüllü *L. garvieae* suşlarının hem homotipik hem de *L. petauri*'ye karşı heterotipik bağışıklık yanıtı oluşturabilme potansiyeli, bu iki türü hedefleyen kombine aşı formülasyonlarında dikkate alınmalı ve sahada geniş spektrumlu koruma sağlamak amacıyla stratejik olarak değerlendirilmelidir.

Bu çalışmada geliştirilen hiperimmün serumlarla yürütülen serotipik analizler, *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatları arasında belirgin antijenik farklılıklar olduğunu ortaya koymuş, özellikle mikrokapsüllü suşların çapraz reaksiyon profillerinde öne çıktığı gösterilmiştir. *L. petauri* izolatlarının yüksek antijenik homojenliği, bu türün tür-spesifik bağışıklık yanıtı oluşturma potansiyelini vurgularken; mikrokapsüllü *L. garvieae* saha suşu ÖS-37'ye karşı elde edilen antiserumun hem homolog hem de heterolog suşlarla geniş çapraz aglütinasyon göstermesi, kapsül yapılarının immüno-dominant antijenik özellikler taşıdığını düşündürmektedir. Bu bulgular,mikro kapsül pozitif *L. garvieae* suşlarının, *L. petauri*'ye karşı da koruyucu bağışıklık tepkisi oluşturabileceğini göstermekte ve bu nedenle bu suşların kombine aşı formülasyonlarında yer almasının, türler arası geniş spektrumlu koruma sağlama açısından stratejik bir yaklaşım olabileceğini ortaya koymaktadır.

4.4.2.5 *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarının Tüm Hücre Protein Profilleri

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalığından izole edilen 40 adet *L. garvieae* ve 90 adet *L. petauri* saha suşu ile birlikte, referans tip suşlar *L. garvieae* ATCC 43921 ve *L. petauri* LMG 30040^T'nin tüm hücre protein profilleri SDS-PAGE yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, belirlenen tüm protein profilleri (bantları) Bionumerics 7.0 yazılımında (Applied Maths, Belgium) karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda, tüm suşlar %90 benzerlik düzeyine göre **iki ana filogenetik gruba** ayrılmıştır. Ayrıca, %100 benzerlik gösteren izolatlar temelinde toplam **12 farklı filogrup** tanımlanmıştır (Şekil 62). Bu gruplama, hem *L. garvieae* hem de *L. petauri* suşlarının protein düzeyinde belirgin benzerlikler taşıdığını, ancak tür içi alt gruplar bazında ayrışmaların mevcut olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, izolatların SDS-PAGE protein profilleri ile **izolasyon kaynakları (coğrafi bölge, işletme), balık türü, fenotipik özellikler veya kapsül formasyonu gibi karakteristikler arasında doğrudan bir korelasyon saptanmamıştır**. Bu durum, protein örüntüsüne dayalı ayrımın, bazı fenotipik veya ekolojik faktörlerden bağımsız olarak gelişebileceğini göstermektedir. Çalışmanın önemli bir çıktısı olarak, protein profilleri %100 benzerlik gösteren izolat grupları, genetik, antijenik ve serolojik analizlerde temsili suş seçimi için temel alınmıştır. Böylelikle, aşı geliştirme ve antiserum üretiminde moleküler düzeyde benzerliği yüksek suşların kullanılması sağlanarak, deney hayvanı sayısının azaltılması ve standardizasyonun sağlanması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada *L. garvieae* ve *L. petauri* saha suşlarının tüm hücre protein profillerinin SDS-PAGE yöntemiyle analiz edilmesi sonucunda, iki ana filogenetik grup ve bu gruplar içinde %100 benzerlik gösteren 12 alt filogrup tanımlanmıştır. Elde edilen protein örüntüleri, tür düzeyinde genel benzerlikleri ortaya koyarken, aynı zamanda tür içi çeşitliliğe işaret eden alt grupların varlığını da göstermiştir. Ancak bu gruplandırma ile izolasyon bölgesi, balık türü, fenotipik özellikler ya da kapsül formasyonu arasında anlamlı bir korelasyonun saptanamamış olması, tüm hücre protein profillerinin belirli çevresel ya da fenotipik faktörlerden bağımsız olabileceğini düşündürmektedir. %100 benzerlik gösteren izolatların tanımlanması, özellikle aşı geliştirme ve antiserum üretimi süreçlerinde moleküler düzeyde temsili suşların seçilmesine olanak sağlamış; böylece deney hayvanı sayısının azaltılması, çalışma maliyetlerinin düşürülmesi ve uygulama standardizasyonunun artırılması hedeflenmiştir. Bu yönüyle SDS-PAGE temelli protein profilleme yaklaşımı, izolatlar arası genetik yakınlığın belirlenmesinde ve aşı tasarımında rasyonel bir temel sunmaktadır.



Şekil 62. *L. garvieae* ve *L. petauri* saha suşlarının SDS-PAGE analizine dayalı tüm hücre protein profili dendrogramı. %90 benzerlik indeksine göre iki ana filogrup, %100 benzerliğe göre 12 alt grup belirlenmiştir.

4.4.2.6 *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarının Western Blot Analiziyle İmmünojenik Protein Profillerinin Karşılaştırılması

Bu çalışmada, farklı kapsül fenotiplerine sahip saha ve referans *L. garvieae* ile *L. petauri* suşlarının immünojenik protein profilleri, ATCC 43921T, LMG 30040T referans suşlarına ve ÖS-37 ile S-39 saha suşlarına karşı geliştirilmiş antiserumlar kullanılarak Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Amaç, türler arası ve izolatlar arası çapraz reaktiviteyi protein düzeyinde ortaya koymak ve potansiyel aşı antijenlerini belirlemektir (Şekil 63).

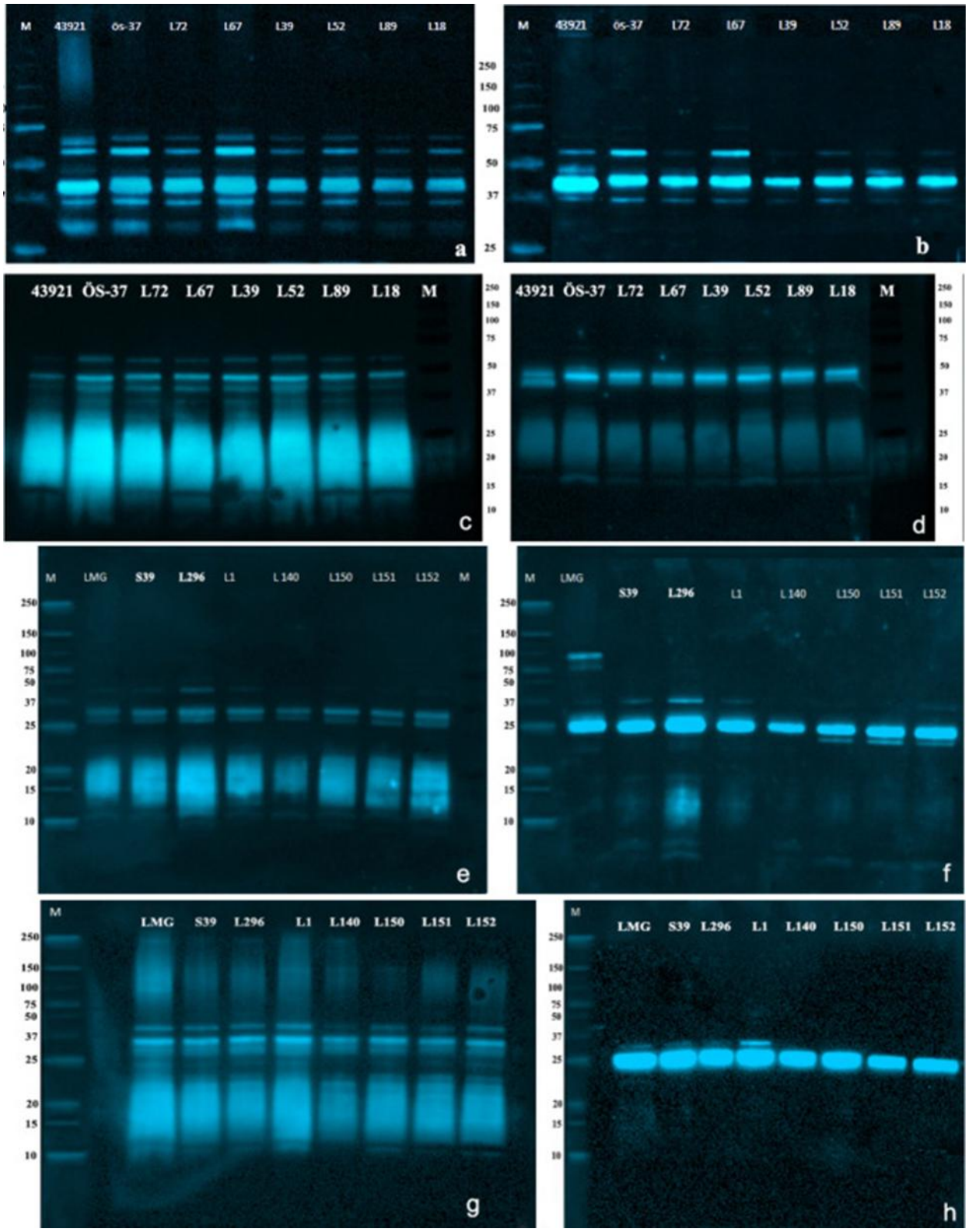
Sekiz farklı *L. garvieae* izolatı (ATCC 43921T, ÖS-37, L72, L67, L39, L52, L89, L18) bu dört farklı antiserumla blotlanmıştır. ATCC 43921T antiserumu ile yapılan analizlerde 25–37, 37–50 ve 50–75 kDa aralığında 2 bant içeren immünojenik protein profili tespit edilmiştir (Şekil 63a). Aynı izolatlar, LMG 30040T antiserumu ile blotlandığında 25–37 kDa bandı ve 50–75 kDa'daki çift banttan biri kaybolmuş, sadece 37–50 ve 50–75 kDa'da tek bant gözlenmiştir (Şekil 63b).

Mikrokapsüllü *L. garvieae* saha suşu ÖS-37 ve kapsülsüz *L. petauri* saha suşu S-39'a karşı geliştirilen antiserumlarla yapılan blot analizlerinde, referans antiserumlarla elde edilen profillere benzer bant desenleri gözlenmiştir (Şekil 63c–d). Ancak ÖS-37 izolatlarının S-39 antiserumu ile blotlanmasında yalnızca 50 kDa'da belirgin tek bir majör bant oluştuğu ve bunun LMG 30040T antiserumu ile elde edilen profilden ayrıştığı görülmüştür (Şekil 63c-d).

L. petauri izolatlarının, ATCC 43921T antiserumu ile blotlanması 25–37 ve 37–50 kDa aralığında ortalama üç zayıf bant oluşturmuştur (Şekil 63e). Buna karşın LMG 30040T antiserumu ile blotlanan *L. petauri* izolatları 20–25 kDa arasında değişen bantlar oluşturmuş, özellikle L150, L151 ve L152'de 25 kDa'nın altında düşük moleküler ağırlıklı bantlar gözlenmiştir (Şekil 63f).

S-39 ve ÖS-37'ye karşı geliştirilen antiserumlarla yapılan blotlarda, 25–37 ve 37–50 kDa bantlarının korunduğu ancak bant yoğunluğu ve dağılımında farklılıklar gözlendiği belirlenmiştir (Şekil 63g, h).

Bu bulgular, özellikle mikrokapsüllü *L. garvieae* izolatlarının hem homotipik hem de heterotipik reaksiyonlar verdiğini göstermekte ve bu suşların kombine aşı formülasyonlarında iki türe karşı çapraz koruma sağlayabilecek antijen kaynağı olarak değerlendirilmesini desteklemektedir (Şekil 63).



Şekil 63. *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatlarının farklı antiserumlarla yapılan Western blot analizlerine ait immunoreaktif protein profilleri.

(a) *L. garvieae* ATCC 43921T referans suşuna karşı geliştirilen antiserumla blotlanan *L. garvieae* izolatlarında 25–37, 37–50 ve 50–75 kDa aralığında birden fazla immunoreaktif bant tespit edilmiştir. **(b**) Aynı *L. garvieae* izolatlarının, *L. petauri* LMG 30040T referans suşuna karşı geliştirilen antiserumla blotlanması sonucunda 25–37 kDa bandının kaybolduğu, sadece 37–50 ve 50–75 kDa aralığında bantlar oluştuğu gözlenmiştir. **(c)** Mikrokapsüllü *L. garvieae* saha suşu ÖS-37'ye karşı elde edilen antiserumla blotlanan *L. garvieae* izolatlarında 50 kDa civarında tek bir baskın immunoreaktif bant dikkat çekmiştir. (**d**) Aynı izolatların, *L. petauri* saha suşu S-39'a karşı geliştirilen antiserumla blotlanması durumunda, sınırlı düzeyde immunreaktivite gözlenmiş ve bant sayısı azalmıştır. **(e)** *L. petauri* izolatlarının, *L. garvieae* ATCC 43921T antiserumu ile blotlanması sonucu 25–37 ve 37–50 kDa aralığında üç bant belirlenmiştir. **(f)** *L. petauri* LMG 30040T referans suşu antiserumu ile blotlanan *L. petauri* izolatlarında 20–25 kDa, 25–37 kDa ve 75–100 kDa aralıklarında değişen immunoreaktif bant desenleri gözlenmiştir. **(g)** *L. petauri* izolatlarının, ÖS-37 antiserumu ile blotlanması 25–37 ve 37–50 kDa aralıklarında bant oluşumu ile sonuçlanmıştır. **(h**) S-39 antiserumu ile blotlanan *L. petauri* izolatlarında benzer bant profilleri elde edilmiş, ancak 25 kDa'da daha yoğun bir immunoreaktif bant gözlenmiş; bazı izolatlarda bu bandın altındaki bölgede bant saptanmamıştır.

Bu analizler, antiserumların tür ve suş özgüllüğüne bağlı olarak farklı immün reaktivite profilleri oluşturduğunu ve mikrokapsül yapısının bazı antijenik bantların belirginliğinde etkili olabileceğini göstermektedir.

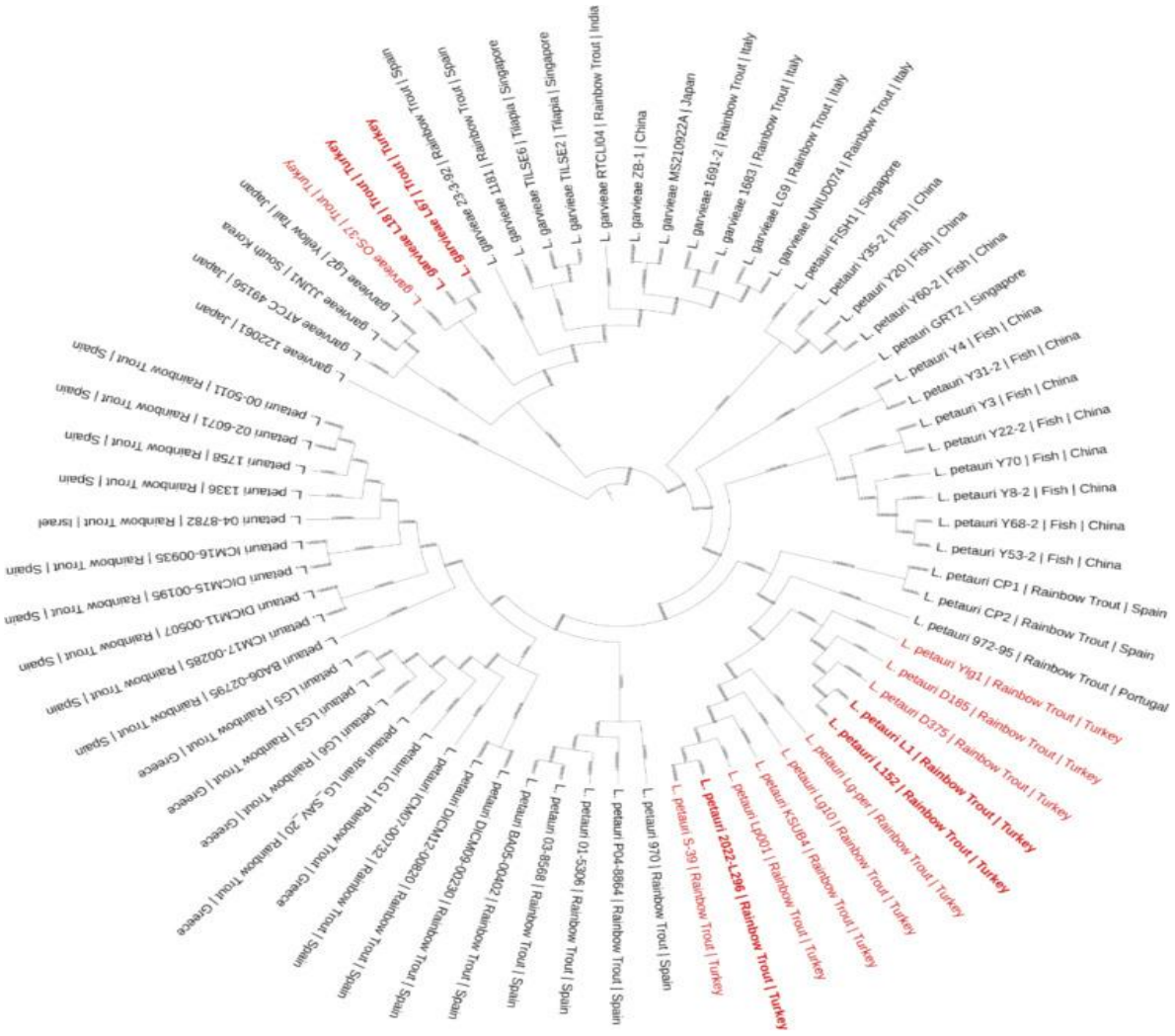
Bu çalışmada, *L. garvieae* (ATCC 43921T, ÖS-37) ve *L. petauri* (LMG 30040T, S-39) suşlarına karşı geliştirilen özgül antiserumlar kullanılarak gerçekleştirilen Western blot analizleri, her iki türde de tür ve suş düzeyinde farklı immunojenik protein profilleri ortaya koymuştur. Özellikle mikrokapsüllü *L. garvieae* saha suşu ÖS-37'ye karşı geliştirilen antiserumun hem homolog (*L. garvieae*) hem de heterolog (*L. petauri*) suşlarla geniş çapraz reaktivite göstermesi, kapsül yapılarının immüno-dominant ve korunmuş epitoplar içerebileceğini düşündürmektedir. *L. petauri* izolatlarının S-39 ve LMG 30040T antiserumlarıyla benzer protein profilleri sergilemesi ise bu türde antijenik homojenliğin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, kapsül varlığının immünojenik yanıt üzerinde belirleyici bir faktör olabileceğini ortaya koyarken, mikrokapsül pozitif *L. garvieae* suşlarının, geniş spektrumlu bağışıklık yanıtı oluşturma potansiyeli nedeniyle kombine aşı formülasyonlarında stratejik bir aday olarak değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmektedir.

4.4.2.7 Genom (Tüm Genom Sekans) ve Genom Biyoinformatik Analizi ile Aşı Suşlarının Belirlenmesi

Bu çalışmada, *L. garvieae* (L18, L67) ve *L. petauri* (L1, L152 ve 2022-L296) saha suşlarına ait genomlar sırasıyla **JBAJHE0000000000, JBAJHF0000000000, JBAJHV000000000,**

JBAJHG000000000, JBAJHH000000000 erişim numaraları ile NCBI GenBank veri tabanına yüklenmiştir. Suşlara ait genom büyüklükleri ortalama **1,9–2,1 Mb**, GC içerikleri ise **%38,1–%38,3** aralığında bulunmuştur. Genomik tanımlama sonuçları, L18 ve L67 izolatlarını *L. garvieae*, L1, L152 ve 2022-L296 izolatlarını ise *L. petauri* olarak doğrulamıştır.

Yapılan pan-genom analizinde, bu çalışmaya dahil edilen beş izolat ile birlikte toplam **68 genomda 799 tek kopya gen** tanımlanmıştır. Bu tek kopya genler kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç (Şekil 64), hem *L. garvieae* hem de *L. petauri* türlerinin genetik olarak ayrıştığını, ancak tür içi genetik çeşitliliğin belirgin olduğunu göstermiştir. Türkiye'den elde edilen izolatlar, filogenetik ağaç üzerinde **kırmızı renk** ile işaretlenmiştir (Şekil 64).



Şekil 64. Gökkuşağı alabalığından izole edilen *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarının Genom Tabanlı Filogenetik Analizi. Kırmızı ile işaretli suşlar Türkiye kökenlidir.

Ayrıca, her iki türe ait referans ve saha suşlarında **virülans genlerinin varlığı ve dağılımı, biyoinformatik analiz yöntemleri** kullanılarak incelenmiştir. Bu kapsamda, genom dizileri

çeşitli **virülans faktör veri tabanları (örneğin VFDB)** ile karşılaştırılmış ve özellikle **kapsül oluşumu, toksin üretimi, adezyon, demir alımı** ve konak-patojen etkileşiminde rol oynayan genlerin varlığı araştırılmıştır. Analizler sonucunda, klasik kapsül gen kümesinin yalnızca yüksek virülent *L. garvieae* suşu Lg2'de bulunduğu, çalışmaya dâhil edilen saha ve referans suşlarının hiçbirinde bu kümenin yer almadığı belirlenmiştir (Tablo 38). Bu bulgu, elektron mikroskobu ile saptanan kapsül benzeri yapıların genetik kapsül kümeleri ile doğrudan ilişkilendirilmediğini ve alternatif mekanizmaların etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 38. Bu çalışmadan elde edilen *L. garvieae* ve *L. petauri* suşları arasında karşılaştırılan virülans genlerine ilişkin bulgular.

İşlev	**Gen Ürünü**	**Giriş Numarası**	**Genomik koordinatlar**	***L. garvieae***			***L. petauri***		
				Lg2	**L18**	**L67**	**L1**	**L152**	**L2022-296**
Kapsül oluşumu	Kapsül gen kümesi	AP009333	448.918–462.969	+	–	–	–	–	–
Toksin	Hemolysin III ile ilişkili protein	AP009333	331.642–352.295	+	+	+	+	+	+
	Varsayılan kolajenaz	AP009333	1.699.976–1.701.265	+	+	+	+	+	+
	Putatif fibronektin bağlayıcı protein (Adhesin Pav)	AP009333	1.326.392–1.328.017	+	+	+	+	+	+
Adherens	LPxTG yüzey proteini	AP009333	845.365–848.502	+	+	+	+	+	+
	LPxTG yüzey proteini*	AP009333	1.392.494–1.395.289	+	–	–	+	+	+
	LPxTG yüzey proteini (kollajen adhezini)	AP009333	1.548.182–1.549.828	+	+	+	+	+	+
	LPxTG yüzey proteini	AP009333	1.646.872–1.648.641	+	TP	TP	+	+	+

İşlev	Gen Ürünü	Giriş Numarası	Genomik koordinatlar	*L. garvieae*			*L. petauri*		
				Lg2	L18	L67	L1	L152	L2022-296
	LPxTG yüzey proteini	AP009333	870.285–870.599	+	+	+	+	+	+
	Varsayılan internalin (LPxAG motifi)	AP009333	1.023.654–1.025.762	+	+	+	+	+	+
	Adhesin-SpaA	AP009333	191.130–194.939	+	+	+	+	+	+
	Sortase A	AP009333	1.305.315–1.306.046	+	+	+	+	+	+
	Putatif mukus adhesini (LPxTG motifi)	AFCC01000046	18.820–20.355	–	+	+	+	+	+
	LPxTG serin açısından zengin protein (varsayılan mukus adhezini)	AFCD01000036	49.647–51.407	–	–	–	+	+	+
	LPxTG yüzey proteini (orf5, mukus adhezini)	AFCC01000041	5326–8865	–	–	–	–	–	–
	LPxTG yüzey proteini (orf25, Cna B- alanı)	AFCC01000041	39.668–44.689	–	–	–	–	–	–
	WxL yüzey proteini	AFCD01000027	17.404–18.222	–	–	–	+	+	+
	Sortase A [b]	AFCC01000041	38.938–39.657	+	+	+	+	+	+
	Pili gen kümesi	AFCD01000058	28.828–35.485	–	+	+	+	+	+

İşlev	Gen Ürünü	Giriş Numarası	Genomik koordinatlar	*L. garvieae*			*L. petauri*		
				Lg2	L18	L67	L1	L152	L2022-296
	varsayılan pili yüzey antijeni	AFCD01000058	43.591–46.365	–	–	–	+	+	+
	varsayılan yüzey proteini (COG4713 alanı)	AFCC01000021	19.917–21.412	TP	TP	+	+	+	+
	varsayılan yüzey proteini (COG4713 alanı)	AFCC01000021	19.917–21.412	TP	TP	+	+	+	+
	Varsayılan ferrik demir ABC taşıyıcısı fepB, fepC, fepD	AP009333	1.594.232–1.596.948	+	+	+	+	+	+
Demir Alımı	Varsayılan demir taşıyıcısı (demir-hem siderofor benzeri) fecB, fecD, fecC, fecE	AP009333	544.393–548.003	+	+	+	+	+	+
	Varsayılan demirli demir taşıyıcı feoA, feoB	AP009333	106.587–109.166	+	+	+	+	+	+
	Fosfoglukomutaz	AP009333	1.558.243–1.559.955	+	+	+	+	+	+
Diğer virülans faktörleri	Enolaz	AP009333	1.489.407–1.490.708	+	+	+	+	+	+
	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	AP009333	1.928.003–1.929.013	+	+	+	+	+	+

İşlev	Gen Ürünü	Giriş Numarası	Genomik koordinatlar	*L. garvieae*			*L. petauri*		
				Lg2	L18	L67	L1	L152	L2022-296
	Süperoksidaz dismutaz	AP009333	289.210–289.818	+	+	+	+	+	+
	NADH oksidaz	AP009333	678.241–679.578	+	+	+	+	+	+

"+" işareti genin bulunduğunu**, "–"** işareti genin bulunmadığını**, "TP"** ise genin genomda kesintili (truncated) bulunduğunu ifade eder.

Buna karşın, her iki türe ait izolatlarda **hemolizin III, kolajenaz, fibronektin bağlayıcı proteinler, çeşitli LPxTG motifli yüzey proteinleri, pili gen kümeleri, sortaz enzimleri** ve **demir alım sistemleri (fep, fec, feo)** gibi çok sayıda önemli virülans faktörüne ait genlerin korunduğu tespit edilmiştir. Özellikle *L. petauri* izolatlarında, *L. garvieae*'ye kıyasla daha fazla sayıda LPxTG motifli yüzey proteinleri, mukus adhezinleri ve pili gen kümelerinin eksiksiz biçimde yer alması, bu türün **yüzey tutunma ve konağa kolonizasyon kapasitesinin daha yüksek** olabileceğini göstermektedir. Bazı *L. garvieae* suşlarında ise bu genlerin eksik ya da kesintili (TP – truncated protein) halde bulunması, suşlar arası virülans düzeylerinde farklılığa neden olabilecek genetik varyasyonlara işaret etmektedir.

Bu çalışmada, *L. garvieae* ve *L. petauri* saha suşlarına ait genomların biyoinformatik yöntemlerle analizi, her iki türün hem tür-içi hem türler arası genetik farklılıklarını ve potansiyel virülans kapasitesini ortaya koymuştur. Türkiye'den izole edilen suşların tamamı, referans verilerle karşılaştırmalı olarak tanımlanmış ve filogenetik analizler sonucunda her iki türün açık biçimde ayrıştığı, ancak suş düzeyinde çeşitlilik barındırdığı saptanmıştır. Genom büyüklüğü, GC içeriği ve kodlanan gen profilleri türler arasında genel olarak benzerlik gösterse de, özellikle virülans faktörlerinin dağılımı açısından belirgin farklılıklar tespit edilmiştir.

Kapsül gen kümesinin, yalnızca yüksek virülent *L. garvieae* suşu Lg2'de bulunması ve çalışmada analiz edilen saha suşlarının hiçbirinde saptanmaması, bu özelliğin suş özgüllüğü taşıyan bir virülans belirteci olduğunu göstermektedir. Buna karşın, her iki türde hemolizin III, LPxTG motifli yüzey proteinleri, adhesinler, sortazlar ve demir alım sistemleri gibi konak-patojen etkileşimine katkı sağlayan çok sayıda virülans geninin korunmuş olduğu görülmüştür. Özellikle *L. petauri* izolatlarında, *L. garvieae*'ye kıyasla daha fazla sayıda pili gen kümesi, mukus adhezinleri ve yüzey proteinlerinin eksiksiz olarak bulunması, bu türün konağa tutunma, kolonizasyon ve enfeksiyon oluşturma potansiyelinin daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bazı genlerin kesintili (truncated) halde bulunması, suşlar arasında ifade farklılıkları olabileceğine işaret etmektedir.

Bu genomik bulgular, biyoinformatik analizlerin fenotipik gözlemlerle uyumlu olduğunu ortaya koymakta; hem filogenetik düzeyde sınıflandırma doğruluğunu artırmakta hem de türler arası virülans farklarının moleküler temelini aydınlatmaktadır. Sonuçlar, suşların aşı geliştirme ve epidemiyolojik izleme çalışmalarında hedeflenmesine olanak sağlayacak genetik belirteçleri tanımlamak açısından da kritik öneme sahiptir. Ayrıca, bu çalışma Türkiye'deki *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatlarına ait ilk kapsamlı genomik karakterizasyonlardan biri olması bakımından iteratüre özgün ve değerli bir katkı sunmaktadır.

4.4.2.8 Gökkuşağı Alabalıklarında *L. garvieae* ve *L. petauri* Suşlarının İn Vivo Virülens Testleri ve Eprüvasyon Suşlarının Seçim Kriterleri

Gökkuşağı alabalıklarında yaygın bakteriyel enfeksiyonlara neden olan *L. garvieae* ve *L. petauri* suşlarına karşı geliştirilecek inaktif enjeksiyon aşılarında kullanılacak eprüvasyon (çalışma tohumu) suşlarının belirlenmesi amacıyla, kapsamlı bir fenotipik (FVÖ, kapsül formasyonu, SDS PAGE, Westernblot), serolojik (mikroaglütinasyon) ve moleküler odaklı (tüm genom ve genom biyoinformatik) bütüncül bir değerlendirme yapılmıştır. Bu doğrultuda, her iki bakteri türü için üçer saha izolatı aşağıdaki kriterlere göre seçilmiştir:

- Fenotipik virülens özellikleri (FVÖ): Hemoliz, jelatinaz, proteaz vb. enzim aktiviteleri
- Aglütinasyon testleri: Serotipik farklılıkların serolojik olarak gösterilmesi
- SDS-PAGE protein profili: Suşlara özgü protein desenlerinin karşılaştırılması
- Western blot analizleri: İmmünodominant proteinlerin varlığı ve çapraz reaktivite
- Tam genom sekans (WGS) analizi: Virülens genleri, mobil genetik elementler, klonal yapı

Bu değerlendirmeler sonucunda *L. garvieae* için Lg18, Lg67, Lg89; *L. petauri* için ise L1, L152 ve L2022-296 izolatları seçilerek in vivo virülens deneylerine dâhil edilmiştir.

Her bir izolat, yaklaşık 1×10^7 cfu/balık dozunda, 0,1 mL hacminde, fenoksietanol (0,32 mL/L) ile anestezi uygulanmış iki tekrarlı olarak gökkuşağı alabalıklarına (n=27) intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. Tüm deney grupları 21 gün boyunca izlenmiş; mortalite verileri günlük olarak kaydedilmiştir. Mortalite verileri Tablo 39 (*L. garvieae*) ve Tablo 40 (*L. petauri*)'te detaylı olarak sunulmuştur.

Tablo 39. *L. garvieae* İzolatları Gökkuşağı Alabalığı Virulens Deneyleri

Gün			Testte kullanılan izolatların cfu/ml sayıları ve mortalite değerleri

	Balık ağırlığı (gr)	Toplam Balık sayısı (90)	Lg18 10^7 cfu/balık	Mortalite	Lg67 10^7 cfu/ml	Mortalite	Lg89 10^7 cfu/ml	Mortalite
0	15,17± 0,7	81	27	-	27	-	27	-
1		81	27	-	27	-	27	-
2		79	27	2	27	-	27	-
3		78	27	-	26	1	27	-
4		78	27	-	26	-	27	-
5		75	24	2	26	-	27	-
6		72	23	1	24	2	27	-
7		67	22	1	20	4	27	-
8		67	22	-	20	-	27	-
9		66	22	-	19	1	27	-
10		65	22	-	18	1	27	-
11		64	22	1	17	1	27	-
12		57	22	3	14	3	27	-
13		44	22	7	8	6	27	-
14		44	22	-	8	-	27	-
15		44	22	-	8	-	27	-
16		44	22	-	8	-	27	-
17		44	22	-	8	-	27	-
18		44	22	-	8	-	27	-
19		44	22	-	8	-	27	-
20		44	22	-	8	-	27	-
21		44	22	-	8	-	27	-
Toplam Mortalite			18 (%66,66)		19 (%70,37)		0	
Genel Değerlendirme			Deneylerde her gruptan 3'er balık alınarak patojen etken yönünden incelenmiştir. Deneyler iki tekrar olarak yapılmış, balıklarda günlük oluşan mortalitelerin ortalaması alınmıştır.					

Tablo 40. *L. petauri* İzolatları Gökkuşağı Alabalığı Virulens Deneyleri

Gün	Balık ağırlığı (gr)	Toplam Balık sayısı (90)	Testte kullanılan izolatların cfu/ml sayıları ve mortalite değerleri					
			L-1 10^7 cfu/ml	Mortalite	L2022-296 10^7 cfu/ml	Mortalite	L-152 10^7 cfu/ml	Mortalite
0	15,17± 0,7	81	27	-	27	-	27	-
1		80	27	-	27	-	27	-
2		80	27	-	27	-	27	-
3		79	27	-	27		27	-
4		78	27	-	27		27	-
5		74	27	-	25	2	25	2
6		74	27	-	25		25	-
7		73	27	-	24	1	25	-
8		72	27	-	23	1	25	-
9		70	27	-	22	1	24	1
10		69	27	-	21	1	24	-
11		64	27	-	19	2	21	3
12		63	27	-	18	1	21	-
13		53	27	-	13	5	16	5
14		53	27	-	13	-	16	-
15		53	27	-	13	-	16	-
16		53	27	-	13	-	16	-
17		53	27	-	13	-	16	-
18		53	27	-	13	-	16	-
19		53	27	-	13	-	16	-
20		53	27	-	13	-	16	-
21		53		-	13	-	16	-
Toplam mortalite			0		17 (%62,96)		11 (%40,74)	
Genel Değerlendirme			Deneylerde her gruptan 3'er balık alınarak patojen etken yönünden incelenmiştir. Deneyler iki tekrar olarak yapılmış, balıklarda günlük oluşan mortalitelerin ortalaması alınmıştır.					

Tablo 39 ve Tablo 40'daki sonuçlar incelendiğinde;

- *L. garvieae* için:

- L18 → %66,66 mortalite
- L67 → %70,37 mortalite
- L89 → %0 mortalite

- *L. petauri* için:
  - L2022-296 → %62,96 mortalite
  - L152 → %40,74 mortalite
  - L1 → %0 mortalite

Elde edildiği görülmüştür. Deneysel enfeksiyonlarda gökkuşağı alabalıklarında klasik klinik semptomlar gözlenmiş olup:

- *L. garvieae* enfeksiyonlarında egzoftalmus, hiperpigmentasyon, karın bölgesinde asites tipiktir (Şekil 65),
- *L. petauri* enfeksiyonlarında ise benzer olarak, iç organlarda hiperemi, splenomegali ve abdominal sıvı birikimi gibi sistemik belirtiler görülmüştür (Şekil 66).



Şekil 65. Gökkuşağı alabalıklarında *L. garvieae* ile yapılan eprüvasyonda deride hiperpigmentasyon ve gözlerde egzoftalmus görüntüsü.



Şekil 66. Gökkuşağı alabalıklarında *L. petauri* ile deneysel enfeksiyon sonucunda deride hiperpigmentasyon ve gözlerde egzoftalmus (resim A ve B) görüntüsü

Deney periyodunda mortalite görülen balıklardan TSA ve BHIA besiyerine yapılan ekimler sonucu, patojenlerin tekrar izolasyonu sağlanarak Koch postülatları doğrulanmıştır.

Tüm bu değerlendirmeler ışığında, *L. garvieae* LG67 suşu ile *L. petauri* L2022–296 suşu; aşı formülasyonunda kullanılan ana tohum suşlarından genetik, serolojik ve antijenik açıdan farklılık göstermeleri, saha koşullarında gözlenen akut enfeksiyon tablolarını temsil etmeleri ve in vivo enfeksiyon modelinde yüksek mortalite ve karakteristik patogenez oluşturmaları nedeniyle, geliştirilen aşının heterolog koruyuculuk kapasitesini değerlendirmek amacıyla **çalışma tohum (eprüvasyon) suşları olarak belirlenmiştir.**

4.4.3 *V. anguillarum* Aşı Suşlarının Seçimine Yönelik Çalışmalar *(L. garvieae ve L. petauri* İzolatlarının Fenotipik (Virulens), Serotipik (Hiperimmun Serum Eldesi, Aglütinasyon Testleri) Peoteomik (SDS PAGE, Westernblot) ve Genomik Özellikleri (Tüm Genom Sekans, Genom Biyoinformatik Analizi)

4.4.3.1 *Vibrio angullarum* Suşlarının Fenotipik Virülens Özelliklerine (FVÖ) Göre Değerlendirilmesi ve Aşı Suşu Adaylarının Belirlenmesi

Bu çalışmada, farklı coğrafi bölgelerden izole edilen ***V. anguillarum*** saha suşlarının **fenotipik virülens özellikleri (FVÖ)** değerlendirilmiş; bu değerlendirme doğrultusunda **prototip aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmak üzere aday suşlar** belirlenmiştir. Virülens karakterizasyonu amacıyla toplam beş adet fenotipik (hemolizin, kazeinaz, jelatinaz, DNAse ve lipaz) test uygulanmıştır. Bu testler, patojenin konağa giriş, doku invazyonu, sistemik yayılım ve hücre yıkımı gibi virülens mekanizmalarını fenotipik düzeyde ortaya koymak amacıyla seçilmiştir. Tablo 41'de tüm *V. anguillarum* saha izolatlarının FVÖ testlerine ait sonuçları sunulmuştur. Toplam 23 saha izolatı, beş testin en az dördünde pozitif sonuç göstermiştir (Tablo 41). Bu izolatlar, **prototip aşı geliştirme çalışmaları için ön seçilen suşlar** olarak belirlenmiştir.

Tablo 41. *V. anguillarum* izolatlarının FVÖ özellikleri

V. anguillarum izolat kodu	İzolasyon Yılı	Bölge (İl)	Hemolizin	Kazinaz	Jelatinaz	DNAse	Lipaz
V12	2016	Muğla	β	+	+	+	-
V15	2017	Muğla	β	+	+	+	+
V18	2016	Tunceli	β	+	+	+	+
V21	2017	Elazığ	β	+	+	+	+
V25	2017	Muğla	β	+	+	+	-

V28	2017	Muğla	β	+	+	+	-
V76	2013	Muğla	β	+	+	+	-
V80	2013	Muğla	β	+	+	+	-
V82	2013	Muğla	β	+	+	+	-
V85	2011	Rize	β	+	+	+	-
V88	2014	Muğla	β	+	+	+	-
V91	2014	Muğla	β	+	+	+	-
V92	2014	Muğla	β	+	+	+	-
V95	2013	Muğla	β	+	+	+	-
V96	2013	Muğla	β	+	+	+	-
V98	2015	Çanakkale	β	+	+	+	-
V99	2015	Muğla	β	+	+	+	-
V100	2015	Muğla	β	+	+	+	-
V102	2015	Çanakkale	β	+	+	+	-
V2022-104	2022	Kayseri	β	+	+	+	+
V2022-124	2022	Kayseri	γ (-)	+	+	+	-
V2022152	2022	Kayseri	γ (-)	+	+	+	+

21 izolat **beta hemoliz proteinaz (kazeinaz), jelatinaz ve DNAse** testlerinde de pozitiflik göstermiştir.

- Bu 23 izolatın yalnızca 5'inde **lipaz pozitifliği** tespit edilmiştir (V15, V18, V85, V2022-124, V2022-152).

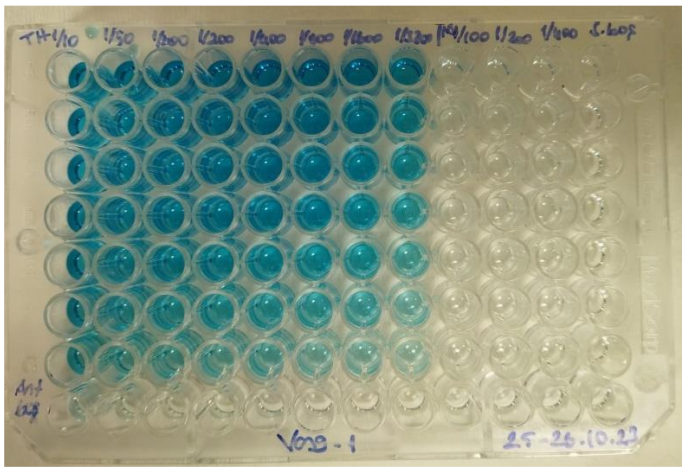
Fenotipik olarak dört veya daha fazla testte pozitiflik gösteren 21 saha suşu, **virülens potansiyeline sahip izolatlar** olarak tanımlanmıştır (Tablo 41). Bu izolatlar, prototip aşı üretimi ve etkinlik değerlendirme çalışmalarında kullanılmak üzere aday suşlar olarak belirlenmiştir. Fenotipik virülens özellikleri, *V. anguillarum*'un konakta oluşturduğu enfeksiyon şiddetini doğrudan etkileyen faktörlerdir. Bu testlerin bir arada değerlendirilmesi, yalnızca patogenez mekanizmasını anlamaya katkı sunmakla kalmamış, aynı zamanda **etkili ve güvenilir aşı suşlarının seçimine** bilimsel temel oluşturmuştur. Özellikle beta hemoliz, DNAse ve lipaz aktivitesi, geçmiş çalışmalarda da (Larsen, 1983; Rock & Nelson, 2006) **yüksek virülensle ilişkili belirteçler** olarak tanımlanmıştır.

Sonuç olarak, **fenotipik virülens profili güçlü 21 saha izolatı**, yerli prototip aşı geliştirme sürecinde kullanılacak adaylar olarak belirlenmiş; bu suşlardan lipaz aktivitesi gösteren izolatların gökkuşağı alabalıklarında vibrozisin deneysel enfeksiyon modellerinde kullanılması beninsenmiştir (Larsen, 1983; Rock & Nelson, 2006).

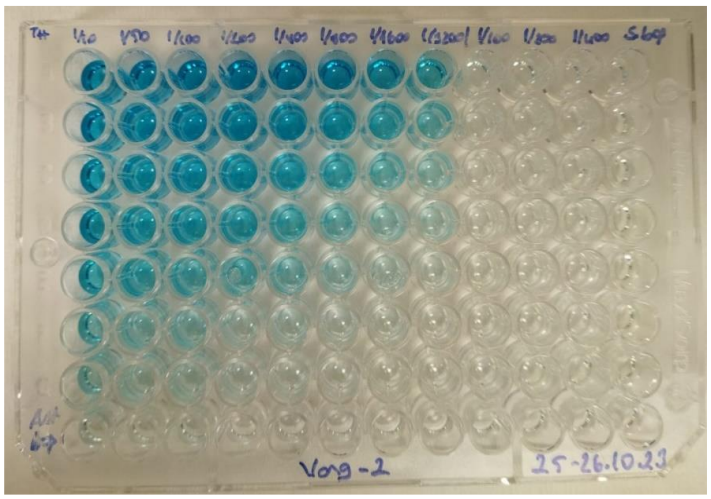
4.4.3.2 *V. anguillarum* İzolatlarının Serotipik (Hiperimmun Serum Eldesi)

Bu çalışmada, NCIMB 2131 **(Serotip O1),** ATCC 14181**(Serotip O2a)** ve NCIMB6^{T} **(Serotip O2b) şuşlarına** karşı tavşanlarda geliştirilen hiperimmün serumlar, izolat düzeyinde serotip ayrımı ve çapraz reaksiyon analizleri amacıyla değerlendirilmiştir. Hiperimmün serumların antikor titreleri, indirekt ELISA yöntemi ile ölçülmüş olup, tüm antijen ve serum kontrol kuyularında nonspesifik bağlanma tespit edilmemiştir.

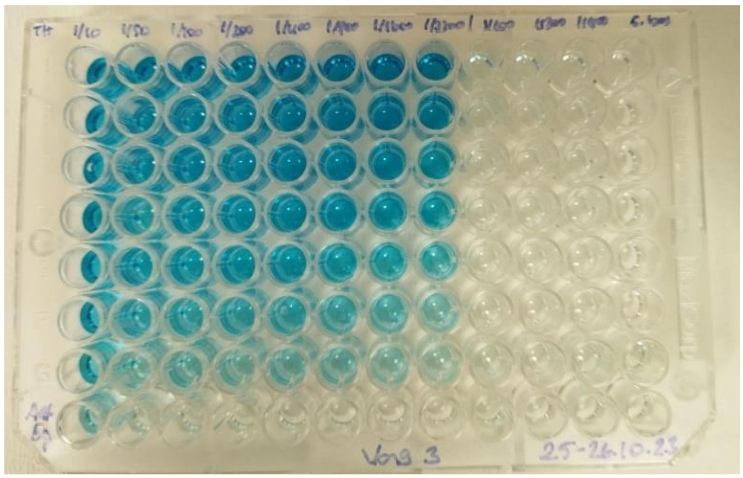
ELISA analizinde; *V. anguilarum* referans suşlarının [**NCIMB 2131 (Serotip O1), ATCC 14181(Serotip O2a) ve NCIMB6^{T}(Serotip O2b)]** en uygun serum dilusyon oranları 1/100 olarak belirlenmiştir. Bu dilüsyonlar Western blot analizlerinde de başarılı sonuçlar vermiştir. ELİSA analizlerine yönelik plak görüntüleri Şekil 67-69'da verilmiştir.



Şekil 67. ELISA analizi ile *V. anguillarum* serotip O1 antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü.



Şekil 68. ELISA analizi ile *V. anguillarum* serotip O2a antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plakı görüntüsü.



Şekil 69. ELISA analizi ile *V. anguillarum* serotip O2b antiserumun en uygun serum dilusyon oranının belirlenmesine ilişkin ELİSA plak görüntüsü

4.4.3.3 *V. anguillarum* İzolatlarının Serolojik ve Serotipik Özellikleri

Bu çalışmada, *V. anguilarum* referans suşlarının [**NCIMB 2131 (Serotip O1), ATCC 14181(Serotip O2a) ve NCIMB6^{T}(Serotip O2b)]** antiserumları kullanılarak aglütinasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen antiserumlar, hazırlanan 23 *V. anguillarum* O antijenleri (23 izolatın her biri için ayrı ayrı) ile reaksiyona sokuldu. Elde edilen serolojik yanıt profilleri değerlendirilerek, izolatların her birinin çapraz reaktivite düzeyi ortaya konuldu. Bu aglütinasyon testlerine ait bulgular Tablo 42 ve 43'de özetlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, ülkemizde gökkuşağı alabalıklarında görülen vibriozis salgınlarından *V. anguillarum* serotip O1'in sorumlu olduğunu ortaya koymuştur.

Tablo 42. *V. anguillarum* O antijen ve antiserumların lam aglütinasyon sonuçları

O1 Antijen	*V. anguillarum* O (1, 2a, 2b) antiserumların lam aglütinasyon reaksiyonları			
	İzolat Sayısı	O1Antiserum	O2a Antiserum	O2b Antiserum
Serotip O1 (NCTC 2131 ve saha izolatları)	22	+	-	-
Serotip O2a (NCIMB 6^{T})	1	-	+	-
Serotip O2b NCIMB 2130)	1	-	-	+
V-12 Saha susu	1	-	-	-

Tablo 43. *V. anguillarum* O antijen ve antiserumların mikroplak aglütinasyon sonuçları

O1 Antijen	*V. anguillarum* O (1, 2a, 2b) antiserumların mikroaglütinasyon titreleri			
	İzolat sayısı	O1 antiserum	O2a antiserum	O2b antiserum
O1 (NCIMB2131 ve 23 saha suşu)	22	40-640	<10	<10
O2a (NCIMB 6^T)	1	<10	320	<10
O2b (NCIMB 2130)	1	<10	<20	640
V-12 Saha susu (*V. anguillarum)*	1	<10	<10	<10

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda bu çalışmada kullanılan 23 *V. anguillarum* izolatından 22'sinin serotip O1 grubunda yer aldığı, V-12 numaralı *V. anguillarum* izolatının ise O1, O2a, O2b antiserumlarla reaksiyona girmediği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, referans suşlara ait antiserumlarla gerçekleştirilen lam ve mikroplak aglütinasyon testleri aracılığıyla *V. anguillarum* izolatlarının serotipik yapıları belirlenmiştir (Tablo 42 ve 43). Serotip O1 (NCIMB 2131), O2a (ATCC 14181) ve O2b (NCIMB 6T) antiserumları kullanılarak yapılan bu analizlerde, saha izolatlarının büyük çoğunluğunun serotip O1 ile güçlü reaksiyon verdiği, yalnızca V-12 izolatının hiçbir referans antiserumla reaksiyona girmediği tespit edilmiştir. **Serotipik sınıflandırma** kapsamında şu sonuçlara ulaşılmıştır:

- 23 saha izolatının 22'si, yalnızca **O1 serotipine ait antiserum (NCIMB 2131)** ile pozitif reaksiyon göstermiştir.
- O2a (ATCC 14181) ve O2b (NCIMB 6T) antiserumları ile hiçbir saha izolatında aglütinasyon oluşmamıştır.
- Mikroplak aglütinasyon testlerinde O1 serotipi ile reaksiyon veren saha izolatlarında antikor titreleri 40 ila 640 arasında değişmiştir.
- **V-12 saha suşu**, üç referans antiserumla da aglütinasyon göstermemiştir; bu durum, atipik bir O-antijen yapısına sahip olabileceğini göstermektedir.

Bu veriler, ülkemizdeki *V. anguillarum* enfeksiyonlarının **epidemiyolojik olarak baskın serotipinin O1 olduğunu** açık biçimde ortaya koymuş, O1'e özgü aşı geliştirme gerekliliğini bilimsel olarak doğrulamıştır (Tablo 42 ve 43).

4.4.3.4 *V. anguillarum* Suşlarının Tüm Hücre Protein Profilleri

Proje çalışmaları kapsamında izole edilmiş olan 23 *V. anguillarum* izolatı ve 3 standart suşun [Serotip O1 (NCIMB231) Serotip O2a (NCIMB6) ve Serotip O2b (NCIMB 2130)] SDS PAGE analizi ile tüm hücre protein profilleri belirlenmiştir. Belirlenen tüm protein profilleri (bantları) Bionumerics 7.0 yazılımında (Applied Maths, Belgium) karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda, analize tabi tutulan tüm *V. anguillarum* izolatlarının protein profillerini gösteren izolatların benzelik ilişkilerini gösteren dendogram Şekil 70'de verilmiştir.

Şekil 70' de verilen verilen dendogram görüntüleri incelendiğinde;

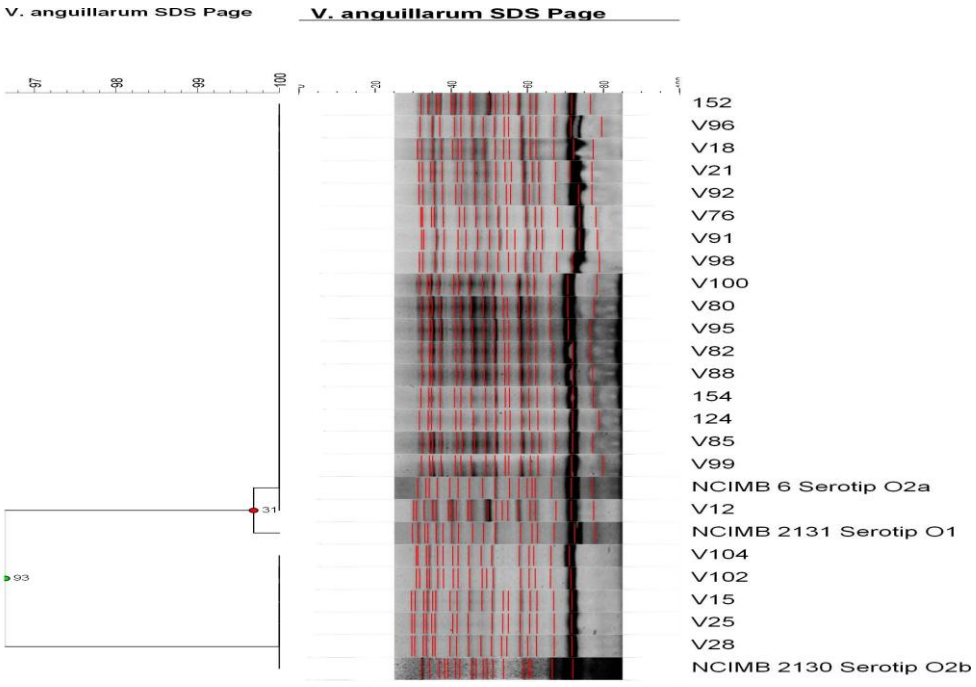
a. Standart (Serotip O1, O2a ve O2b) suşlar ve saha suşları arasındaki protein profili benzerliklerinin %96.6 ile %100 arasında olduğu, saha suşlarının %73.91 i ile Serotip O1 ve Serotip O2a' nın ise %99-%100 benzerlik gösterdiği
b. Serotip O1 suşu ile Serotip O2a'nın standat suşları arasındaki protein profil benzerlikleri %99-%100 olurken, bu iki serotipin (Serotip O1 ve Serotip O2a) Serotip O2b standat suşları ile protein profili benzerliğinin %97-%100'nın arasında olduğu,
c. Tüm *V. anguillarum* suşlarında yaklaşık 95, 77, 47, 35, 26 ve 14, kDA'lık bantların ortak majör bant olduğu,
d. *V. anguillarum* suşlarının genel olarak 14 ile 110 kDA arasında bantlar verdiği ve bantların toplam sayısının suşlar arasında farklılık gösterdiği ve bant sayısının 16 ile 19 arasında değiştiği,
e. *V. anguillarum* suşları protein profil benzerliklerine (% 97 benzerlik) göre oluşturulan dendogramda (Şekil 70) 3 gruba ayrıldığı tespit edilmiştir.

V. anguillarum izolatlarının SDS PAGE analizinde protein profil benzerlik ilişkileri ve bant sayılarına göre gruplandırılmasına ilişkin göre gruplandırılmasına Tablo 44'de verilmiştir.

Tablo 44. SDS PAGE analizinde protein profil benzerlik ilişkileri ve bant sayılarına göre *V. anguillarum* izolatlarının gruplandırılması

İzolate Numarası	WCPT	izolat Numarası	WCPT
V18	1	V100	1
V21	1	V124	1
V76	1	V104	1
V80	1	V152	1
V82	1	V12	2
V85	1	NCIMB 6^T O2a	2
V88	1	NCIMB 2131 O1	2
V91	1	V15	3
V92	1	V25	3
V95	1	V28	3
V96	1	V102	3
V98	1	V104	3
V99	1	NCIMB 2130 O2b	3

WCPT: Tüm hücre protein tipi



Şekil 70. *Y. ruckeri* İzolatlarının Tüm Hücre Proteinlerinin UPGMA Kümeleme Analizi Dendrogramı

Bu çalışma kapsamında Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen 23 *V. anguillarum* saha suşu ile birlikte 3 referans suşun [NCIMB 2131 (Serotip O1), NCIMB 6T (Serotip O2a), NCIMB 2130 (Serotip O2b)] **tüm hücre protein profilleri**, SDS-PAGE analiziyle karakterize edilmiş ve Bionumerics 7.0 yazılımı kullanılarak karşılaştırmalı analizleri yapılmıştır. Elde edilen bulgular, suşlar arası antijenik benzerlik düzeylerinin belirlenmesi ve potansiyel aşı suşu seçimi açısından önemli bilgiler sunmuştur.

Analiz edilen saha ve referans suşları arasında protein profili benzerliğinin genel olarak **%96,6 ile %100** arasında olduğu belirlenmiştir. Özellikle saha suşlarının **%73,91'inin**, O1 ve O2a referans suşları ile **%99–100 oranında benzerlik** göstermesi, sahada dolaşan izolatların protein düzeyinde oldukça homojen olduğunu ortaya koymuştur. Bu yüksek benzerlik oranları, antijenik olarak korunmuş proteinlerin pek çok saha izolatında ortak olduğunu, dolayısıyla bu izolatların bağışıklık sistemince benzer şekilde tanınabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, **temsil kabiliyeti yüksek bir veya birkaç saha izolatının, diğer klinik varyantlara karşı da koruyucu bağışıklık tepkisi oluşturma potansiyelini** göstermektedir. Referans suşlar arasında yapılan karşılaştırmalarda, Serotip O1 ve O2a suşları arasında %99–100 oranında, O1 ve O2b suşları arasında ise %97–100 oranında protein profili benzerliği gözlenmiştir. Bu bulgu, farklı serotiplerin belirli yapısal proteinlerde antijenik ortaklık taşıyabileceğini ve bazı epitopların serotipler arasında korunmuş olabileceğini göstermektedir.

Ancak bu durum, serotipler arası çapraz koruma sağlayabilecek bir **ortak antijen havuzu** varlığına işaret etse de, saha izolatlarının baskın olarak O1 serotipine ait olduğu göz önüne alındığında, aşı geliştirme sürecinde O1'e özgü protein profillerinin hedef alınmasının daha stratejik olduğu değerlendirilmiştir. Tüm *V. anguillarum* izolatlarında ortak olarak tanımlanan majör bantlar yaklaşık olarak **95, 77, 47, 35, 26 ve 14 kDa** moleküler ağırlıklara sahiptir. Bu bantlar, suşlar arasında en çok korunan ve dolayısıyla **aşı geliştirme açısından immüno-dominant potansiyel taşıyan proteinleri** temsil etmektedir. Ayrıca, analizlerde tüm izolatlarda **14–110 kDa** aralığında proteinler saptanmış, toplam bant sayısının ise suşlara göre **16 ile 19 arasında değiştiği** belirlenmiştir. Bu bant yoğunluk ve çeşitliliği, saha suşları arasında antijenik çeşitliliğin düşük ama mevcut olduğunu, dolayısıyla seçilecek aşı suşunun hem majör ortak proteinleri hem de az sayıda değişken bölgeyi temsil etmesi gerektiğini göstermektedir.

Protein profili benzerlik oranlarına göre oluşturulan dendrogram analizinde (Şekil 70), tüm *V. anguillarum* izolatları **%97 benzerlik düzeyine göre üç ayrı gruba** ayrılmıştır. Bu durum, sahada dolaşan izolatların protein bazlı gruplandırılabileceğini, ancak bu grupların genetik ya da serotipik düzeyde birbirine oldukça yakın olduğunu ortaya koymuştur. Bu gruplama, ileride geliştirilecek **çoklu suş (multivalent) veya tek suş temelli ancak çapraz reaktif inaktif**

aşılar için hedef protein kümelerinin seçiminde referans olabilecek düzeyde biyoinformatik katkı sunmaktadır.

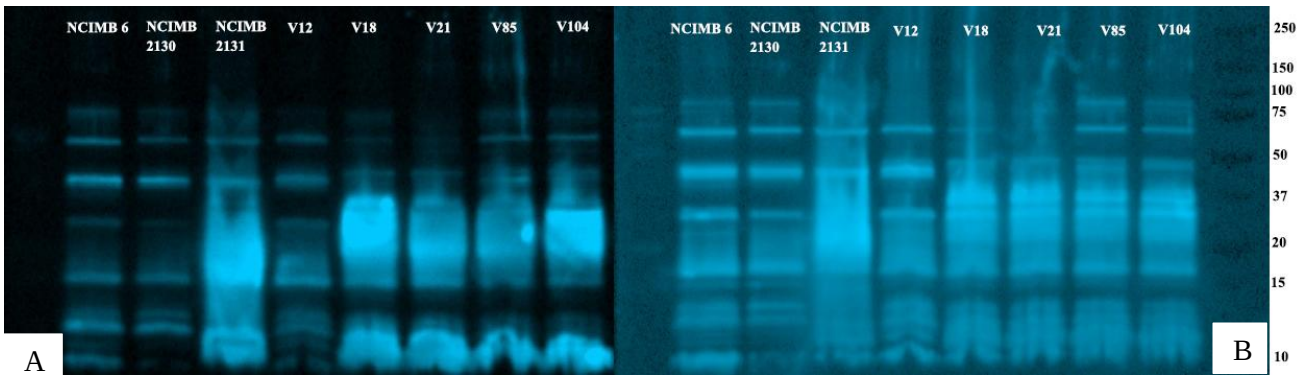
Bu bulgular, Türkiye'de tatlısu ve denizel gökkuşağı alabalığı üretim sistemlerinde yaygın olan *V. anguillarum* izolatlarının protein profillerinin yüksek düzeyde örtüştüğünü, özellikle O1 serotipine ait saha suşlarının ortak antijenik yapı taşıdığını göstermiştir. Bu kapsamda, **O1 serotipine ait, yüksek protein benzerliği gösteren saha suşlarının**, geniş saha temsiliyetine sahip **aşı suşu adayları** olarak değerlendirilmesi, hem immünolojik etkinlik hem de moleküler temsiliyet açısından rasyonel bir yaklaşımdır.

4.4.3.5 *V. anguillarum* Suşlarının Western Blot Analiziyle İmmünojenik Protein Profillerinin Karşılaştırılması

Bu çalışma kapsamında, farklı serotipleri temsil eden referans suşlara ait antiserumlar kullanılarak (*NCIMB 2131 – Serotip O1*, *NCIMB 2130 – Serotip O2b*, *NCIMB 6T – Serotip O2a*), saha kökenli *V. anguillarum* izolatlarının immünojenik protein profilleri Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Serotipik, serolojik ve fenotipik analizler sonucu temsil gücü yüksek olduğu değerlendirilen beş saha suşu (**V-12, V-18, V-21, V-85 ve V2022-104**) ile üç referans suşun karşılaştırmalı protein profilleri değerlendirilmiştir.

1. Serotip O1 Antiserumu (NCIMB 2131) ile Western Blot Bulguları

V. anguillarum serotip O1 suşuna ait **NCIMB 2131 antiserumu** kullanılarak yapılan Western blot analizlerinde, saha suşlarının çoğunda **10–90 kDa** aralığında immünojenik protein spotları tespit edilmiştir (Şekil 71 A-B).



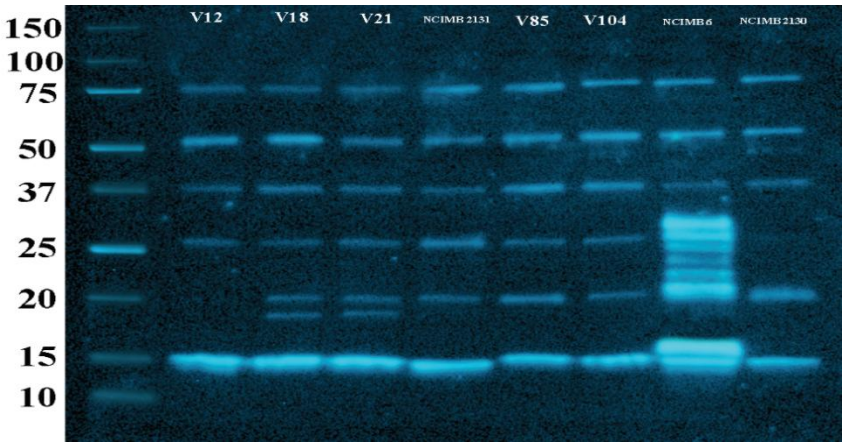
Şekil 71. A, B: *V. anguillarum* Serotip O1 (NCIMB 2131) antiserumu ile muamele edilen saha ve referans izolatların Westernblot profilleri Tekrarlı analizleri.(M: Moleküler ağırlık belirteci; İzolatlar: V-12, V-18, V-21, V-85, V2022-104 saha suşları; NCIMB 6 Serotip O2a, NCIMB 2130 Serotip O2b, NCIMB 2131 O1 referans suşlar)

Özellikle 12–14 kDa moleküler ağırlıktaki protein bantları, **O1 serotipine özgü belirleyici bir antijenik imza** olarak öne çıkmıştır.

- V-12 saha izolatı, yaklaşık **35 kDa ve 90 kDa** ağırlığındaki protein spotlarını göstermemesi nedeniyle hem referans suşlardan hem de O1 saha suşlarından **antijenik olarak ayrışmıştır**.

2. Serotip O2a Antiserumu (NCIMB 6T) ile Western Blot Bulguları

Serotip O2a'yı temsil eden **NCIMB 6T antiserumu** ile yapılan analizlerde; hem referans hem de saha suşlarının çoğunda **14–75 kDa** aralığında ortak immünojenik bantlar gözlenmiştir (Şekil 72).



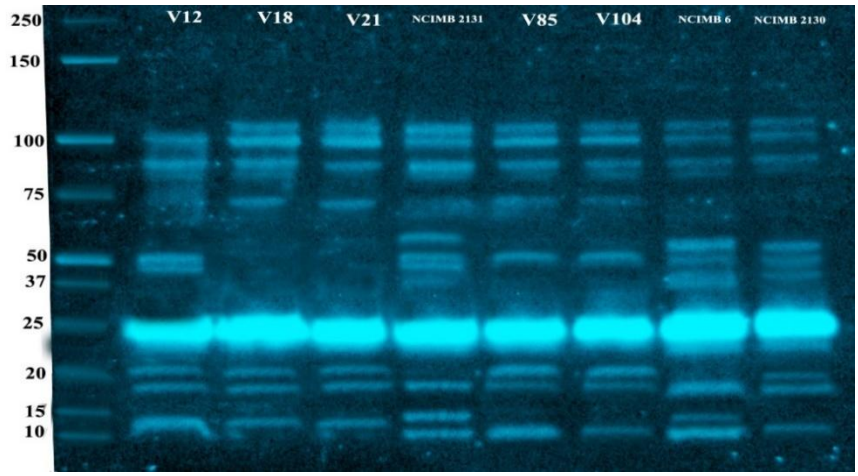
Şekil 72. *V. anguillarum* Serotip O2a serumu ile muamele edilen *V. anguillarum* İzolatlarının westernblot profilleri (M: Marker, V-12, V-18, V-21, V-85, V-104 saha suşları; NCIMB 6 O2a, NCIMB 2130 O2b, NCIMB 2131 O1 referans suşlar).

NCIMB 6T referans suşu, özgül olarak 14, 22, 23, 24 ve 26 kDa ağırlığında bantlar sergilemiştir.

- V-12 suşunun yaklaşık **20 kDa** moleküler ağırlığında protein bandı üretmemesi ve bazı karakteristik bantlardan yoksun olması, bu izolatın **O2a antiserumu ile tanınmadığını ve antijenik olarak farklılaştığını** göstermiştir.

3. Serotip O2b Antiserumu (NCIMB 2130) ile Western Blot Bulguları

Serotip O2b referans suşu olan **NCIMB 2130 antiserumu** ile yapılan Western blot analizlerinde, hem referans suşlar hem de O1 serotipli saha izolatları arasında **110 kDa** civarında ortak protein spotları belirlenmiştir (Şekil 73).



Şekil 73. *V. anguillarum* serotip O2b serumu ile muamele edilen *V. anguillarum* izolatlarının westernblot profilleri (M: Marker, V12, V18, V21, V85, V104 saha suşları; NCIMB 6 O2a, NCIMB 2130 O2b, NCIMB 2131 O1 referans suşlar).

Ayrıca:

- O1 saha suşlarında yaklaşık **70 kDa** ağırlığında karakteristik protein spotları gözlenmiştir.
- V-12 izolatı, bu spotları vermemesi ile hem saha hem de referans suşlardan ayrışarak **atipik bir immünojenik profile** sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Western blot analizleri sonucunda elde edilen veriler, *V. anguillarum* izolatları arasında belirgin immünojenik farklılıklar olduğunu ve bazı proteinlerin serotip-spesifik olabileceğini göstermektedir:

- **12–14 kDa** protein spotlarının sadece NCIMB 2131 ve O1 saha izolatlarında görülmesi, bu bantların **Serotip O1'e özgü bağışıklıkla tanınan proteinler** olabileceğini ortaya koymuştur.
- V-12 saha izolatının hem üç referans suş hem de dört saha suşuyla benzer protein bant profili sergilememesi, bu izolatın **serotipik ve immünojenik olarak atipik** olduğunu güçlü şekilde desteklemektedir.
- Serotipler arasında gözlenen ortak immünojenik protein spotları (örneğin 110 kDa bandı), **korunmuş epitoplar** açısından aşı geliştirme çalışmalarında dikkate alınması gereken moleküler hedefleri işaret etmektedir.

Westernblot analizleriyle elde edilen bu bulgular, *V. anguillarum* serotipleri arasında immünojenik düzeyde farklılıklar bulunduğunu ve antiserumlara özgü protein tanınırlığının değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle Serotip O1 suşlarıyla tanınan özgül protein bantlarının saptanması, **Serotip O1'e özgü aşı geliştirme stratejileri** için hedef belirlenmesinde temel teşkil etmektedir. V-12 suşunun immünojenik ve serotipik olarak farklılaşması ise sahadaki potansiyel varyant yapıları izleme açısından önemli bir bulgudur.

4.4.3.6 Genom (Tüm Genom Sekans) ve Genom Biyoinformatik Analizi ile Aşı Suşlarının Belirlenmesi

Bu çalışmada 23 adet *V. anguillarum* suşunun genomik özellikleri değerlendirilmiştir. Oxford Nanopore sekanslama teknolojisi kullanılarak yürütülen analizlerde, suşlara ait genom büyüklüklerinin yaklaşık 4.35–4.44 Mb arasında değiştiği belirlenmiştir. Suşların GC içeriği ortalama %44.4 düzeyinde olup, bu değerler *V. anguillarum* türüyle uyumluluk göstermektedir. Genomlarda yer alan contig sayısı 4 ila 34 arasında değişmekte olup, bu durum DNA kalitesi ve birleştirme başarımıyla ilişkili farklılıkları yansıtmaktadır (Tablo 45). N50 değerleri genel olarak yüksek bulunmuş (yaklaşık 2.4–3.1 Mb aralığında), bu da montaj kalitesinin ve genom bütünlüğünün büyük ölçüde yeterli olduğunu göstermektedir. Suşların hiç birinde plazmid varlığına dair belirgin bir bulguya rastlanmamıştır. Anotasyon sonuçlarına göre, her bir suşta yaklaşık 3.880 ila 3.900 arasında protein kodlayan gen tespit edilmiş, ayrıca her biri üçer kopya olmak üzere 5S, 16S ve 23S rRNA genleri ile 97 ila 105 arasında değişen sayılarda tRNA genleri tanımlanmıştır. Elde edilen bu genomik veriler, suşların genetik yapısını yüksek çözünürlükte ortaya koymuş ve ileri düzey filogenetik ve işlevsel analizler için sağlam bir temel oluşturmuştur.

Filogenetik analizler, Türkiye kökenli *V. anguillarum* suşlarının tamamının referans *V. anguillarum* suşlarıyla yüksek düzeyde benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Tip Suşlar Genom Veritabanı (TYGS) üzerinden yürütülen dijital DNA-DNA hibridizasyonu (dDDH) analizlerine göre, izolatların büyük çoğunluğu referans *V. anguillarum* türüyle %85'in üzerinde benzerlik göstermiştir. Bu oranlar, izolatların taksonomik olarak aynı tür içerisinde yer aldığını doğrulamakta ve genetik açıdan tür içi homojenliği desteklemektedir. Genbank'tan kayıtlı bulunan *V. anguillarum* suşlarının tüm genom dizilerine dayanan filogenetik analizi, Bakteriyel ve Viral Biyoinformatik Kaynak Merkezi (BV-BRC) çevrimiçi sunucusunda bakteriyel genom ağacı oluşturma aracı kullanılarak oluşturuldu (Olson ve diğerleri, 2023).

Elde edilen bu sonuçlar, incelenen suşların tür düzeyinde doğru tanımlandığını ve *V. anguillarum*'a ait genetik çeşitliliğin sınırları içerisinde kaldığını ortaya koymaktadır (Şekil 74 ve 75). Şekil 74'de sunulan dairesel filogenetik ağaç, Türkiye'den elde edilen 23 *V. anguillarum* izolatının genom temelli filogenetik ilişkilerini, referans suşlarla birlikte göstermektedir. Ağaçta kırmızı renkle işaretlenen tüm izolatlar serotip **O1** olarak tanımlanmış ve dDDH temelli karşılaştırmalarda ≥%85 benzerlik düzeyiyle *V. anguillarum* türü içerisinde konumlandırılmıştır. Bu durum, moleküler düzeyde tür doğrulamasını desteklemekte ve serotip O1'in Türkiye izolatları arasında baskın olduğunu ortaya koymaktadır. Türkiye suşlarının büyük çoğunluğunun (21 izolat), özellikle Avrupa kökenli O1 serotip referans suşlarıyla (ör. *V. anguillarum* 775, USA; *V. anguillarum* RV22, Spain) **monofiletik** bir grup içinde kümelendiği gözlenmektedir. Bununla birlikte, V12 ve V25 izolatlarının Türkiye'de yaygın olarak görülen *V.*

anguillarum O1 serotip suşlarından filogenetik ve genomik düzeyde belirgin şekilde ayrışmaktadır. Bu sonuçlar, mikroaglütinasyon testlerinde V12 suşunun her üç referans antiserumla da reaksiyona girmemesi doğrultusundaki verileri desteklemektedir.

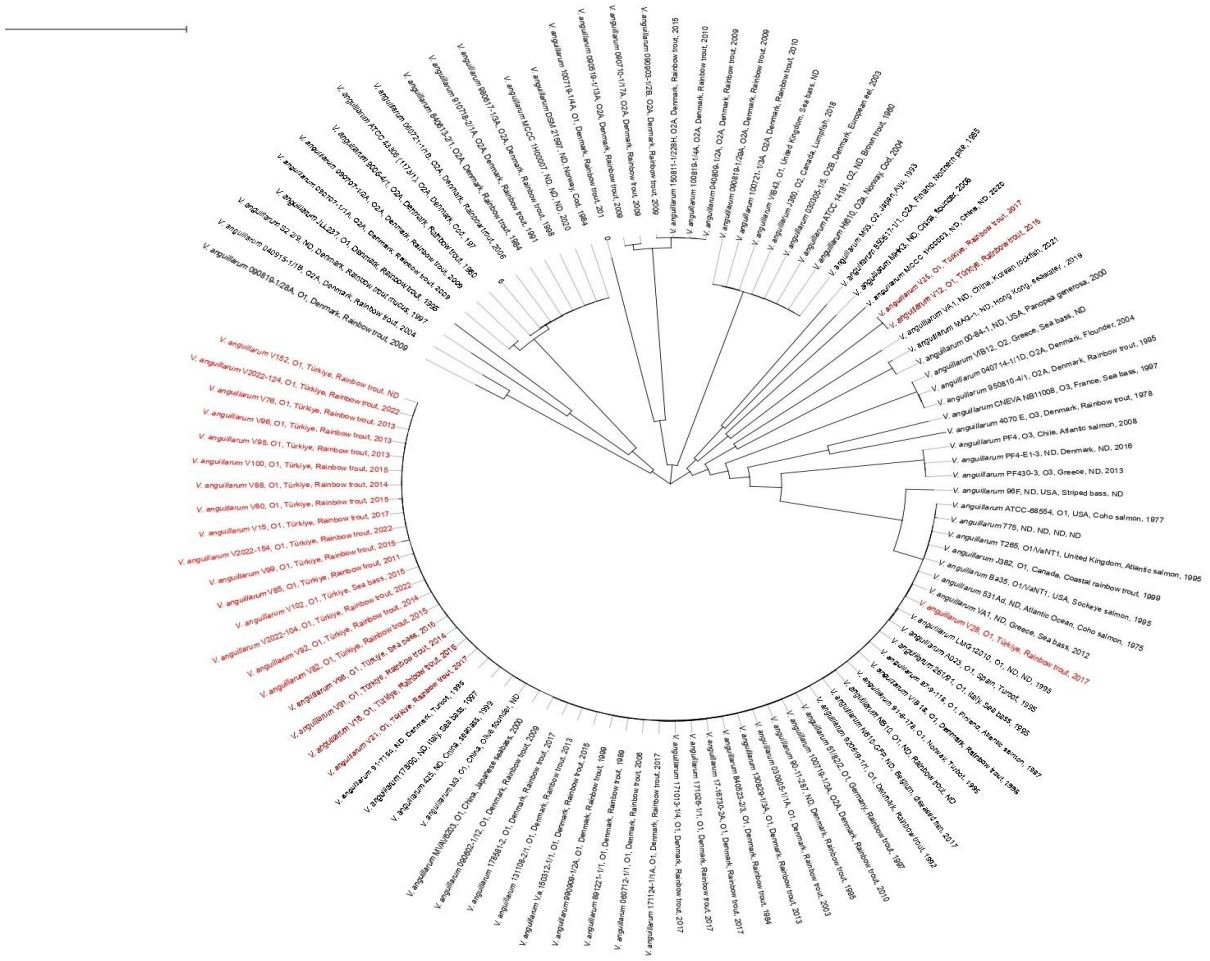
Şekil 74'de veriler incelendiğinde; bir çok *V. anguillarum* izolatının ortak olarak, temel virülans faktörlerini taşıdığı, ancak özellikle ferrik enterobaktin taşınımı, RTX toksinleri, Tip VI sekresyon sistemi ve antimikrobiyal direnç genleri yönünden suşlar arasında belirgin farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Bu varyasyonlar, Şekil 75'de sunulan gen grubu dağılımına dayalı olarak tür içi genetik çeşitliliği ve potansiyel patojenite farklarını ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada Türkiye'den izole edilen 23 adet *V. anguillarum* suşu, serotip O1'e özgü antiserumlarla yapılan mikrotitrasyon ve Western blot analizleri ile antijenik açıdan karakterize edilmiştir. Ayrıca tüm genom sekanslarına dayalı filogenetik analizlerle klonal yakınlıkları belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda; V18 ve V21 suşunun, referans serotip O1 suşu (NCIMB 2131) ile yüksek düzeyde antijenik bant örtüşmesi ve 25–50 kDa aralığında spesifik protein profili göstermesi nedeniyle **inaktif enjeksiyon aşı formülasyonu için birincil aşı suşu adayları olarak** belirlenmiştir. V21 suşunun, yüksek mikrotitrasyon aglütinasyon titresi vermesi ve Westernblot analizinde yaygın antijenik profil sergilemesi ayrıca dikkat çekmiştir. Filogenetik olarak, tüm Türk suşlarının O1 referans kladı içerisinde gruplandığı ve V18 ile V21 suşlarının hem antijenik hem de klonal yakınlık gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgular, gökkuşağı alabalığı üretiminde yaygınlaşan *V. anguillarum* enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında, serotip O1 ile yüksek antijenik uyum gösteren ve Avrupa kökenli referans suşlarla filogenetik olarak yakın kümelenen **V18 ve V21 saha izolatlarının**, yerli kaynaklı prototip bir inaktif enjeksiyon aşısı geliştirilmesi için uygun adaylar olduğunu ortaya koymaktadır.

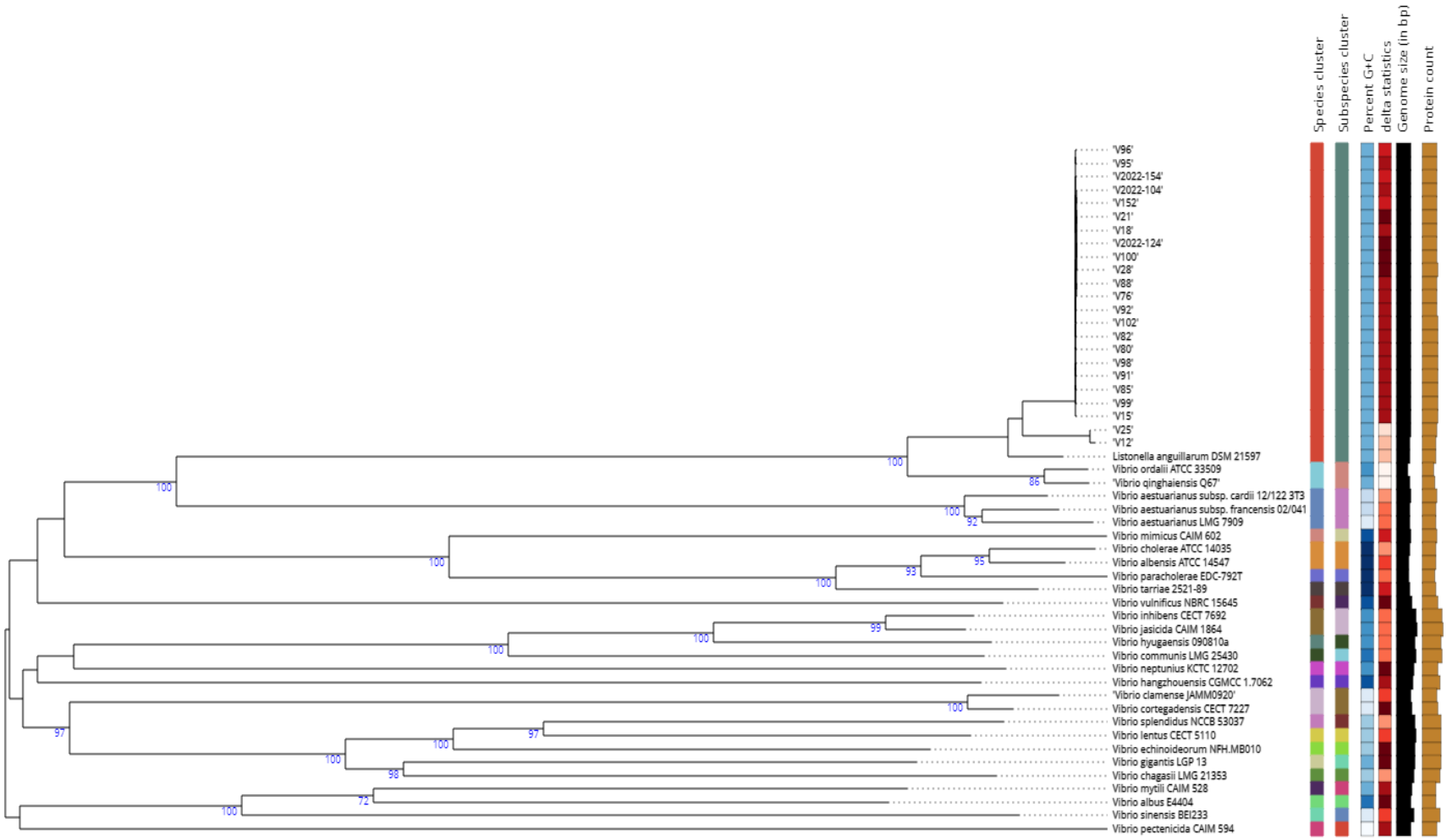
Tablo 45. Çalışmada Kullanılan *V. anguillarum* izolatların genomlarına ilişkin bulgular

İzolat	**Genbank Erişim No**	**Genom büyüklüğü (bp)**	**Kapsama oranı**	**Kontig Sayısı**	**N50**	**GC (%)**	**Protein-coding genes (CDS)**	**rRNA (5S, 16S, 23S)**	**tRNA**	**rRNA (5S, 16S, 23S)**	**tRNA**
V2022-124	JBNGBB000000000	4386324	175.0	12	3112689	44.42	3.886	10, 9, 9	102	10, 9, 9	102
V85	JBNGBL000000000	4351864	429.0	10	3087624	44.44	3.884	10, 9, 9	97	10, 9, 9	97
V98	JBNGBF000000000	4355230	414.0	12	3110412	44.44	3.878	10, 9, 9	102	10, 9, 9	102
V2022-104	JBAJHL000000000	4390791	224	4	3113333	44.43	3.891	10, 9, 9	102	10, 9, 9	102
V25	JBNGBQ000000000	4432272	70.0	34	2455048	44.27	3.892	10, 9, 9	105	10, 9, 9	105
V18	JBAJHJ000000000	4352630	107	14	2841892	44.42	3.875	10, 7, 9	95	10, 7, 9	95
V100	JBNGBD000000000	4320150	45.0	5	3107874	44.48	3.824	10, 9, 9	102	10, 9, 9	102
V82	JBNGBM000000000	4358139	283.0	11	3110298	44.43	3.889	10, 9, 9	96	10, 9, 9	96
V80	JBNGBN000000000	4357604	292.0	10	3111332	44.44	3.883	10, 8, 9	126	10, 8, 9	126
V99	JBNGBE000000000	4372424	399.0	11	3110483	44.43	3.987	10, 9, 9	93	10, 9, 9	93
V21	JBNGBR000000000	4359827	83.0	12	3110829	44.43	3.879	9, 9, 9	98	9, 9, 9	98
V102	JBNGBC000000000	4366351	239.0	11	3112227	44.43	3.888	10, 9, 9	99	10, 9, 9	99
V95	JBNGBH000000000	4360598	246.0	10	3113613	44.44	3.877	10, 9, 9	101	10, 9, 9	101
V152	JBAJHK000000000	4371229	101	4	3114093	44.44	3.781	10, 9, 9	101	10, 9, 9	101
V12	JBAJHI000000000	4000697	118	3	2865943	44.54	3.459	11, 10, 10	104	11, 10, 10	104
V88	JBNGBK000000000	4398728	155.0	10	3114015	44.43	3.914	10,9, 9	102	10,9, 9	102
V91	JBNGBJ000000000	4364164	373.0	11	3112905	44.43	3.897	10, 9, 9	97	10, 9, 9	97

V2022-154	JBNGBA000000000	4339905	118.0	15	3087800	44.43	3.988	10, 10, 10	105	10, 10, 10	105
V96	JBNGBG000000000	4361392	252.0	11	3113045	44.43	3.885	10, 9, 9	98	10, 9, 9	98
V28	JBNGBP000000000	4464135	149.0	14	3556925	44.36	4.016	10, 9, 9	99	10, 9, 9	99
V15	JBNGBS000000000	4345106	201.0	12	2980851	44.42	3.885	10, 5, 8	89	10, 5, 8	89
V92	JBNGBI000000000	4363617	224.0	10	3113993	44.44	3.891	10, 9, 9	101	10, 9, 9	101
V76	JBNGBO000000000	4382210	90.0	5	3114093	44.44	3.888	10, 9, 9	102	10, 9, 9	102



Şekil 74. *V. anguillarum* izolatlarına ait filogenetik ağaç, 3800 tek kopya genin amino asit dizileri kullanılarak BV-BRC sunucusu üzerinden oluşturulmuştur. Kırmızı ile işaretli suşlar Türkiye kökenlidir.



Şekil 75. TYGS sunucusunda genom temelli oluşturulan filogenetik analiz

Bu çalışmada, 23 adet yerli *V. anguillarum* saha izolatının genomik özellikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Tablo 45'de sunulan bulgulara göre, tüm izolatların genom uzunluklarının 4.32 ile 4.57 Mb arasında değiştiği, GC içeriklerinin ise %44.3–44.8 aralığında oldukça homojen bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Söz konusu parametreler, suşlar arasında yüksek düzeyde genetik stabilite ve klonal yakınlık bulunduğunu ortaya koymaktadır. Kodlanan toplam gen (CDS) sayısının ortalama 3900–4100 aralığında olduğu, tRNA sayısının 75 ile 90 arasında değiştiği ve rRNA kopya sayısının 8–11 arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler, özellikle konak adaptasyonu, metabolik aktivite ve üretim ortamlarına uyum açısından önem arz etmektedir.

Aşı geliştirme potansiyeli açısından değerlendirildiğinde, **V18 ve V21 suşları**, sahip oldukları yüksek tRNA/rRNA içeriği, genom bütünlüğü ve plazmid içermeyen genetik yapıları ile öne çıkmaktadır. Bu iki suş, ayrıca serotip O1 ile uyumlu antijenik yapı taşımaları ve filogenetik analizlerde referans suşlarla aynı klad içinde yer almaları bakımından da desteklenmektedir. Tüm bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, V18 ve V21 saha izolatlarının, yerli kaynaklı ve genetik olarak güvenli **prototip inaktif enjeksiyon aşı suşları** olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

4.4.3.7 İn-Vivo Virulens Testleri ve *V. anguillarum* Eprüvasyon Suşlarının Seçim Kriterleri

Gökkuşağı alabalıklarında yaygın bakteriyel enfeksiyonlara neden olan *V. anguillarum* suşlarına karşı geliştirilecek inaktif enjeksiyon aşılarında kullanılacak eprüvasyon (çalışma tohumu) suşlarının belirlenmesi amacıyla, kapsamlı bir fenotipik (FVÖ, SDS PAGE, Westernblot), serolojik (mikroaglütinasyon) ve moleküler odaklı (tüm genom ve genom biyoinformatik) bütüncül bir değerlendirme yapılmıştır. Bu doğrultuda, üç *V. anguillarum* saha izolatı aşağıdaki kriterlere göre seçilmiştir:

- Fenotipik virülens özellikleri (FVÖ): Hemoliz, jelatinaz, proteaz. Lipaz enzim aktiviteleri
- Aglütinasyon testleri: Serotipik farklılıkların serolojik olarak gösterilmesi
- SDS-PAGE protein profili: Suşlara özgü protein desenlerinin karşılaştırılması
- Western blot analizleri: İmmünodominant proteinlerin varlığı ve çapraz reaktivite
- Tam genom sekans (WGS) analizi: Virülens genleri, mobil genetik elementler, klonal yapı

Bu değerlendirmeler sonucunda V12 (düşük virulens, V15 ve V18 yüksek virulensli izolat (Şekil 74, 75) temsilcileri olarak belirlenmiş ve in vivo virülens deneylerine dâhil edilmiştir.

Her bir izolat, yaklaşık 1×10^{7} cfu/balık dozunda, 0,1 mL hacminde, fenoksietanol (0,32 mL/L) ile anestezi uygulanmış gökkuşağı alabalıklarına (n=27: her bir gruptan üçer balık spesifik patojen yönünden incelenmiştir) intraperitoneal yolla enjekte edilmiştir. Tüm deney grupları 21 gün boyunca izlenmiş; mortalite verileri günlük olarak kaydedilmiş ve elde edilen veriler Tablo 46'da detaylı olarak sunulmuştur.

Tablo 46. Gökkuşağı alabalıklarında *V. anguillarum* İzolatlarının Virulens Deneyleri

Gün	Balık ağırlığ (gr)	Toplam Balık sayısı (90)	Testte kullanılan izolatların cfu/mL sayıları ve mortalite değerleri					
			V12 10^7 cfu/balık	Mortalite	V15 10^7 cfu/balı	Mortalite	V18 10^7 cfu/balık	Mortalite
0	15,17± 0,7	81	27	-	27	-	27	-
1		71	25	-	27	-	19	8
2		63	24	-	27	1	12	7
3		58	24	-	27	2	7	5
4		58	24	-	27	2	7	-
5		58	24	-	27	2	7	-
6		57	24	1	26	-	7	-
7		57	24	-	26	-	7	-
8		57	24	-	26	-	7	-
9		57	24	-	26	-	7	-
10		57	24	-	26	-	7	-
11		57	24	-	26	-	7	-
12		57	24	-	26	-	7	-
13		56	23	-	26	1	7	-
14		56	23	-	26	-	7	-
15		56	23	-	26	-	7	-
16		56	23	-	26	-	7	-
17		56	23	-	26	-	7	-
18		56	23	-	26	-	7	-
19		56	23	-	26	-	7	-
20		56	23	-	26	-	7	-
21		56	23	-	26	-	7	-
Toplam Balık Ölümü			8 (%3,)		8 (%29,62)		20 (%74,074)	

Deney grupları ve kontrol gruplarında yer alan gökkuşağı alabalıkları 21 gün süreyle takip edilerek, gruplarda görülen ölümler kaydedilmiş, mortalite görülen balıklardan TSA ve BHIA besi yerlerine ekim yapılarak 25 ºC'de 48 saat inkube edildikten sonra Koch postulatlarına göre reizolasyon yapılmıştır. *V. anguillarum* ile deneysel enfeksiyon sonucunda mortalite görülen balıklara ait fotoğraf görüntüleri Şekil 76'da sunulmuştur.



Şekil 76. Gökkuşağı alabalıklarında *V. anguillarum* ile deneysel enfeksiyon sonucunda deride koyulaşma, çift yüzgeçlerin kaidesi ve karın bölgesinde eritem ve hemoraji görüntüsü

Bu çalışma kapsamında, gökkuşağı alabalığı üretiminde artan klinik önemine sahip *V. anguillarum* saha izolatları; fenotipik virülens özellikleri, serotip O1'e özgü serolojik reaktivite, immünodominant protein profilleri ve tüm genom biyoinformatik analizler temelinde çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. İn vivo enfeksiyon modelinde elde edilen mortalite verileriyle desteklenen bu analizler sonucunda, **V18** izolatı hem genetik düzeydeki virülens faktörü yükü hem de yüksek mortalite oranıyla **yüksek virülensli bir saha suşu** olarak tanımlanmıştır. **V15** izolatı ise, orta düzeyde in vivo mortalite göstermesine karşın, genomik analizlerde sekresyon sistemleri, hemolizinler ve adezinler gibi çok sayıda önemli virülens genini taşıması nedeniyle, **gizil yüksek patojenite potansiyeline sahip** bir suş olarak değerlendirilmiştir. Öte yandan, **V12 izolatı**, hem fenotipik hem de genomik düzeyde düşük virülens profili sergilemiş ve bu yönüyle deneysel enfeksiyon modelinde **düşük virülens kontrolü sağlayan bir referans suş** işlevi görmüştür.

Bütüncül olarak ele alındığında, serotip O1 ile yüksek antijenik uyum, plazmid içermeyen kararlı genom yapısı ve antibiyotik direnç genlerinin yokluğu gibi özellikleriyle **V18 ve V15 saha**

izolatlarının, yerli, güvenli ve etkili bir prototip inaktif enjeksiyon balık aşısı geliştirilmesinde eprüvasyon suşları olarak kullanılmaya uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

4.4.3.8 LD_{60} Dozunun Belirlenmesi

Çalışma Tohum (Working Seed) Suşlarının Belirlenmesi

Y. . ruckeri BT1, *Y. ruckeri* BT 2, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* suşlarına yapılan **virulens** deneylerinde en yüksek virulensi gösteren Y-286, Y2022-430, L-67, L2022-296 ve V-18 suşları çalışma tohum (working seed) suşları olarak belirlendi. Virulens deneyleri sonucunda çalışma tohum (working seed) suşu olarak belirlenen Y-258 O1 BT1, Y2022-430 O1 BT2, L-67, L2022-296 ve V-18 suşlarının 10^5, 10^7 ve 10^9 cfu/balık canlı bakteri sayıları ve OD_{620} (optik dansite) düzeyleri belirlendi. Üretilen aşıların etkinliklerinin belirlenmesinde kullanılacak olan bu suşlar, LD60 dozlarının belirlenmesi amacıyla yaklaşık 15 gr ağırlığında 450 gökkuşağı alabalığı kullanıldı. Çalışma yapılan balık grupları ve eprüvasyon uygulaması hakkında bilgiler Tablo 47'de verildi.

Tablo 47. LD 60 Doz (cfu/ml) Deneylerinde Kullanılan Çalışma (Working Seed) Suşlarının Uygulama Dozları ve Balık Gruplarına İlişkin Deney Planı

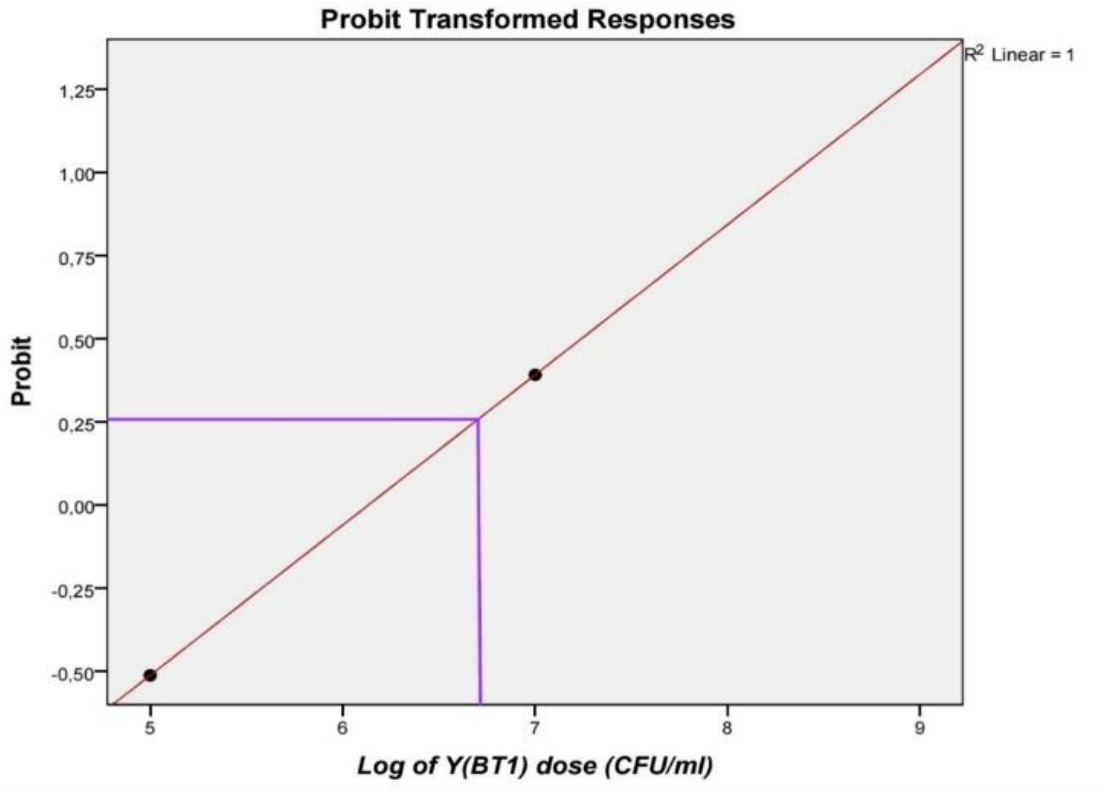
Deney Grupları	Balık Türü	Uygulama Yolu	Uygulama Dozu (cfu/ml)	Balık Ağırlığı (gram)	Balık Sayısı	Deney Süresi (gün)	Tekrar sayısı
Y. ruckeri O1 BT1 Y-286	*O. mykiss*	peritoniçi	10^5	12	30	21	**1**
			10^7		30		
			10^9		30		
Y. ruckeri O1 BT2 Y-430	*O. mykiss*	peritoniçi	10^5	12	30	21	1
			10^7		30		
			10^9		30		
V. anguillarum O1 V-18	*O. mykiss*	peritoniçi	10^5	12	30	21	1
			10^7		30		
			10^9		30		
L. garvieae L-67	*O. mykiss*	peritoniçi	10^5	12	30	21	1
			10^7		30		
			10^9		30		
L. petauri L-296	*O. mykiss*	peritoniçi	10^5	12	30	21	1
			10^7		30		

			10^9		30		
Sonuç	LD 60 dozlarının belirlenmesi deneylerinde toplam 450 balık kullanıldı.						

Sonuç olarak Y-286 (BT1), Y2022-430 (BT2), L-67, L2022-296 ve V-18 çalışma tohum (working seed) suşlarının probit analizi ile LD60 değerleri, *Y. ruckeri* Y-286 BT1 suşu için $2{,}5x10^6$; *Y. ruckeri* Y-2430 BT2 suşu için $8{,}4x10^5$; *L. garvieae* L-296 suşu için $8{,}8x10^5$; *L. garvieae* L-67 suşu için $6{,}7x10^6$ ve. *V. anguillarum* V-18 suşunu için$1{,}6x10^6$ olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar, IBM SPSS Statistics 20 programı kullanılarak probit analizi ile yorumlandı ve belirlenen LD60 tahmini düzeyleri ve probit grafikleri Şekil 77-86'da verildi.

	***%95 güven aralığında Y -286* BT1 doz (cfu/ml) tahmini değeri**			**Log 10 tabını %95 güven aralığında *Y -286* BT1 doz (cfu/ml) tahmini değeri**		
İhtimal	***Tahmin***	***Alt Sınır***	***Üst Sınır***	***Tahmin***	***Alt Sınır***	***Üst Sınır***
,500	1017020,418	183257,875	3976209,882	6,007	5,263	6,599
,550	1614049,189	340096,627	6741660,301	6,208	5,532	6,829
,600	2580686,952	610620,244	12035258,25	6,412	5,786	7,080
,650	4191775,206	1068017,095	22934654,52	6,622	6,029	7,360
,700	6988833,521	1838040,661	47392966,92	6,844	6,264	7,676
,750	12133465,02	3157376,786	108481761,7	7,084	6,499	8,035
,800	22426871,64	5527446,603	284635860,4	7,351	6,743	8,454
,850	45892092,81	10193062,05	912649635,8	7,662	7,008	8,960

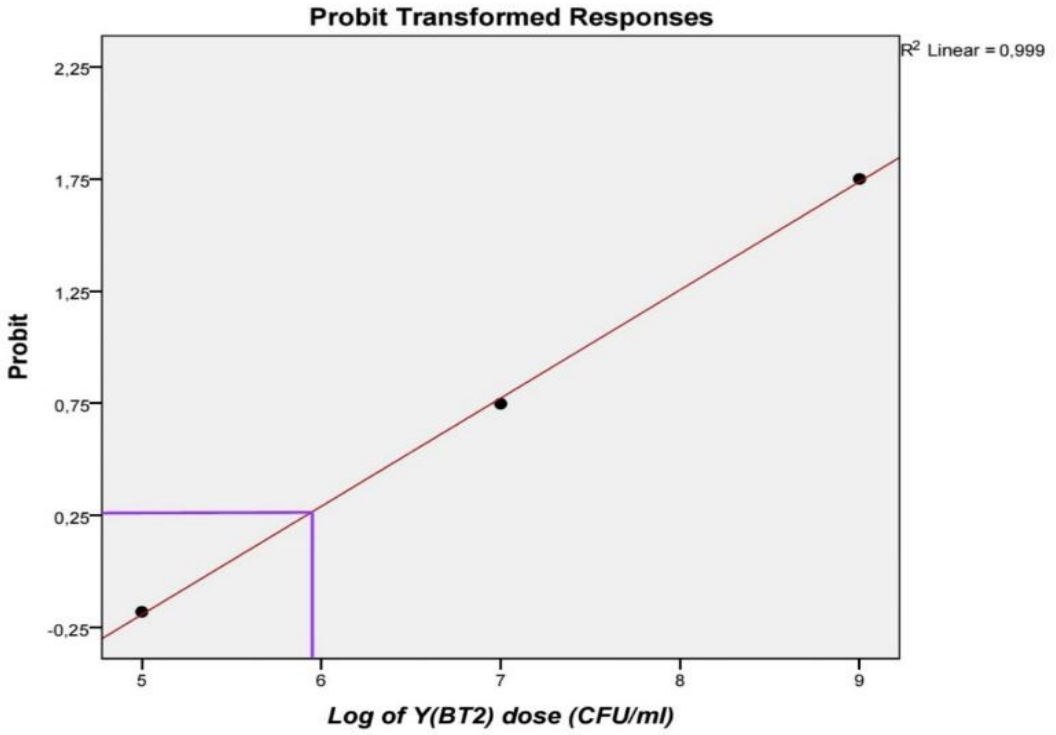
Şekil 77. *Y. ruckeri* Y-286 BT1 suşunun probit analizi LD60 tahmini değeri (2,5x106).



Şekil 78. *Y. ruckeri* Y-286 BT1 suşunun Probit analizi LD60 (tetal doz) doz grafiği (%60 için Probit değeri=0,253)

	Y (BT2) dozu (CFU/ml) için %95 Güven Aralıkları			***Log 10 tabınıda Y (BT2) dozu (CFU/ml) için %95 Güven Aralıkları***		
İhtimal	***Tahmin***	***Alt Sınır***	***Üst Sınır***	***Tahmin***	***Alt Sınır***	***Üst Sınır***
,500	248121,107	7529,984	1452261,374	5,395	3,877	6,162
,550	454019,664	21915,001	2576863,544	5,657	4,341	6,411
,600	838905,551	61396,534	4877188,484	5,924	4,788	6,688
,650	1582359,002	165124,973	10169713,16	6,199	5,218	7,007
,700	3088427,640	424427,348	24347199,58	6,490	5,628	7,386
,750	6355645,473	1043919,744	70336636,07	6,803	6,019	7,847
,800	14196137,04	2500259,466	260709299,0	7,152	6,398	8,416

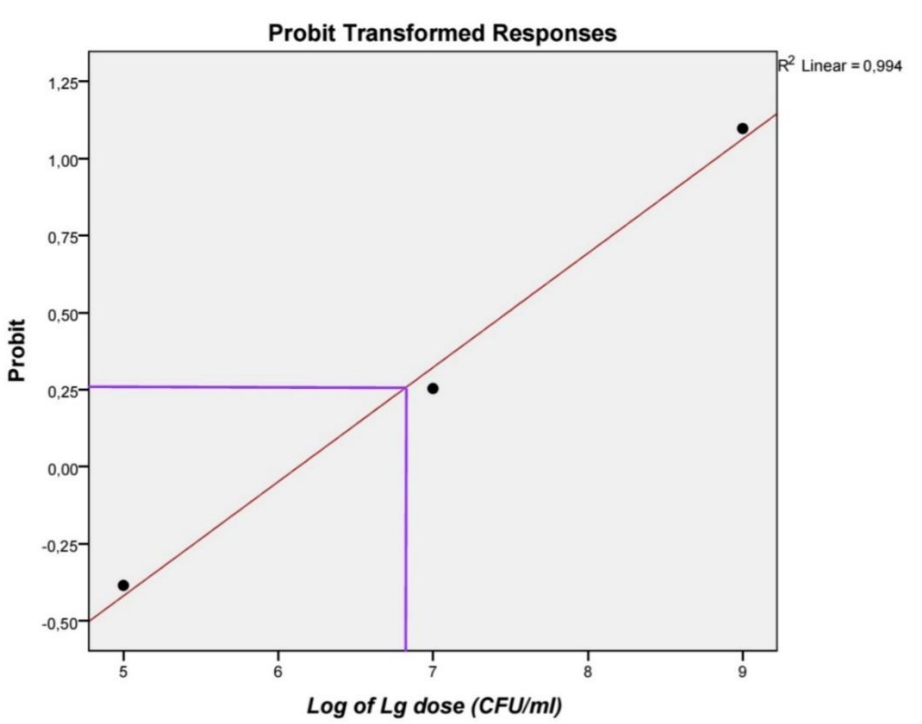
Şekil 79. *Y. ruckeri* Y-2430 BT2 suşunun probit analizi LD60 tahmini değeri (8,4x105).



Şekil 80. *Y. ruckeri* Y-430 BT2 suşunun probit analizi LD60 doz grafiği (%60 için probit değeri=0,253)

	Lg dozu (CFU/ml) için %95 Güven Aralıkları			Log 10 tabınıda Lg dozu (CFU/ml) için %95 Güven Aralıkları		
İhtimal	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır
,500	1371611,488	31103,712	11705040,49	6,137	4,493	7,068
,550	3012138,871	132741,468	29696310,41	6,479	5,123	7,473
,600	6699197,230	490244,926	90466168,41	6,826	5,690	7,956
,650	15304795,82	1554036,542	348278426,5	7,185	6,191	8,542
,700	36555584,22	4316068,443	1751034483	7,563	6,635	9,243
,750	93543009,82	11016042,35	11802861100	7,971	7,042	10,072
,800	266319422,0	27468242,89	1,125E+11	8,425	7,439	11,051

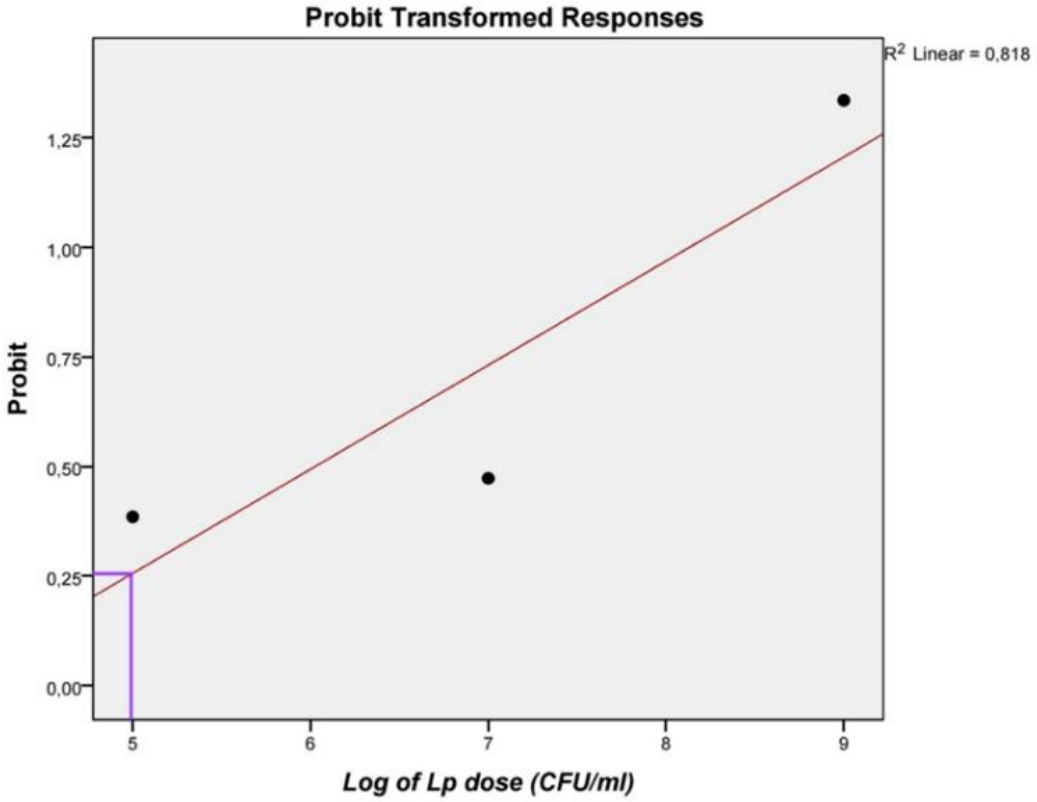
Şekil 81. *L. garvieae* L-67 suşunun probit analizi LD60 tahmini değeri (6,7x106)



Şekil 82. *L. garvieae* L-67 suşunun probit analizi LD60 doz grafiği (%60 için probit değeri=0,253)

	Lp dozu (CFU/ml) için %95 Güven Aralıkları			Log 10 tabınıda Lp dozu (CFU/ml) için %95 Güven Aralıkları		
İhtimal	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır
,500	6183,037	,000	479138,389	3,791	-1396,606	5,680
,550	23070,334	,000	1162768,534	4,363	-1125,374	6,065
,600	87926,238	,000	3317221,581	4,944	-849,837	6,521
,650	350505,534	,000	14374888,77	5,545	-565,213	7,158
,700	1505261,410	,000	383980290,6	6,178	-266,018	8,584
,750	7254858,343	,004	2,593E+069	6,861	-2,430	69,414
,800	41802356,64	620606,754	.	7,621	5,793	422,446

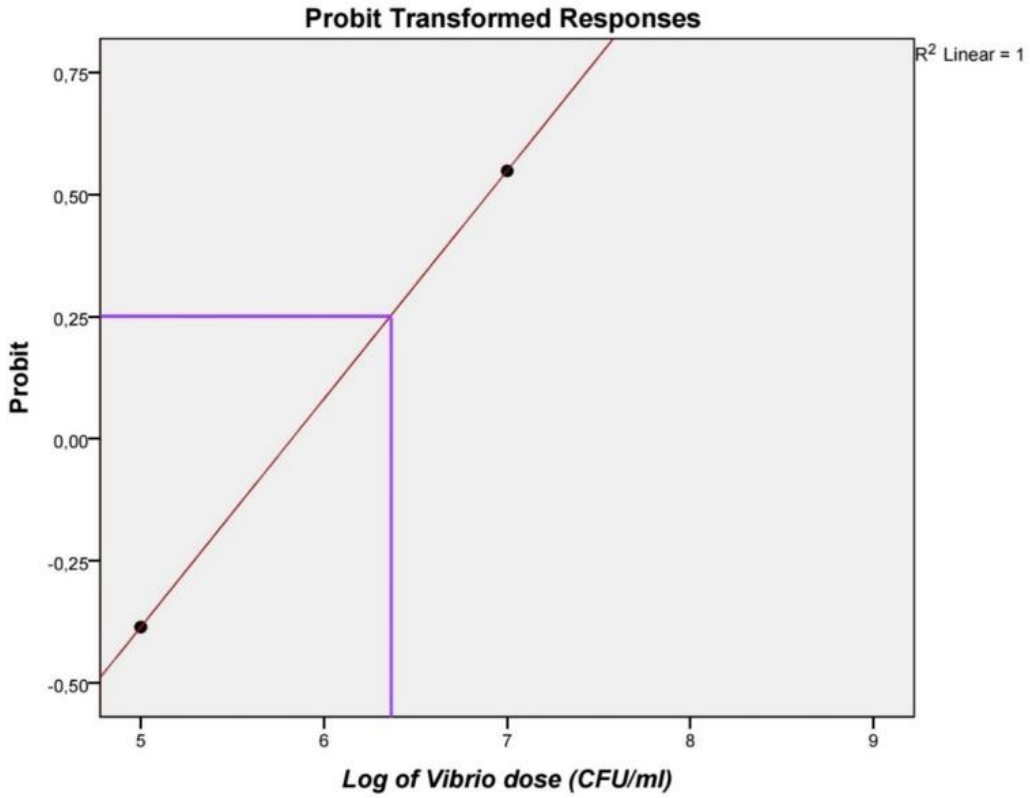
Şekil 83. *L. garvieae* L-296 suşunun probit analizi LD60 tahmini değeri (8,8x105)



Şekil 84. *L. garvieae* L-67 suşunun probit analizi LD60 doz grafiği (%60 için probit değeri=0,253)

	Vibrio dozu (CFU/ml) için %95 Güven Aralıkları			Log 10 tabınıda Vibrio dozu (CFU/ml) için %95 Güven Aralıkları		
İhtimal	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır	Tahmin	Alt Sınır	Üst Sınır
,600	1600550,474	306225,754	7055359,400	6,204	5,486	6,849
,650	2606094,551	573581,970	13018982,72	6,416	5,759	7,115
,700	4356241,962	1050522,320	26265329,18	6,639	6,021	7,419
,750	7583951,129	1902760,599	59422435,78	6,880	6,279	7,774
,800	14061103,55	3475577,915	156461363,5	7,148	6,541	8,194

Şekil 85. *V. anguillarum* V-18 suşunun probit analizi LD60 tahmini değeri (1,6x106)



Şekil 86. *V. anguillarum* V-18 suşunun probit analizi LD60 doz grafiği (%60 için probit değeri=0,253)

4.5 Prototip Aşıların Üretimi

Y. ruckeri BT1, *Y. ruckeri* BT 2, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* suşlarına yünelik prototip monovalan ve polivalan prototip aşı üretiminde Tablo 48'de detayları verilen suşlar ana tohum suşu (Master Seed) olarak belirlendi.

Tablo 48. Emülsiyon banyo ve enjeksiyon monovalan ve emülsiyon polivalan aşı üretiminde kullanılan ana tohum (master seed) suşları

SUŞ KODU	SUŞ ADI
Y75-2013	*Y. ruckeri* biyotip 2
Y2022-266	*Y. ruckeri* biyotip 1
V-21	*V. anguillarum* O1
L-152	*L. petauri*
ÖS-37	*L. garvieae*

Tablo 48'de belirtilen ana tohum (master seed) suşları kullanılarak 3 adet monovalan emülsiyon banyo aşı, 2 adet monovalan emülsiyon enjeksiyon aşı, 1 adet bivalan emülsiyon banyo aşı ve 1 adet kombine (pentavalan) emülsiyon enjeksiyon aşı olmak üzere toplam 7 farklı aşı hizmet alımı yoluyla GMP standarlarında Avrupa Farmakopesi 11.0 edition 2022 esaslarına (üretim, inaktivasyon, filtrasyon-konsantrasyon, formulasyon, sterilite ve güvenlik testleri) uygun olarak üretildi. GMP standartlarında üretimi yapılan monovalan, bivalan banyo/enjeksiyon emülsiyon aşılar ile kombineenjeksiyon emülsiyon aşılara ilişkin bilgiler 3.7.1 ve 3.7.2. başlıklar altında verildi.

4.5.1 Monovalan/Bivalan Emülsiyon Banyo ve Enjeksiyon Aşıların Üretimi

4.5.1.1 *Y. ruckeri* BT1 Monovalan Emülsiyon Banyo Aşının GMP Standartlarında Üretimi

Y. ruckeri biyotip 1 Y-266 suşu TSB besiyerinde 22 °C 24 saat inkübe edildiğinde $1,7x10^9$ cfu/ml üreme gösterdi. Filtrasyonla konsantre edilen bakteri hücreleri, eşit hacimde fosfat tampon solusyonu (PBS) ile sulandırıldıktan sonra %0,5 formaldehit ilave edilerek inaktive edildi (Formaldehit uzaklaştırıldıktan sonra bakteri hücreleri TSA'da kültüre edilerek test edildi) İnaktive edilen Y-266 suşunun **1,0x10^{10} cfu/mL** nihai konsantrasyonu ile %50 oranda Montanide IMS 1312 VG adjuvan homojen şekilde karıştırılarak *Y. ruckeri* BT1 monovalan emülsiyon banyo aşı hazırlandı (Şekil 87).



Şekil 87. Üretimi yapılan *Y. ruckeri* BT1 monovalan emülsiyon banyo aşı

4.5.1.2 Y. ruckeri BT2 Monovalan Emülsiyon Banyo Aşının GMP Standartlarında Üretimi

Y. ruckeri BT2 Y-75 suşu, TSB besi yerinde 22 °C 24 saat inkübe edildiğinde 6,0x10^8 üreme gösterdi. Filtrasyonla konsantre edilen bakteri hücreleri, eşit hacimde fosfat tampon solusyonu (PBS) ile sulandırıldıktan sonra %0,5 formaldehit ilave edilerek inaktive edildi (Formaldehit uzaklaştırıldıktan sonra bakteri hücreleri TSA'da kültüre edilerek test edildi). İnaktive edilen *Y. ruckeri* BT2 Y75 suşunun 1**,0x10^{10} cfu/mL** nihai **konsantrasyonu ile** %50 oranda Montanide IMS 1312 VG adjuvan ile homojen şekilde karıştırılarak ***Y. ruckeri* BT2 monovalan emülsiyon banyo aşı** hazırlandı (Şekil 88).



Şekil 88. Üretimi yapılan *Y. ruckeri* BT2 monovalan emülsiyon banyo aşı

4.5.1.3 *Y. ruckeri* BT1-BT2 Bivalan Emülsiyon Banyo Aşının GMP Standartlarında Üretimi

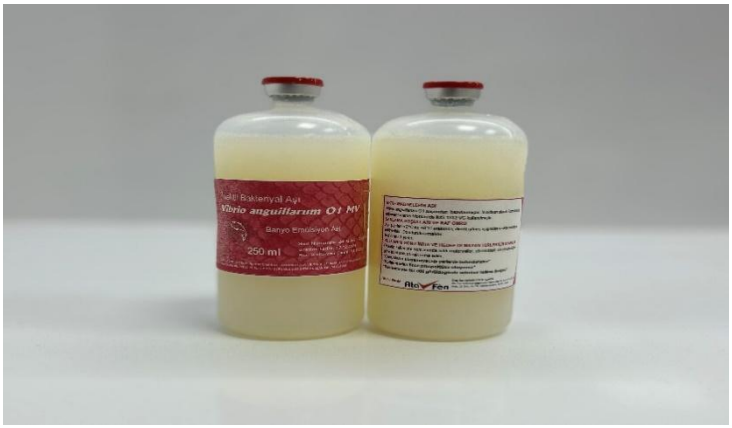
Y. ruckeri BT1 Y-266 suşu ve *Y. ruckeri* BT2 Y-75 suşu, TSB besi yerinde 22 °C 24 saat inkübe edildiğinde sırasıyla 1,7x10^9 ve 6,0x10^8 üreme gösterdi. Filtrasyonla konsantre edilen bakteri hücreleri, eşit hacimde fosfat tampon solusyonu (PBS) ile sulandırıldıktan sonra %0,5 formaldehit ilave edilerek inaktive edildi (Formaldehit uzaklaştırıldıktan sonra bakteri hücreleri TSA'da kültüre edilerek test edildi). İnaktive edilen *Y. ruckeri* BT1 Y-266 ve *Y. ruckeri* BT2 Y75 suşlarının her birinin **0,5x10^{10} cfu/mL** nihai **konsantrasyonları ile** %50 oranda Montanide IMS 1312 VG adjuvan ile homojen şekilde karıştırılarak ***Y. ruckeri* BT1 ve BT2 bivalan** aşı hazırlandı (Şekil 89).



Şekil 89. Üretimi yapılan *Y. ruckeri* BT1 ve BT2 bivalan emülsiyon banyo aşı

4.5.1.4 *V. anguillarum* Monovalan Emülsiyon Banyo Aşının GMP Standartlarında Üretimi

V. anguillarum (V21-2022) suşu %1 NaCl ilave edilmiş TSB besiyerinde 22 °C 24 saat inkübasyonda 2,0x10^9 cfu/mL üreme gösterdi Filtrasyonla konsantre edilen bakteri hücreleri, eşit hacimde fosfat tampon solusyonu (PBS) ile sulandırıldıktan sonra %0,5 formaldehit ilave edilerek inaktive edildi (Formaldehit uzaklaştırıldıktan sonra bakteri hücreleri TSA'da kültüre edilerek test edildi). İnaktive edilen ***V. anguillarum*** **O1** (V21) suşu 1,0x10^9 cfu/mL konsantrasyonda üretilerek %50 oranda Montanide IMS 1312 VG adjuvan ile homojen bir şekilde karıştılarak ***V. anguillarum*** **O1** monovalan banyo emülsiyon aşı hazırlandı (Şekil 90).



Şekil 90. Üretimi yapılan *V. anguillarum* O1 monovalan emülsiyon banyo aşı

4.5.1.5 L. garvieae Emülsion Enjeksiyon Aşının GMP Standartlarında Üretimi

L. garvieae (ÖS-37) suşu TSB besiyerinde 22 °C 30 saat inkübasyonda 5,0x10^8 cfu/mL üreme gösterdi. Filtrasyonla konsantre edilen bakteri hücreleri, eşit hacimde fosfat tampon solusyonu (PBS) ile sulandırıldıktan sonra %0,5 formaldehit ilave edilerek inaktive edildi (Formaldehit uzaklaştırıldıktan sonra bakteri hücreleri TSA'da kültüre edilerek test edildi). İnaktive edilen *L. garvieae* (ÖS-37) suşu 1,0x10^9 cfu/mL **konsantrasyonu, %**70 oranda Montanid ISA-763 A (W/O) adjuvan ile homojen bir şekilde karıştırılarak **hazırlandı** (Şekil 91).



Şekil 91. Üretimi yapılan *L. garvieae* monovalan emülsiyon enjeksiyon aşı

4.5.1.6 L. petauri Emülsion Enjeksiyon Aşının GMP Standartlarında Üretimi

L. petauri L-152 suşu TSB besiyerinde 22 °C 24 saat inkübasyonda 1,3x10^9 cfu/mL üreme gösterdi. Filtrasyonla konsantre edilen bakteri hücreleri, eşit hacimde fosfat tampon solusyonu (PBS) ile sulandırıldıktan sonra %0,5 formaldehit ilave edilerek inaktive edildi (Formaldehit uzaklaştırıldıktan sonra bakteri hücreleri TSA'da kültüre edilerek test edildi). İnaktive edilen *L. petauri* L-152 suşu 1,0x10^9 cfu/mL **konsantrasyonda %**70 oranda Montanid ISA-763 A (W/O) adjuvan ile homojen bir şekilde karıştırılarak **hazırlandı** (Şekil 92).



Şekil 92. Üretimi yapılan 2. seri *L. petauri* monovalan emülsiyon enjeksiyon aşı

4.5.1.7 Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşının GMP Standartlarında Üretimi

Y. ruckeri BT1, *Y.ruckeri* BT2*, V. anguillarum*, *L. garvieae* ve *L. petauri* etkenleri 7.1.'de belirtidiği şekilde GMP standartlarına uygun olarak üretildi. Hedeflenen konsantrasyonlarda üretimi ve gerekli kontrolleri yapılan bu etkenlerden kombine enjeksiyon emülsiyon aşı hazırlanmasında kullanılan formulasyona ilişkin bilgiler Tablo 49'da, üretimi yapılan kombine emülsiyon enjeksiyon aşının fotoğrafı ise Şekil 93 verildii.

Tablo 49. Enjeksiyon emülsiyon kombine aşıda kullanılan bakteri suşları ve bu suşların aşı formulasyon bilgileri

Bakteri türü	Bakteri Konsantrasyonu (cfu/mL)	Kullanılan Adjuvan/ Aşıdaki Oranı (%)
Y. ruckeri O1 BT1	$0,5x10^{10}$	Montanid ISA-763 A (W/O) / %70
Y. ruckeri O1 BT2	$0,5x10^{10}$	
V. anguillarum O1	$1,0x10^{10}$	
L. garvieae	$1,0x10^{9}$	
L. petauri	$1,0\ x10^{9}$	



Şekil 93. Proje kapsamında üretimi yapılan ve güvenlik testinden geçen Kombine (pentavalan) emülsiyon enjeksiyon aşı

4.5.2 Aşılarda Sterilite Kontrolü

Sterilite Testi, "European Pharmacopoeia 11.0 01/2014:20601 Biological Tests 2.6.1-Sterility" referansında belirtilen Sterilite testleriyle uygunluk gösterir. Üretim basamaklarında meydana gelebilecek herhangi bir kontaminasyonu tespit etmek amacıyla uygulanır. Bu amaçla aerobik ve anaerobik bakterileri tespiti için, Sıvı Thioglycollate Medium ve aerobik bakterilerle birlikte fungusların tespiti için Soya-Bean Casein Digest Broth kullanıldı. Söz konusu besiyerleri imalatçı firmanın tavsiyesi doğrultusunda hazırlandı ve sterilize edildi Sterilize edilen besiyerleri 22 ve 37°C'de 24 saat inkube edilerek, sterilite kontrollerinden geçirildi. Sterilite kontrolünden başarıyla geçen aşılar çalışmada kullanıldı.

20 ml Sıvı Thioglycollate Besiyeri ve 20 ml Soybean Casein Digest Besiyeri içeren birer adet tüpe, besiyeri hacimlerinin %10'nu geçmeyecek miktarda, konsantre inaktif konsantre aşı örnekleri (bulk ürün) inokule edildi. İnokulasyon sonrası, Sıvı Thioglycollate Besiyerleri içeren tüp, 22 ve 35 ^{o}C'de; Soybean Casein Digest Besiyeri içeren tüp ise, 22 ve 35 ^{o}C'de aerobik koşullar altında, 14 gün süreyle inkube edildi. İnkubasyon süreleri sonunda, söz konusu besiyerlerinde, herhangi bir mikrobiyal üreme olmaması, üretimi yapılan aşıların steril

olduğunu gösterdi.

4.5.3 İnaktif Aşılarda Güvenlik (Zararsızlık) Deneyleri

Steril TSB kontrol olmak üzere, banyo ve enjeksiyon aşılardan alınan örneklerde güvenlik deneyleri yapıldı. Güvenlik deneylerinde tüm balık gruplarına inaktif banyo aşılar iki kat dozda (1/5 oranında sulandırılarak, banyo aşılar normal olarak aşılamada 1/10 sulandırılarak kullanılmaktadır) önerilen süreden iki kat daha fazla süre (120 sn) muamele edilerek; enjeksiyon aşılar ise 0,1 ml periton içi inokule edilerek uygulandı Kontrol grubu balıklar steril PBS (Tamponlanmış Fosfat Solüsyonu 0,1 mL) ile aynı şekilde teste tabi tutuldu. Balıklar deneme tankları içerisinde 21 gün boyunca izlendi (European Pharmacopoeıa 11.0. 01 2022). Enjeksiyon aşılarda enjeksiyondan 24 saat ve 21 gün sonra 20'şer balığa otopsi yapıldı (emülsiyon enjeksiyon aşılarda kullanılan adjuvan nedeniyle oluşabilecek lokal reaksiyonların değerlendirilmesi). Otopsi bulgularının değerlendirilmesinde Speilberg skorlama yöntemi kullanıldı. Güvenlik testleri deney planı Tablo 50'de sunuldu.

Tablo 50. Banyo ve enjeksiyon emülsiyon aşıların güvenlik deneyleri deney planı

Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı (gram)	Balık Sayısı		Deney Süresi (gün)	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
Y.ruckeri BT1 Banyo aşı**	Alabalık	Banyo	10	50 +50	50	21	2
Y.ruckeri BT2 Banyo aşı**	Alabalık	Banyo	10	50 +50	50	21	2
Y.ruckeri BT1-BT2 Banyo aşı**	Alabalık	Banyo	10	50 +50	50	21	2
V. anguillarum O1 Banyo aşı **	Alabalık	Banyo	10	50 +50	50	21	2
L. garvieae Enjeksiyon aşı***	Alabalık	Enjeksiyon	15	70+70	70	21	2
L. petauri Enjeksiyon aşı***	Alabalık	Enjeksiyon	15	70+70	70	21	2
Kombine Enjeksiyon aşı***	Alabalık	Enjeksiyon	15	70+70	70	21	2
Değerlendirme ve Sonuç	*:Deney gruplarında deneme iki tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmadı. **: Banyo aşıların güvenlik testleri için balıklar belirtilen doz ve sürede aşı uygulamasına maruz bırakıldıktan sonra 50 balık 21 gün süreyle izlendi.. ***: Enjeksiyon (peritoniçi) yöntemi ile aşı uygulandıktan sonra 50 balık güvenlik testi için izlendi. Enjeksiyon aşı uygulamasından 24 saat sonra 20 balığa lokal reaksiyonların değerlendirilmesi için otopsi yapıldı. Geriye kalan 50 balıktan 21 gün süreyle izlendi.						

Aşı güvenlik deneylerinde toplam 1230 balık kullanıldı ve balıklarda deney süresince bir ölüm gözlenmedi. Otopsi yapılan aşılı balıkların tamanına aşı uygulanmış olmasına rağmen anormal bir lokal reaksiyon görülmedi.

Sonuç olarak İP 7 kapsamında proje hedeflerine uygun olarak GMP standartlarında monovalan/bivalan emülsiyon banyo, monovalan emülsiyon enjeksiyon ve kombine emülsiyon enjeksiyon aşların (toplam 7 aşı) üretimleri 11.09.2024 tarihinde, aşıların güvenlik deneyleri ise 27.11.2024 tarihinde tamamlanmıştır. Böylece bu iş paketinde %100 başarıya ulaşılmıştır. Güvenlik deneylerinden geçen 1.Seri aşılar 12.09. 2024 (Şekil 94) ve 2. seri aşılar (Şekil 95) ise 12.12.2024 tarihinde üretilmiştir.



Şekil 94. Proje kapsamında üretimi yapılan güvenlik deneylerinden geçen 1. seri aşılar



Şekil 95. Proje kapsamında üretimi yapılan 2. seri aşılar

4.5.4 Prototip Aşıların (PA) Laboratuvar ve Saha Etkinliklerinin Belirlenmesi

Bu proje kapsamında geliştirilen monovalan, bivalan ve pentavalan formülasyonlara sahip banyo ve enjeksiyon yolu ile uygulanan inaktif emülsiyon aşıların etkinlik düzeyleri, kontrollü laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen eprüvasyon deneyleriyle değerlendirilmiştir. Aşıların

spesifik koruyuculuğunu ölçmek amacıyla hazırlanan deney düzenekleri, Tablo 51-59'da detaylandırılmıştır.

Etkinlik testlerinde kullanılan her aşı grubunda, farklı balık grupları üçer tekrarla değerlendirilmiş olup, her gruba ait günlük mortalite verileri 21 günlük gözlem süresi boyunca kayıt altına alınmıştır. Aşılı ve kontrol gruplarındaki toplam ölümler esas alınarak hesaplanan ortalama mortalite oranlarına göre, her bir aşının Relatif Koruma Oranı (Relative Percent Survival, RPS) ve Kaplan-Meier Sağ Kalım Analizi grafiği sonuçları (Şekil 96-102, Tablo 51-59) verilmiştir.

Tablo 51. Monovalan (M) ve Bivalan (B) Banyo Emülsiyon (BE) ile Enjeksiyon Emülsiyon (EE) Aşılarının Etkinlik Denemelerinde Kullanılan Balık Grupları ve Birey Sayıları

Aşı/Eprüvasyon Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı (gram)	Balık Sayısı		Deney Süresi (gün)	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
MBE *Y. ruckeri* Aşı/*Y. ruckeri* **O1 BT 1**	*O. mykiss*	Banyo	20g	38+38+38	45	21	3
MBE *Y. ruckeri* Aşı/ *Y. ruckeri* **O1 BT 2**	*O. mykiss*	Banyo	20g	38+38+38	45	21	3
BBE *Y. ruckeri* Aşı/*Y. ruckeri* **O1 BT 1**	*O. mykiss*	Banyo	20g	38+38+38	45	21	3
BBE *Y. ruckeri* Aşı/ *Y. ruckeri* **O1 BT 2**	*O. mykiss*	Banyo	20g	38+38+38	45	21	3
MBE *V. anguillarum* Aşı/ *V. anguillarum O1*	*O. mykiss*	Banyo	20g	38+38+38	45	21	3
M.E.E *L. garvieae* Aşı/ *L. garvieae*	*O. mykiss*	Enjeksiyon	20g	38+38+38	45	21	3
M.E.E *L. petauri* Aşı/ *L. petauri*	*O. mykiss*	Enjeksiyon *	20g	38+38+38	45	21	3
Değerlendirme ve Sonuç	* :Deney gruplarında aşı deneyleri iki tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmamıştır. Banyo ve enjeksiyon aşıların etkinlik testleri için, balıklar aşı uygulamasına maruz bırakıldıktan 28 gün sonra. eprüvasyona tabi tutulacaktır. **Aşılamadan sonra 4. saat, 1, 2, 7 ve 14. günlerde her gruptan 3 balığın ön böbrek, dalak, solungaç ve orta bağırsaksalarından alınan doku örnekleri immun gen ekspresyonunun** (*EF-1α, β-actin, TLR-2, C3, IL1β, IgM, CD4-1, CD8a, IL-10, IL-8, IFNγ, IgT*) **belirlenmesinde kullanılmıştır.** Monovalan/Bivalan banyo ve enjeksiyon (peritoniçi) aşıların etkinlik testlerinde toplam 1113 balık kullanılmıştır.						

Tablo 52. *Y. ruckeri* BT1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Eprüvasyon Testi Sonuçları

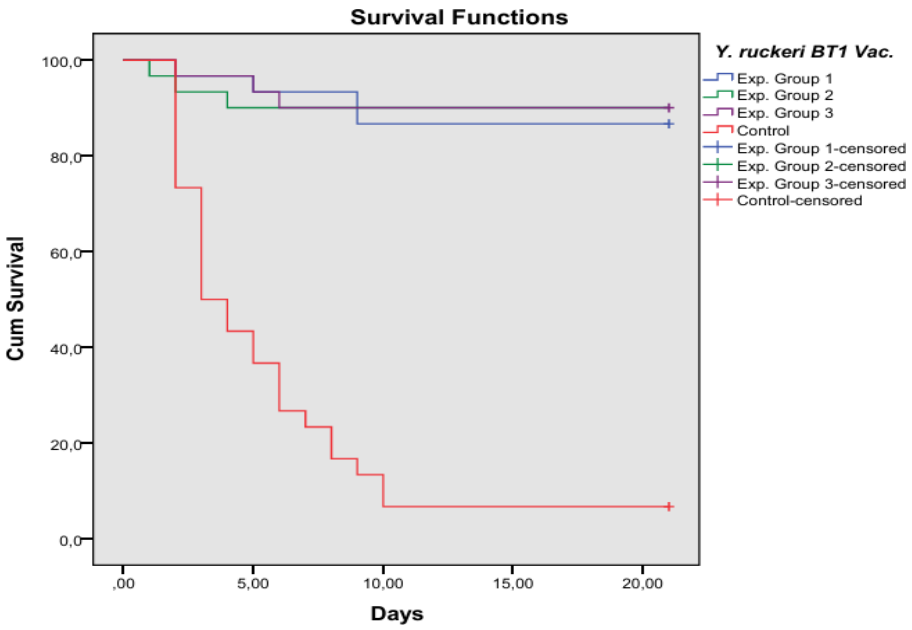
Y. ruckeri BT1 İnaktif Emülsiyon* Banyo Aşı Etkinlik Testi** ***Y. ruckeri* BT1 (Y286) *Eprüvasyon Dozu* (2,5x10^6) *Günlük Ölü Sayısı				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2**	**Deney Grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**

		(n=30)		
1	0	1	0	0
2	1	1	1	8
3	0	0	0	7
4	0	1	0	2
5	1	0	1	2
6	0	0	1	3
7	0	0	0	1
8	0	0	0	2
9	2	0	0	1
10	0	0	0	2
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
Toplam Mortalite	4	3	3	28

Kısaltma: BT: Biyotip; n: Deney gruplarındaki balık sayısı

4.5.4.1 *Y. ruckeri* BT1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Heterolog *Y. ruckeri* BT1 Suşuna Karşı Etkinliğinin RPS (Relative Percent Survival) ve Kaplan- Meier Sağ Kalım Analiz ile Değerlendirilmesi

- *Y. ruckeri* BT1 inaktif emülsiyon banyo aşısı için hesaplanan relatif yüzde sağkalım (RPS) değeri %88 ± 1 olarak belirlenmiştir.
- Aşının etkinliğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen eprüvasyon denemeleri sonucunda elde edilen veriler, Kaplan-Meier sağkalım analizi ile incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre, deney grupları ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$).



Şekil 96. *Y. ruckeri* BT1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşısının heterolog *Y. ruckeri* BT1 suşu ile yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği.

Tablo 53. *Y. ruckeri* BT2 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Eprüvasyon Testi Sonuçları

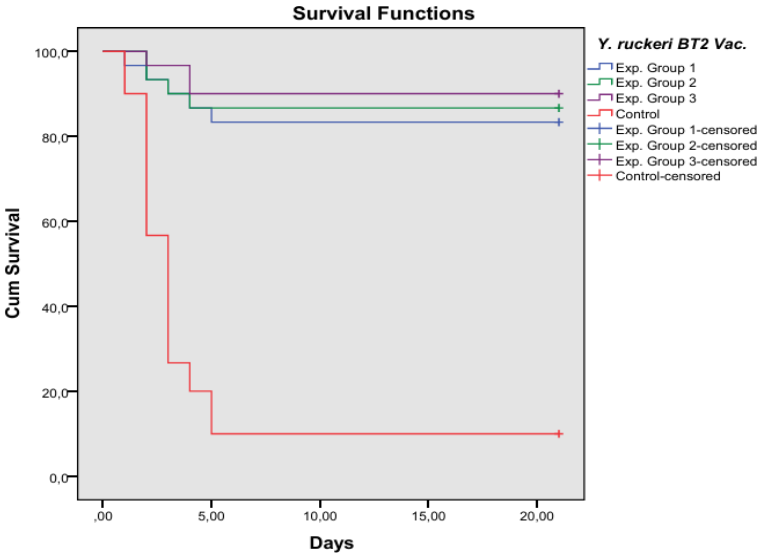
***Y. ruckeri* BT2 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşı Etkinlik Testi** ***Y. ruckeri* BT1 (Y430) Eprüvasyon Dozu (8,4x10^5) Günlük Ölü Sayısı**				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2 (n=30)**	**Deney Grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**
1	1	0	0	3
2	0	2	1	10
3	2	1	0	9
4	1	1	2	2
5	1	0	0	3
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0

15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
Toplam Mortalite	5	4	3	27

Kısaltma: BT: Biyotip ; n: Deney gruplarındaki balık sayısı

4.5.4.2 *Y. ruckeri* BT2 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Heterolog *Y. ruckeri* BT2 Şuşuna Karşı RPS (Relative Percent Survival) ve Kaplan- Meier Sağ Kalım Analiz Sonuçları

- *Y. ruckeri* BT2 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşı için relatif sağ kalım (RPS) değeri; %85 ± 1,97 olarak hesaplanmıştır
- Aşının etkinliğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen eprüvasyon denemeleri sonucunda elde edilen veriler, Kaplan-Meier sağkalım analizi ile incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre, deney grupları ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$).



Şekil 97. *Y. ruckeri* BT1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşısının heterolog *Y. ruckeri* BT1 suşu ile yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği**.**

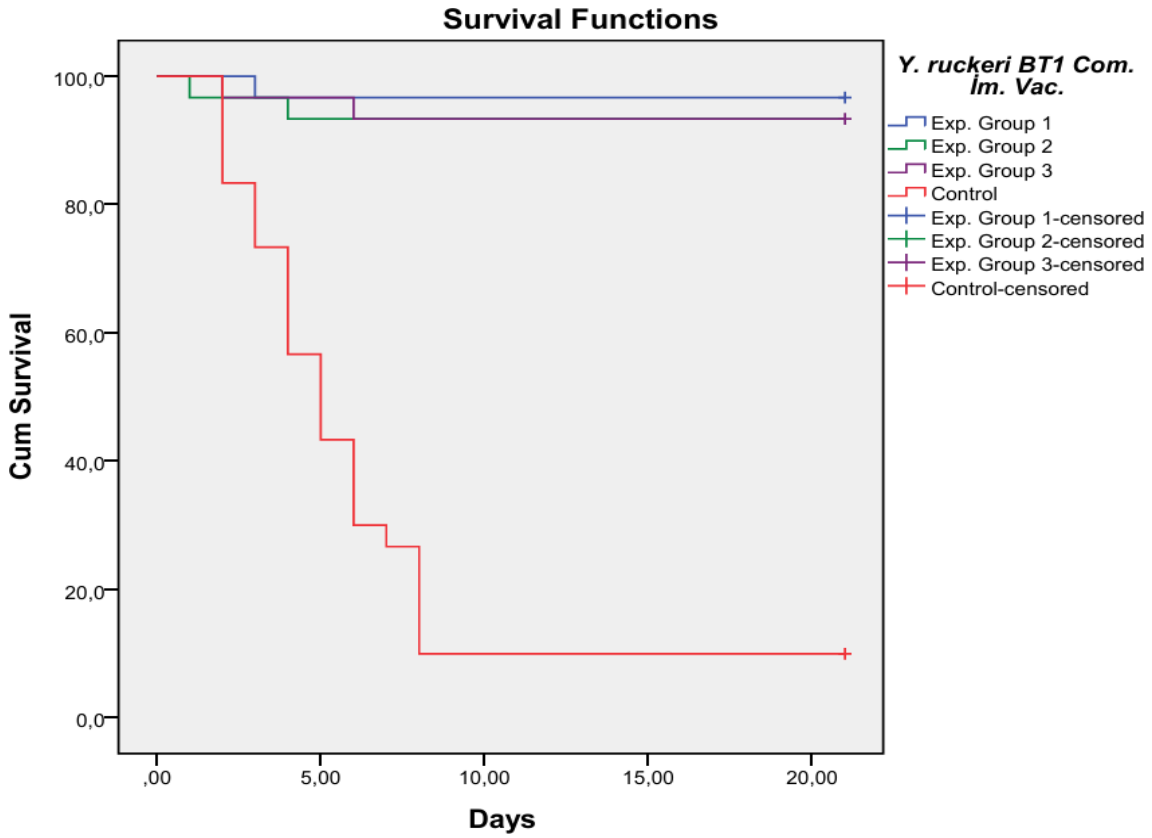
Tablo 54. *Y. ruckeri* BT1-BT2 Bivalan İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Eprüvasyon Test Sonuçları

Y. ruckeri BT1-BT2 Bivalan İnaktif Emülsiyon* Banyo Aşı Etkinlik Testi** ***Y. ruckeri* BT1 (Y286) *Eprüvasyon Dozu* (2,5x10^6) *Günlük Ölü Sayısı				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2 (n=30)**	**Deney Grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**
1	0	1	0	0
2	0	0	1	5
3	1	0	0	3
4	0	1	0	5
5	0	0	0	4
6	0	0	1	3
7	0	0	0	1
8	0	0	0	5
9	2	0	0	1
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
Toplam Mortalite	1	2	2	27

Kısaltma: BT: Biyotip; n: Deney gruplarındaki balık sayısı

4.5.4.3 *Y. ruckeri* BT1-BT2 Bivalan İnaktif Emülsiyon Banyo Aşısının Heterolog *Y. ruckeri* BT1 Suşuna Karşı RPS (Relative Percent Survival) ve Kaplan-Meier Sağkalım Analizi Sonuçları

- *Y. ruckeri* BT1-BT2 bivalan inaktif emülsiyon banyo aşısı için hesaplanan relatif yüzde sağkalım (RPS) değeri %94 ± 1 olarak belirlenmiştir.
- Eprüvasyon denemeleri sonucunda elde edilen verilere göre yapılan Kaplan-Meier sağkalım analizi sonucunda, deney grupları ile kontrol grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$).



Şekil 98. *Y. ruckeri* BT1-BT2 bivalan inaktif emülsiyon banyo aşısının heterolog *Y. ruckeri* BT1 suşu ile yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği.

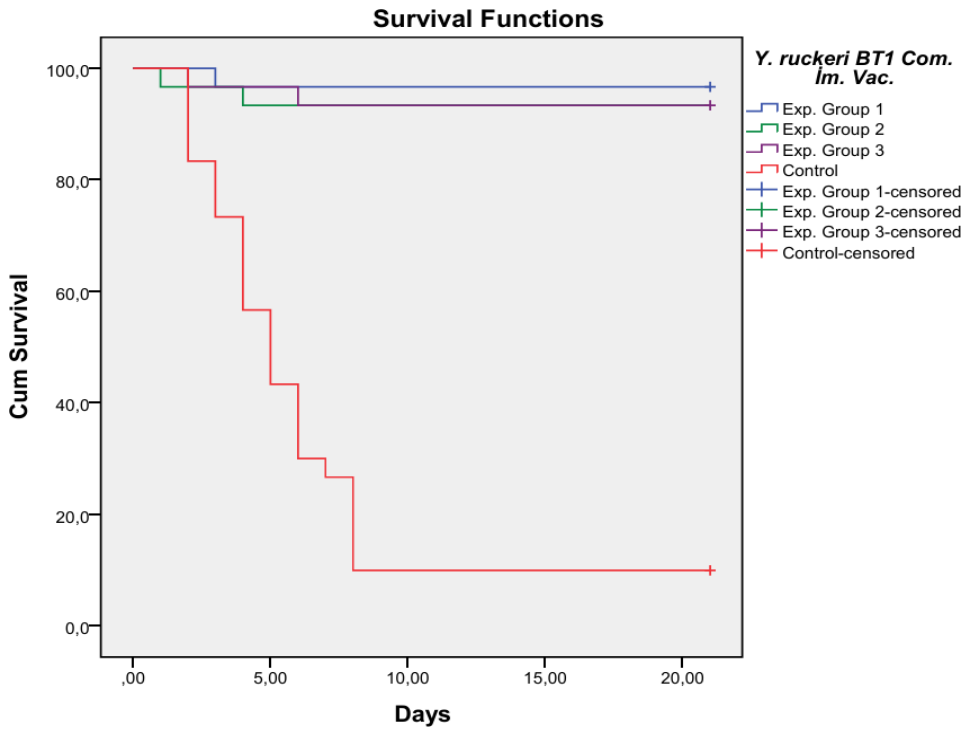
Tablo 55. *Y. ruckeri* BT1-BT2 Bivalan İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Eprüvasyon Testi Sonuçları

***Y. ruckeri* BT1-BT2 Bivalan İnaktif Emülsiyon Banyo Aşı Etkinlik Testi** ***Y. ruckeri* BT2 (Y430) Eprüvasyon Dozu (2,5x10^6) Günlük Ölü Sayısı**				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2 (n=30)**	**Deney Grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**
1	1	0	0	2
2	0	0	0	8
3	2	1	0	7
4	1	1	0	4
5	1	0	0	5
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
Toplam Mortalite	2	2	0	26

Kısaltma: BT1: Biyotip 1; n: Deney gruplarındaki balık sayısı

Şekil 96-102 *Y. ruckeri* BT1-BT2 Bivalan İnaktif Emülsiyon Banyo Aşısının Heterolog *Y. ruckeri* BT2 Suşu ile Yapılan Eprüvasyon Denemelerine Ait RPS (Relative Percent Survival) ve Kaplan-Meier Sağkalım Analizi Sonuçları

- *Y. ruckeri* BT1-BT2 bivalan inaktif emülsiyon banyo aşısı için hesaplanan relatif yüzde sağkalım (RPS) değeri %95,33 ± 2,33 olarak belirlenmiştir.
- Aşının etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılan eprüvasyon denemeleri sonucunda elde edilen verilere dayalı Kaplan-Meier sağkalım analizine göre, deney grupları ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$).



Şekil 99. *Y. ruckeri* BT1-BT2 bivalan inaktif emülsiyon banyo aşının heterolog Y.ruckeri BT2 suşu ile yapılan denemelerine ait Kaplan-Meier sağ kalım analizi grafiği.

Tablo 56. *V. anguillarum* İnaktif Emülsiyon Banyo Aşının Eprüvasyon Testi Sonuçları

***V. anguillarum* İnaktif Emülsiyon Banyo Aşı Etkinlik Testi** ***V. anguillarum* (V18) Eprüvasyon Dozu ($1,6x10^6$) Günlük Ölü Sayısı**				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2 (n=30)**	**Deney Grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**
1	0	1	0	11
2	4	4	3	10
3	1	1	0	1
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0

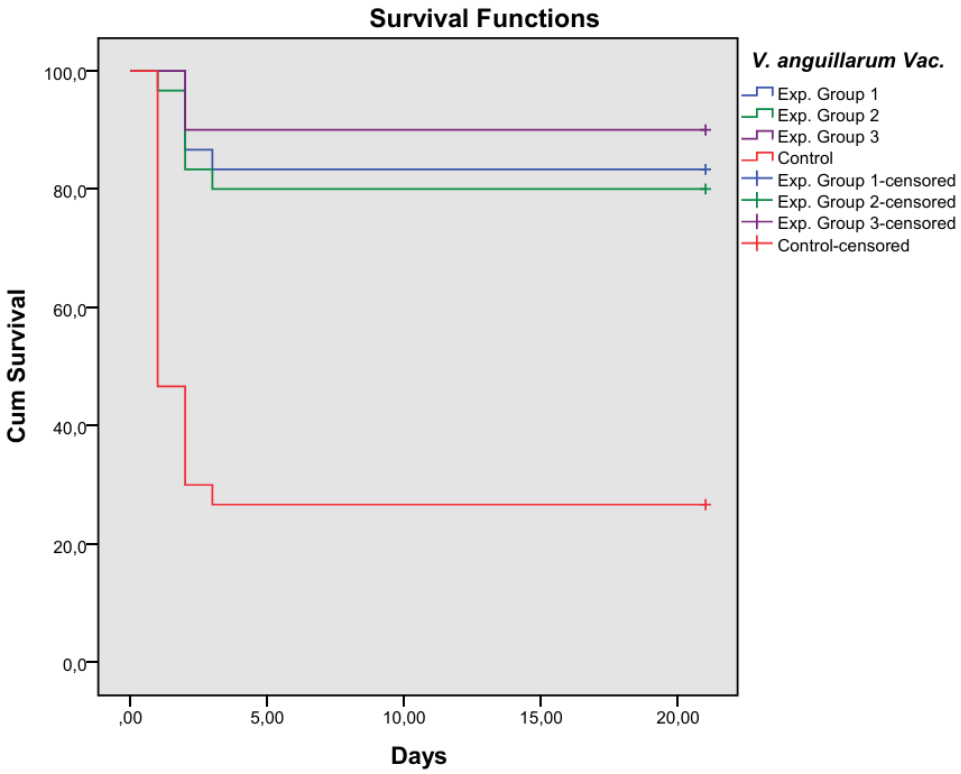
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
Toplam Mortalite	5	6	3	22

Kısaltma: n: Deney gruplarındaki balık sayısı

4.5.4.4 *V. anguillarum* İnaktif Emülsiyon Banyo Aşısının Heterolog *V. anguillarum* Suşuna Karşı RPS (Relative Percent Survival) ve Kaplan-Meier Sağkalım Analizi Sonuçları

- *V. anguillarum* inaktif emülsiyon banyo aşısı için hesaplanan relatif yüzde sağkalım (RPS) değeri %78,6 ± 4,06 olarak belirlenmiştir.
- Eprüvasyon denemeleri sonucunda elde edilen verilere dayanarak yapılan Kaplan-Meier sağkalım analizine göre, deney grupları ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$).

,



Şekil 100. *V. anguillarum* inaktif emülsiyon banyo aşının heterolog *V. anguillarum* suşuyla yapılan denemelerine ait Kaplan-Meier sağ kalım analizi grafiği.

Tablo 57. *L. petauri* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşının Eprüvasyon Test Sonuçları

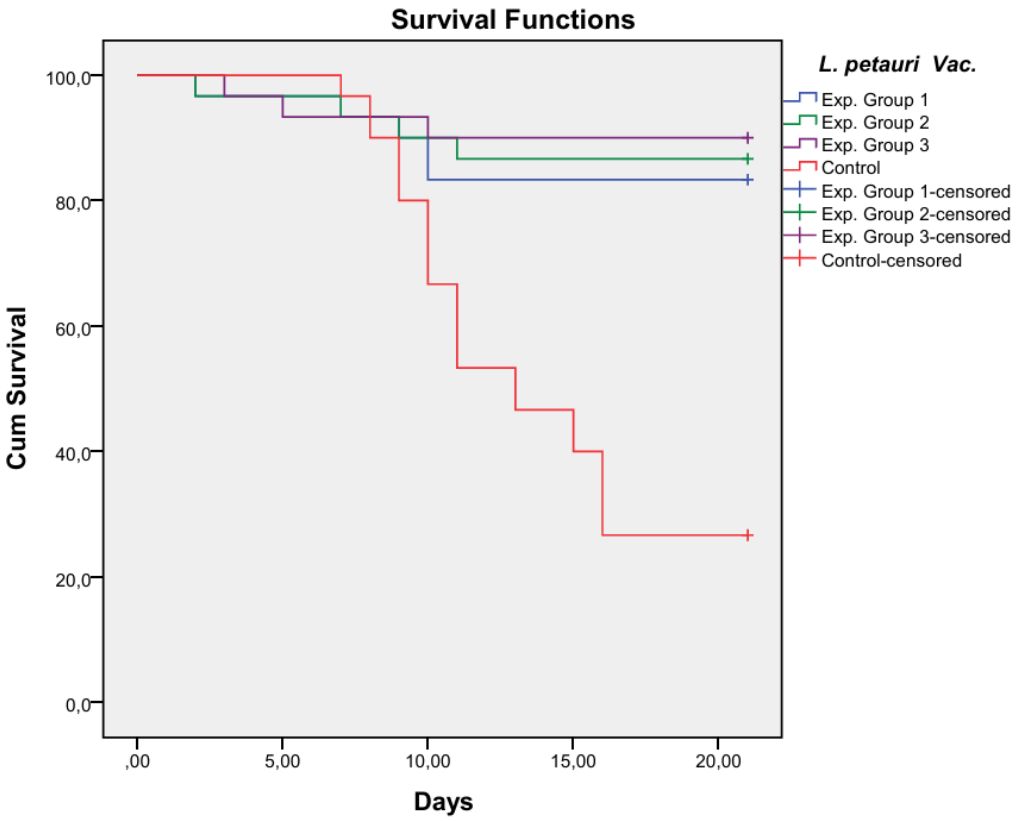
***L. petauri* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşı Etkinlik Testi** ***L. petauri* (L296) Eprüvasyon Dozu (6.7x10^6) Günlük Ölü Sayısı**				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2 (n=30)**	**Deney Grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**
1	0	0	0	0
2	1	1	0	0
3	0	1	1	0
4	0	0	0	0
5	0	0	1	0
6	0	0	0	0
7	1	1	0	1
8	0	0	0	2
9	1	1	0	3
10	2	0	1	4

11	0	1	0	4
12	0	0	0	0
13	0	0	0	2
14	0	0	0	0
15	0	0	0	2
16	0	0	0	4
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	**0**	0
Toplam Mortalite	5	4	3	22

Kısaltma: n: Deney gruplarındaki balık sayısı

4.5.4.5 *L. petauri* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşısının Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Aşının etkinliğini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen heterolog eprüvasyon denemeleri sonucunda, *L. petauri* inaktif emülsiyon enjeksiyon aşısı için hesaplanan relatif yüzde sağkalım (RPS) değeri **%82 ± 2,31** olarak belirlenmiştir. Deney gruplarından elde edilen sağkalım verileri Kaplan-Meier analizi ile değerlendirilmiş ve aşılı gruplar ile kontrol grupları arasındaki farkın **istatistiksel olarak anlamlı** olduğu tespit edilmiştir (**$p < 0,001$**).



Şekil 101. *L. petauri* inaktif emülsiyon enjeksiyon banyo aşının heterolog *L. petauri* suşu ile yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier sağ kalım analizi grafiği

Tablo 58. *L. garvieae* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşının Eprüvasyon Testi Sonuçları

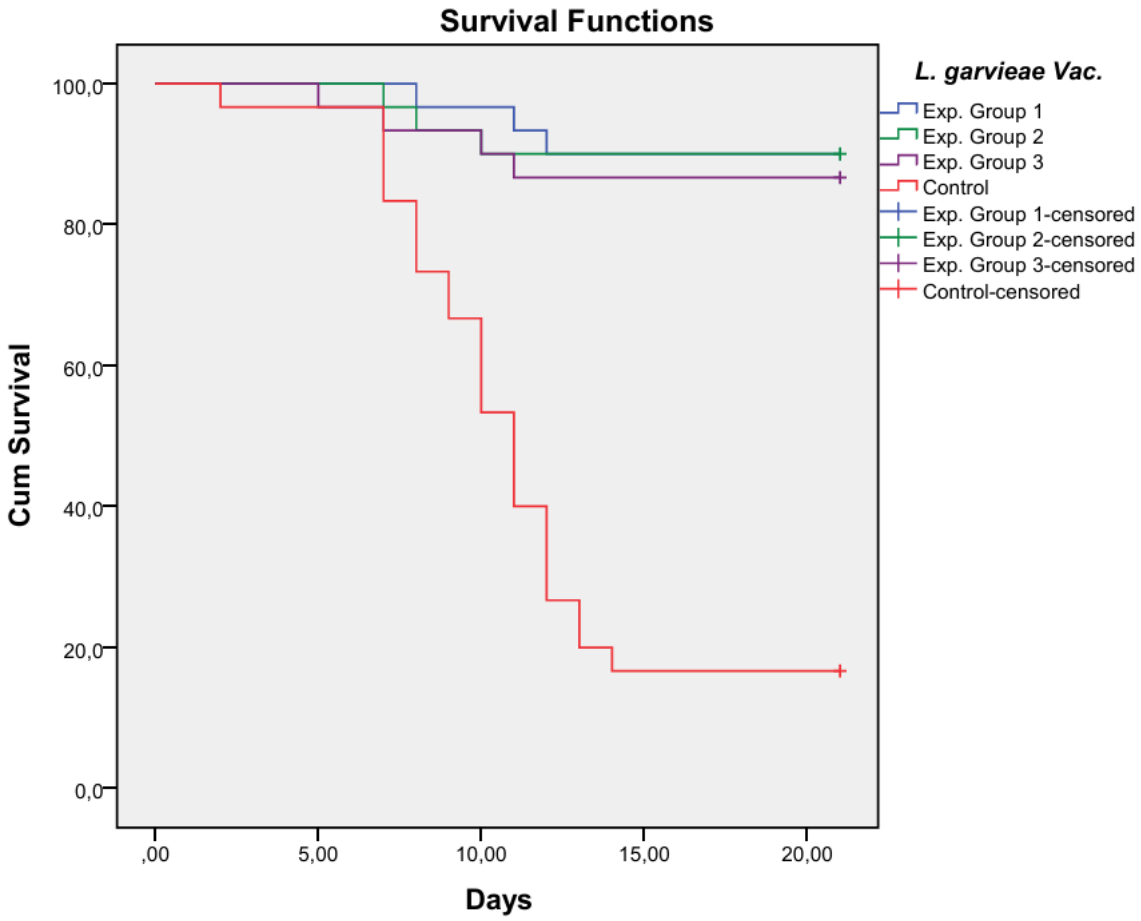
***L. garvieae* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşı Etkinlik Testi** ***L. garvieae* (L67) Eprüvasyon Dozu ($8,8x10^5$) Günlük Ölü Sayısı**				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2 (n=30)**	**Deney Grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**
1	0	0	0	0
2	0	0	0	1
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	1	0	1	0
6	0	0	0	0
7	0	1	1	4
8	1	1	0	3
9	0	0	0	2
10	0	1	1	4

11	1	0	1	4
12	1	0	0	4
13	0	0	0	2
14	0	0	0	1
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
Toplam Mortalite	3	3	**4**	**25**

Kısaltma: n: Deney gruplarındaki balık sayısı

4.5.4.6 *L. garvieae* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşının Heterolog *L. garvieae* Suşu ile Yapılan Etkinlik Denemelerine Ait RPS (Relative Percent Survival) ve Sağ Kalım Değerleri

L. garvieae inaktif emülsiyon enjeksiyon aşısının etkinliğini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen eprüvasyon denemeleri sonucunda, hesaplanan relatif yüzde sağkalım (RPS) değeri **%86,6 ± 1,30** olarak tespit edilmiştir. Sağkalım verilerinin Kaplan-Meier analizi ile değerlendirilmesi sonucunda, deney grupları ile kontrol grupları arasındaki farkın **istatistiksel olarak anlamlı** olduğu belirlenmiştir (**$p < 0,001$**).



Şekil 102. *L. garvieae* inaktif emülsiyon enjeksiyon aşısının heterolog *L. garvieae* suşu ile yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği.

Tablo 59. Kombine emülsiyon enjeksiyon (KEE) aşıların etkinlik deneylerinde kullanılan balık grupları ve birey sayıları

Aşı/Eprüvasyon Deney Grupları	Tür	Uygulama Yolu	Balık Ağırlığı (gram)	Balık Sayısı		Deney Süresi (gün)	Tekrar sayısı
				Deney*	Kontrol		
Kombine Aşı/*Y. ruckeri* O1 BT 1	*O. mykiss*	Banyo	20g	38+38+38	45	21	3
Kombine Aşı / *Y. ruckeri* O1 BT 2	*O. mykiss*	Banyo	20g	38+38+38	45	21	3
Kombine Aşı/ *V. anguillarum* O1	*O. mykiss*	Banyo	20g	38+38+38	45	21	3
Kombine Aşı/ *L. garvieae*	*O. mykiss*	Enjeksiyon	20g	38+38+38	45	21	3
Kombine Aşı/ *L. petauri*	*O. mykiss*	Enjeksiyon	20g	38+38+38	45	21	3
Değerlendirme ve Sonuç	* :Deney gruplarında aşı deneyleri iki tekrar yapılırken, kontrol grubunda tekerrür kullanılmayacaktır. Kombine emülsiyon enjeksiyon aşıların etkinlik testlerinde kullanılan balıklar, aşılamadan 28 gün sonra. eprüvasyona tabi tutulacaktır. **Aşılamadan sonra 4.saat, 1, 2, 7 ve 14. günlerde her gruptan 3 balığın ön böbrek, dalak, solungaç ve orta bağırsaksalarından alınan doku örnekleri immun gen ekspresyonunun** (*EF-1α, β-actin, TLR-2, C3, IL1β, IgM, CD4-1, CD8a, IL-10, IL-8, IFNγ, IgT*) **belirlenmesinde kullanılacaktır** Kombine emülsiyom enjeksiyon (peritoniçi) aşıların etkinlik testleri için balıklar aşı uygulamasına maruz bırakıldıktan 28 gün sonra. eprüvasyona tabi tutulacaktır, enjeksiyon aşıların denemelerinde **toplam 795 balık kullanılacaktır.**							

4.5.4.7 İnaktif Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşısının Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Beşli kombine inaktif emülsiyon enjeksiyon aşısının farklı balık patojenlerine karşı etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan eprüvasyon denemeleri sonucunda, relatif yüzde sağkalım (RPS) değerleri ve sağkalım analizleri aşağıda sunulmuştur (Tablo 60-64):

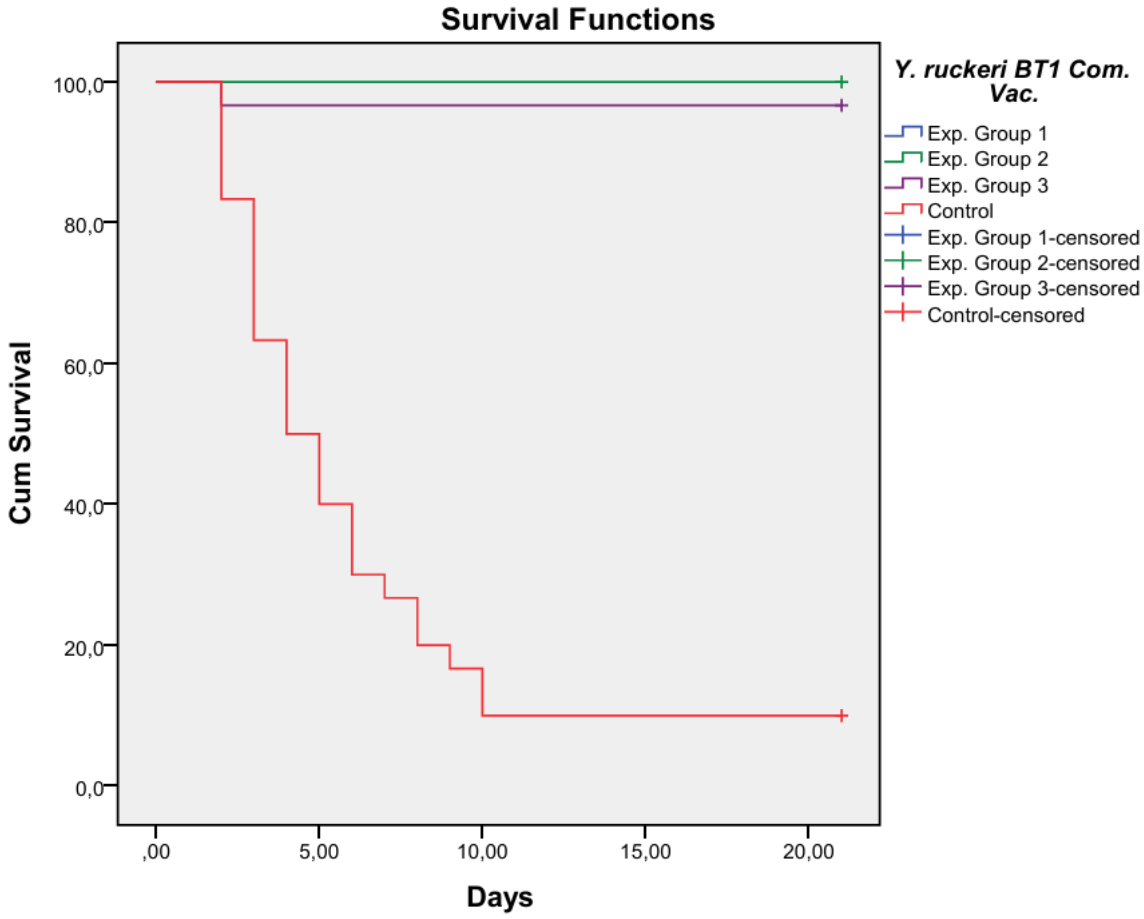
Tablo 60. İnaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *Y. ruckeri* BT1 Suşuna karşı etkinliği

Beşli Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı *Y. ruckeri* BT1 (Y286) Eprüvasyon Dozu (2,5x10^6) **Günlük Ölü Sayısı**				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2 (n=30)**	**Deney Grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**
1	0	0	0	0
2	0	0	1	5
3	0	0	0	6
4	0	0	0	4
5	0	0	0	3
6	0	0	0	3
7	0	0	0	1
8	0	0	0	2
9	0	0	0	1
10	0	0	0	2
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
Toplam Mortalite	0	0	1	27

Kısaltma: n: Deney gruplarındaki balık sayısı

Beşli kombine aşının *Y. ruckeri* BT1 suşuna karşı yapılan eprüvasyon denemesinde, hesaplanan RPS değeri **%99,6 ± 0,40** olarak belirlenmiştir. Kaplan-Meier sağkalım analizi

(Şekil 103, 104) sonuçlarına göre, deney grupları ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**p < 0**,001**).**



Şekil 103. Beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *Y. ruckeri* BT1 suşuyla yapılan eprüvasyon denemelerine ait Kaplan-Meier Sağ Kalım Analiz grafiği

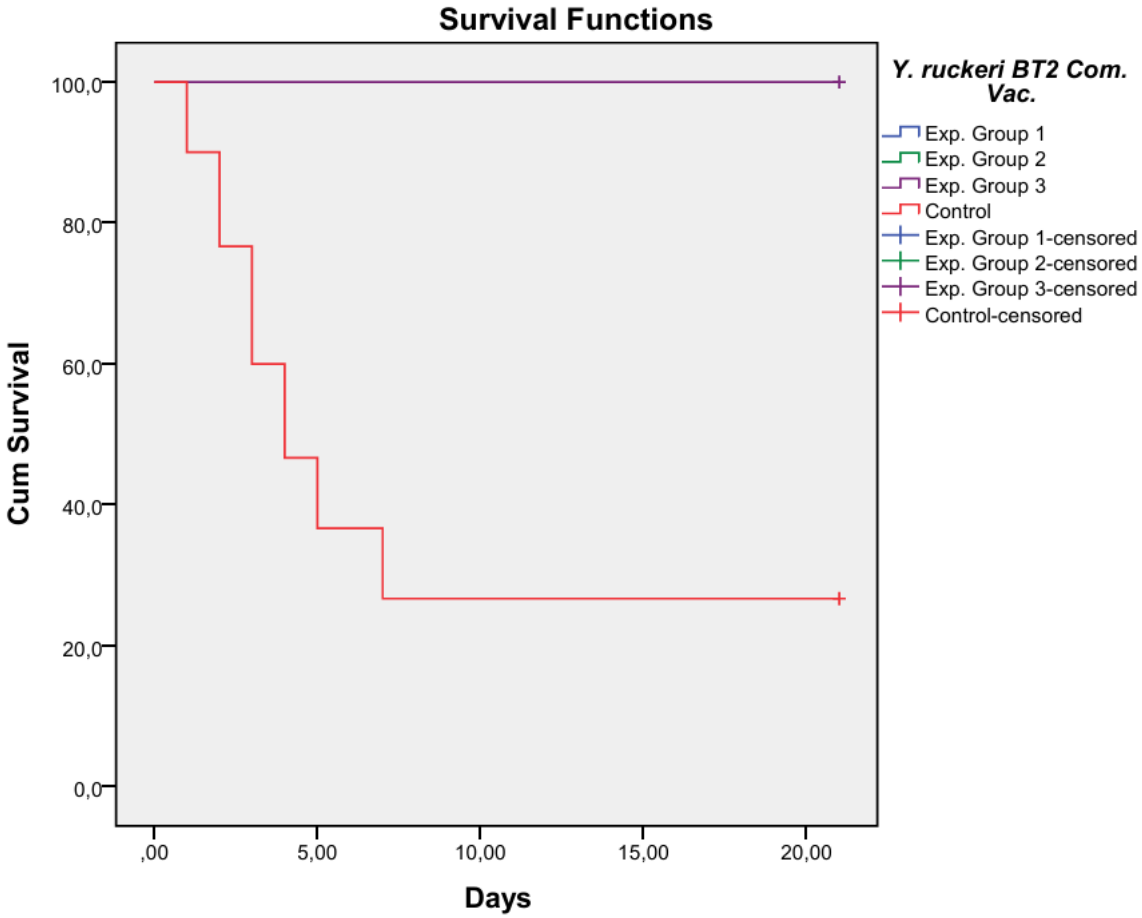
Tablo 61. İnaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *Y. ruckeri* BT2 suşuna karşı etkinliği

Beşli Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı *Y. ruckeri* BT2 (Y430) Eprüvasyon ($8,4x10^5$) Dozu Günlük Ölü Sayısı				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2 (n=30)**	**Deney Grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**
1	0	0	0	3
2	0	0	0	4
3	0	0	0	5

4	0	0	0	4
5	0	0	0	3
6	0	0	0	0
7	0	0	0	3
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
Toplam Mortalite	0	0	0	22

Kısaltma: n: Deney gruplarındaki balık sayısı

Beşli kombine aşı için *Y. ruckeri* BT2 suşuna karşı hesaplanan RPS değeri **%100 ± 0** olarak tespit edilmiştir. Kaplan-Meier analizine göre (Şekil 104-106) deney ve kontrol grupları arasında anlamlı fark gözlenmiştir (**p < 0,001**).



Şekil 104. Beşli Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşısının *Y. ruckeri* BT2 suşuna karşı yapılan eprüvasyon denemesine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği.

Tablo 62. İnaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *Y. ruckeri* suşuna karşı etkinliği

Beşli İnaktif Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı Etkinlik Testi *V. anguillarum* (V18) Eprüvasyon Dozu (1,6x10^6) Günlük Ölü Sayısı				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2 (n=30)**	**Deney Grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**
1	0	0	1	11
2	1	1	1	10
3	1	1	**1**	1
4	0	2	0	2
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0

8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
Toplam Mortalite	2	4	3	24

Kısaltma: n: Deney gruplarındaki balık sayısı

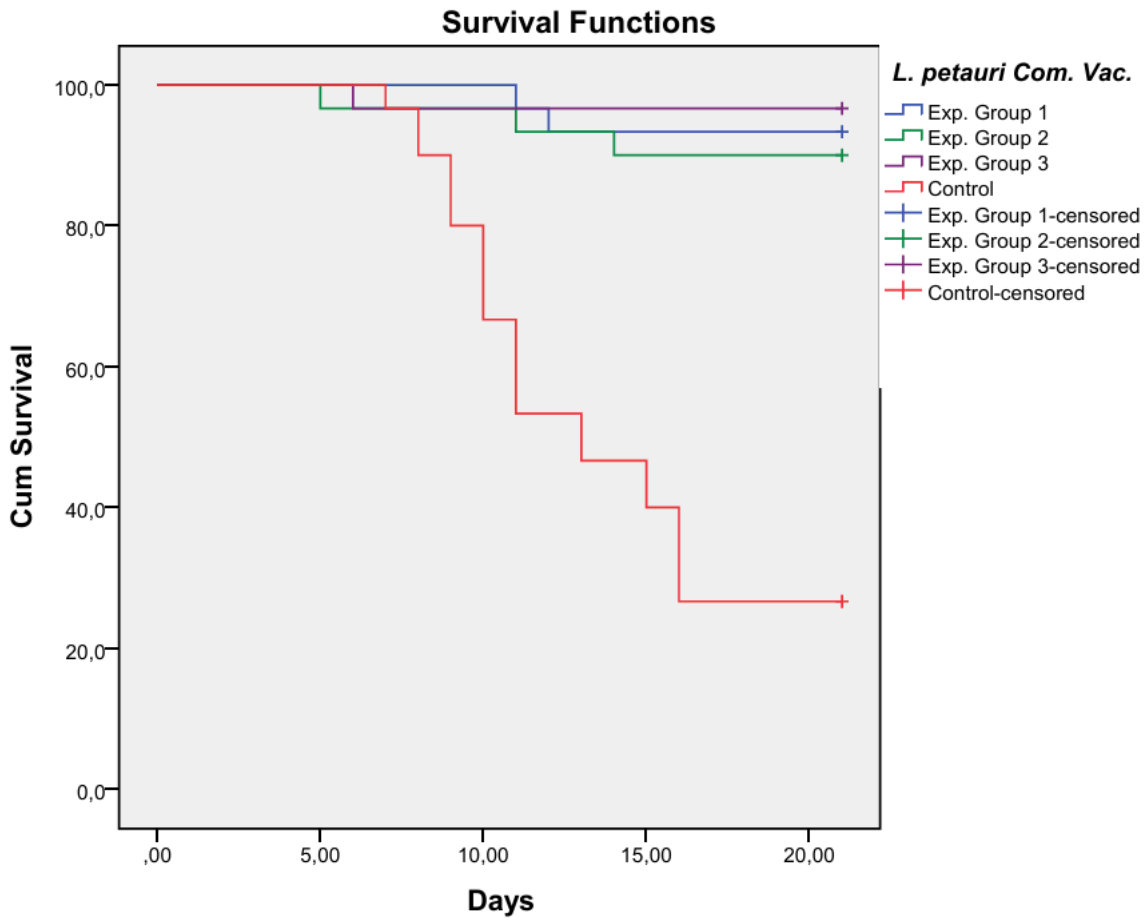
Aşının *V. anguillarum* suşuna karşı yapılan eprüvasyon denemesinde, RPS değeri **%87,92 ± 2,53** olarak hesaplanmıştır. Kaplan-Meier sağkalım analizi sonuçları (Şekil 105) istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (**$p < 0,001$**).

Tablo 63. İnaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *L. petauri* suşuna karşı etkinliği

Beşli İnaktif Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı Etkinlik Test *L. petauri* **(L296) Eprüvasyon Dozu (6.7x10^6) Günlük Ölü Sayısı**				
Gün	**Deney Grubu 1 (n=30)**	**Deney Grubu 2 (n=30)**	**Deney grubu 3 (n=30)**	**Kontrol (n=30)**
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	1	0	0
6	0	0	1	0
7	0	0	0	1
8	0	0	0	2
9	0	0	0	3
10	0	0	0	4
11	1	1	0	4
12	1	0	0	0
13	0	0	0	2
14	0	1	0	0
15	0	0	0	2
16	0	0	0	4
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	**0**	0
Toplam Mortalite	2	3	**1**	22

Kısaltma: n: Deney gruplarındaki balık sayısı

L. petauri suşuna karşı yapılan denemede, aşının RPS değeri **%91,17 ± 2,84** olarak belirlenmiştir. Sağkalım analizi (8.2.4) sonuçlarına göre, deney ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmaktadır (**p < 0,001**).



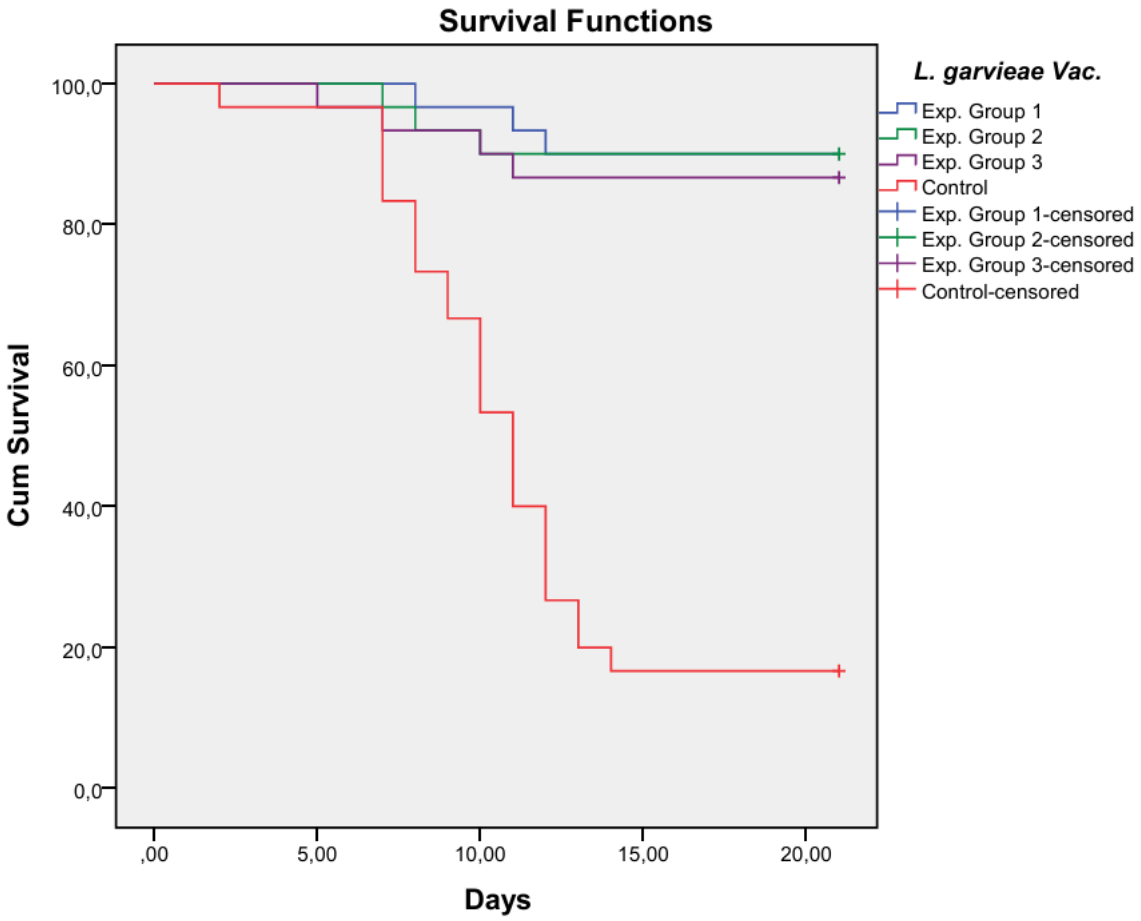
Şekil 105. Beşli Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşısının heterolog *L. petauri* suşuna karşı etkinliği.

Tablo 64. İnaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının heterolog *L. garvieae* suşuna karşı etkinliği

Beşli İnaktif Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı Etkinlik Test (L67) Eprüvasyon Dozu (8,8x10^5) Günlük Ölü Sayısı				***L. garvieae***
Gün	**Deney Grubu 1**	**Deney Grubu 2**	**Deney Grubu 3**	**Kontrol**
1	0	0	0	0
2	0	0	0	1
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	1	1	0
7	0	0	1	4

8	0	0	0	3
9	1	2	0	2
10	1	0	0	4
11	0	1	0	4
12	0	0	0	4
13	0	0	0	2
14	0	0	0	1
15	0	0	0	0
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	**0**	**0**
Toplam Mortalite	2	4	2	25

L. garvieae suşuna karşı hesaplanan RPS değeri %89,80 ± 2,90 olarak belirlenmiştir. Kaplan-Meier sağkalım analizine (8.2.5.) göre, deney grupları ile kontrol grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$).



Şekil 106. Beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşısının *Y. ruckeri* BT1 suşuna karşı yapılan eprüvasyon denemesine ait Kaplan-Meier sağkalım analizi grafiği.

4.6 Prototip Aşı/Aşılar Saha Çalışmaları Sonuç Raporu

Bu bölümde, proje kapsamında geliştirilen yerli **inaktif beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşının** (YLV5 ICIEV), **saha koşullarındaki etkinliği**, iki farklı gökkuşağı alabalığı işletmesinde yürütülen uygulamalı denemelerle değerlendirilmiştir. Aşı uygulamaları sonrası **kümülatif mortalite, sağkalım oranı ve RPS (Göreceli Sağ Kalım Yüzdesi)** analizleri gerçekleştirilmiş ve yerli aşı ile karşılaştırmalı veriler elde edilmiştir.

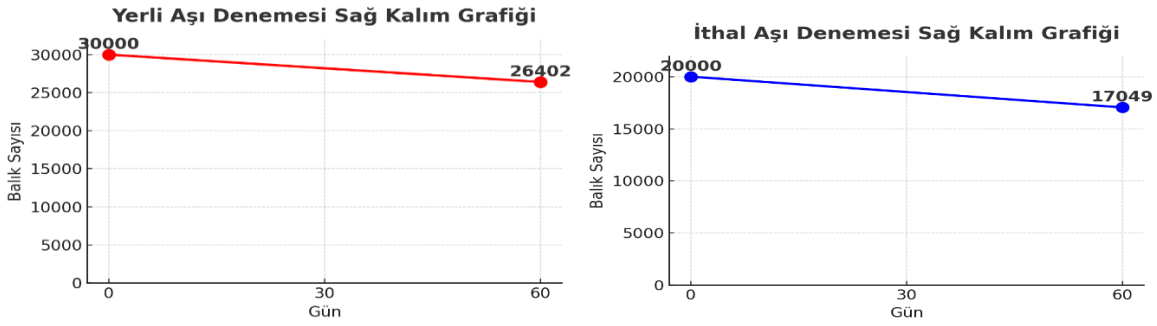
Bu bölümde, proje kapsamında **geliştirilen inaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşının saha etkinlik değerlendirmesi,** aşısının saha koşullarındaki etkinliği, pilot işletme olarak belirlenen iki farklı gökkuşağı alabalığı işletmesinde gerçekleştirilen uygulamalı saha denemeleri ile değerlendirilmiştir. Aşı uygulamaları sonrası kümülatif mortalite, sağkalım oranı ve RPS (Relative Percent Survival - Göreceli Sağ Kalım Yüzdesi) analizleri yapılmış, yerli prototip aşının etkinliği ithal ticari aşılar ve aşısız kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak ortaya konmuştur. Proje kapsamında geliştirilen diğer prototipler arasında yer alan **monovalan banyo/enjeksiyon aşıları (*Y. ruckeri* O1 BT1, *Y. ruckeri* O1 BT2, *V. anguillarum* O1, *L.***

***garvieae* ve *L. petauri*)** saha etkinlik denemeleri ise, uygulama yapılması planlanan işletmelerin lojistik ve işletme programı gerekçeleriyle bu aşamada gerçekleştirilmemiştir.. Bu nedenle, saha verileri yalnızca **geliştirilmiş yerli inaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşı prototipinin** iki farklı işletmede yürütülen etkinlik çalışmalarına dayanmaktadır. İç Anadolu Bölgesi'nde yer alan A işletmesindeki (pilot işletme), yaklaşık 100 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarına geliştirilen yerli inaktif beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşısı ve ithal menşeili ticari bir enjeksiyon aşı uygulanmıştır Çalışmada toplamda 30.000 balığa yerli aşı, 20.000 balığa ise ithal aşı uygulanmıştır. Çalışma 29 Mayıs 2025 tarihinde başlatılmış ve 60 gün boyunca takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 65 ve Şekil 107'de verilmiştir.

Tablo 65. A İşletmesinde, yaklaşık 100 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarına uygulanan yerli inaktif beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV) ile ithal menşeili enjeksiyon aşının, 60 günlük izleme süresi sonunda elde edilen kümülatif mortalite ve sağ kalım oranlarının karşılaştırmalı olarak sunumu.

Aşı	**Balık Sayısı**	**Toplam Mortalite**	**Toplam Sağkalım**	**Sağkalım %**
Yerli Aşı YLV5 ICIEV	**30.000**	**3.598**	**26.402**	**%88,01**
İthal Aşı	**20.000**	**2.951**	**17.049**	**%85,25**

Elde edilen veriler doğrultusunda yerli kombine enjeksiyon aşısı uygulanan grupta sağ kalım oranı %88,01 olarak hesaplanmış, bu oran ithal aşı uygulanan gruptaki belirlenen %85,25 sağ kalım değerinden **%2,76 daha yüksek** bulunmuştur. Bu sonuç, yerli aşının sahada kullanılan ithal ticari aşılara benzer veya daha yüksek düzeyde koruyuculuk sağlayabildiğini göstermektedir. A işletmesinde yerli aşı uygulanan grupta, ithal aşıya kıyasla **%2,76 daha yüksek sağ kalım oranı** tespit edilmiştir. Bu durum, yerli aşının sahadaki enfeksiyon baskısına karşı etkin bir koruma sağladığını göstermektedir.



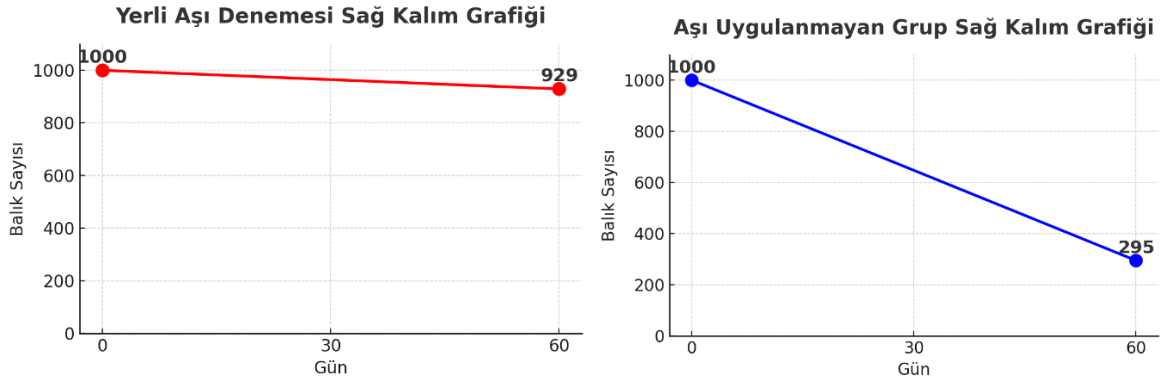
Şekil 107. A İşletmesinde, yaklaşık 100 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarına uygulanan yerli inaktif beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV) ile ithal menşeili enjeksiyon aşının 60 günlük izleme süresine ait sağ kalım verileri

B İşletmesinde yer alan yaklaşık 20 gram ağırlığında 1000 adet gökkuşağı alabalığı, aşı etkinlik saha çalışması kapsamında, inaktif kombine emülsiyon enjeksiyon aşı (YLV5 ICIEV) ile aşılanmıştır. Eş zamanlı olarak işletmeye ait yine yaklaşık 20 gram ağırlığındaki 1000 adet gökkuşağı alabalığına ise herhangi bir aşı uygulanmamıştır.

28 Mayıs 2025 tarihinde başlayan ve 60 gün süren çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre; aşı uygulanmayan balıklarda %70'e varan bir ölüm oranının görüldüğü, yerli **YLV5 ICIEV aşı uygulanan balıklarda ise ölüm oranının %7,1 seviyesinde kaldığı görülmüştür. Ayrıca yapılan bu saha denemesi ile yerli aşıya ait RPS (Relative Percent Survival - Göreceli Sağ Kalım Yüzdesi) değeri %89,93 olarak tespit edilmiştir (Tablo 66 ve Şekil 108).**

Tablo 66. B İşletmesinde yerli inaktif beşli kombine enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV) uygulanan ve yalancı aşılama yapılan gökkuşağı alabalıklarında 60 günlük saha denemesi sonucunda elde edilen kümülatif mortalite, ve sağ kalım oranları.

Aşı	Balık Sayısı	Toplam Mortalite sayısı	Toplam Sağkalım sayısı	Sağkalım %
Yerli Aşı YLV5 ICIEV	**1000**	**71**	**929**	**92,9**
İthal Aşı	**1000**	**705**	**295**	**29,5**



Şekil 108. B İşletmesinde, yerli inaktif beşli kombine enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV) uygulanan ve yalancı aşılama yapılan gökkuşağı alabalıklarında (n=1.000) yürütülen 60 günlük saha denemesi sonucunda elde edilen sağ kalım ve mortalite oranlarının grafiksel gösterimi.

Bu saha çalışması, Marmara Bölgesi'nde bulunan bir gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmesinde gerçekleştirilmiştir. Amaç, proje kapsamında geliştirilen yerli inaktif beşli kombine emülsiyon enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV)'nin sahadaki koruyuculuğunu değerlendirmektir. Deneme kapsamında, yaklaşık 20 gram ağırlığında toplam 2.000 balık

kullanılmıştır. Bunlardan 1.000 adedi aşılı grup olarak YLV5 ICIEV ile intraperitoneal olarak aşılanmış, 1.000 adedi ise %0,85 FTS (formalin + tuz solüsyonu) ile yalancı enjeksiyon uygulanarak kontrol grubuna dahil edilmiştir.

Deneme 28 Mayıs 2025 tarihinde başlatılmış ve 60 gün süresince mortalite takibi yapılmıştır.

- Yerli aşı uygulanan grupta mortalite oranı %7,1 (71/1.000) olarak belirlenmiş, sağ kalım oranı ise %92,9 (929/1.000) olmuştur.
- Yalancı aşı uygulanan kontrol grubunda ise mortalite %70,5 (705/1.000) düzeyinde gerçekleşmiş, yalnızca %29,5 (295/1.000) sağ kalım sağlanabilmiştir.
- Bu verilere göre, yerli aşı grubuna ait RPS (Relative Percent Survival) değeri %89,93
- oranda artarken, yerli aşı uygulanan gruplarda mortalite anlamlı şekilde düşmüştür.
- Yerli aşı, ithal aşılara kıyasla eşdeğer hatta daha yüksek koruyuculuk oranları göstermiş, böylece sahadaki uygulanabilirliğini ve biyolojik etkinliğini kanıtlamıştır.

Bu bulgular, geliştirilen yerli aşı prototiplerinin sahada başarıyla uygulanabileceğini ve ithal aşı alternatiflerine karşı sürdürülebilir bir çözüm sunabileceğini göstermektedir.

4.7 Gen Ekspresyon Sonuçları

Bu bölümde, farklı inaktif balık aşıları (banyo ve enjeksiyon) ile immunize edilen gruplarda, doğuştan ve kazanılmış bağışıklık sistemine ait genlerin (C3, IgM, IgT, IL-8, IL-10, IL-1β, IFN-γ, TLR-2, CD4-1, CD8-α) farklı organlardaki (solungaç, ön böbrek, dalak, bağırsak) ekspresyon düzeyleri 4. Saat, 1., 2., 7. ve 14. günlerde değerlendirilmiştir.

Tüm aşı grupları ve immun genlere ilişkin detaylı analiz ve yorumlama sonuçları Ek dosya 5-12'de sunulmuştur.

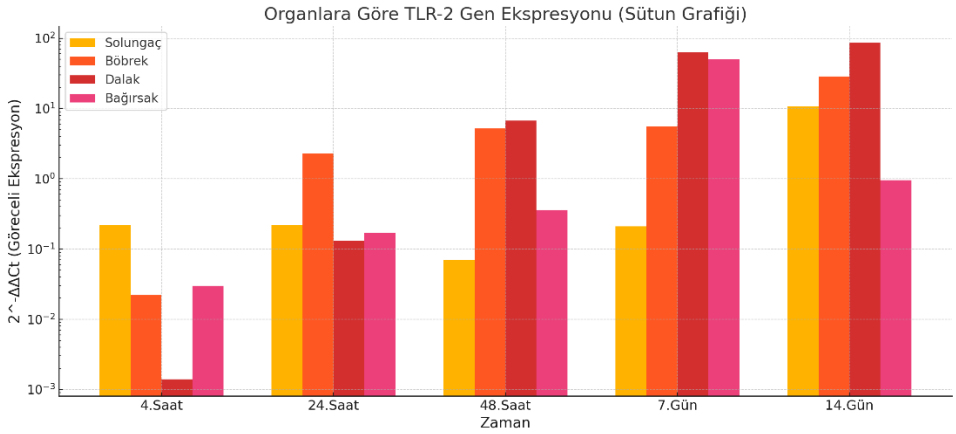
4.7.1 *Y. ruckeri* BT1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşı Gen Ekspresyon Sonuçları

Bu bölümde, *Y ruckeri* serotip O1 BT1 izolatı kullanılarak geliştirilen inaktif banyo aşısı ile aşılanan gruplarda bağışıklık yanıtına katılan genlerin (TLR-2, IL-8, IL-10, IgT, IgM, C3, IL-1β, IFN-γ, CD4-1, CD8-α) ekspresyon düzeyleri 4. saatten 14. güne kadar dört farklı dokuda (solungaç, ön böbrek, dalak, bağırsak) incelenmiştir. Gen ekspresyon verileri Şekil 110-138'de gösterilmiştir.

4.7.1.1 TLR-2 Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: İlk 7 güne kadar baskılanma gözlenmiş, yalnızca 14. günde TLR-2 ekspresyonu belirgin artmış. Bu, banyo aşısının geç fazda mukozal doğuştan bağışıklığı aktive ettiğini gösterir.

Dalak: Erken dönemde çok güçlü baskılanma gözlenmiş, ancak 48. saatten itibaren ekspresyonda dramatik artışlar meydana gelmiştir. 7. ve 14. günlerde bu artış çok güçlü düzeye ulaşmıştır, sistemik doğuştan bağışıklığın geç dönemde aktive olduğunu düşündürür.



Şekil 109. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulamasını takiben, TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında zamana bağlı değişimi (4. saat – 14. gün) gösterilmektedir.

Grafik, doğuştan bağışıklık reseptörlerinden TLR-2'nin aşılama sonrası dokuya özgü ve zamana bağlı ekspresyon profilini ortaya koymakta; özellikle geç fazda (7. ve 14. gün) belirginleşen mukozal ve sistemik aktivasyon örüntüsüne dikkat çekmektedir.

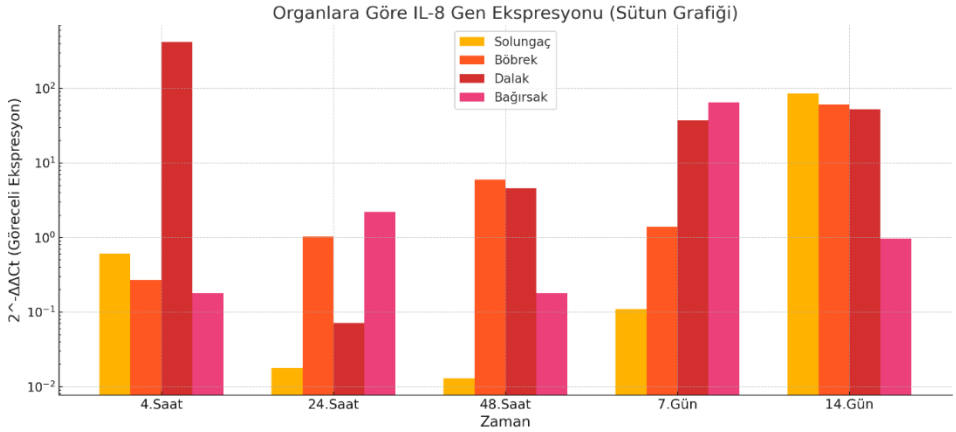
4.7.1.2 IL-8. Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: IL-8 ekspresyon düzeyi, ilk 7 gün boyunca baskılı seyretmiş; ancak 14. günde belirgin bir artış göstermiştir. Bu durum, lokal inflamatuar yanıtın geç fazda aktive edildiğine işaret etmektedir.

Ön Böbrek: 4. saatten itibaren artış eğilimi gösteren IL-8 ekspresyonu, 14. günde çok güçlü düzeylere ulaşmıştır. Sistemik inflamasyonun geç fazda güçlendiği gözlemlenmiştir.

Dalak: 4. saatte gözlenen çok yüksek ekspresyon, sonrasında baskılanmış; ancak ilerleyen günlerde tekrar artış dalgaları ile devam etmiştir. Bu bulgu, dalakta inflamatuar yanıtın dinamik ve zamanla değişen bir profil izlediğini göstermektedir.

Bağırsak: Erken ve orta dönemlerde ekspresyon seviyeleri değişkenlik göstermiş, 7. günde pik yapmış, 14. günde ise dengelenmiştir. Bu da geçici fakat etkili bir mukozal IL-8 yanıtının geliştiğini düşündürmektedir



Şekil 110. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşı uygulaması sonrası, IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında zamana bağlı değişimi (4. saat – 14. gün) gösterilmektedir.

Grafik, pro-inflamatuar sitokinlerden IL-8'in erken ve geç faz inflamatuar yanıt sürecinde sergilediği dalgalı ekspresyon dinamiklerini ortaya koymakta; özellikle 7. ve 14. günlerde bazı dokularda gözlenen belirgin artışlar, lokal ve sistemik düzeyde aşının inflamatuar etkisini yansıtmaktadır.

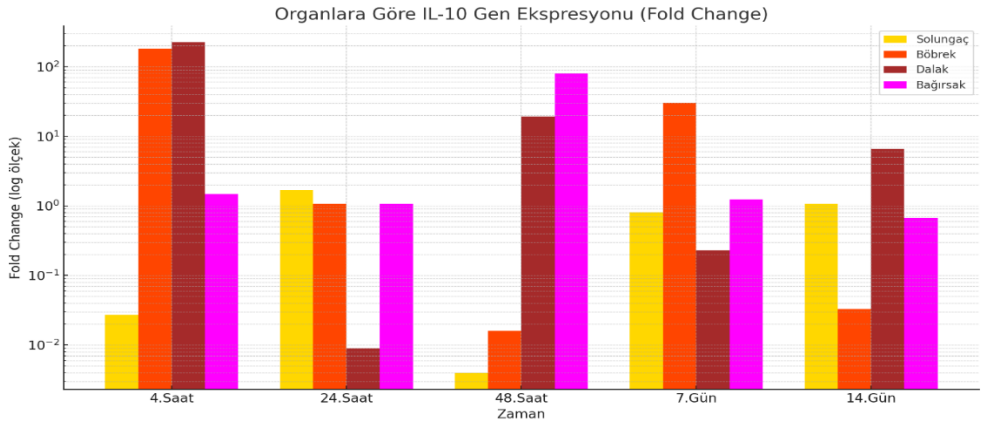
4.7.1.3 IL-10 Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: IL-10 ekspresyonu, 4. ve 48. saatlerde belirgin şekilde baskılanmış; diğer zaman noktalarında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Bu durum, aşı uygulamasını takiben mukozal düzeyde anti-inflamatuar yanıtın sınırlı kaldığını göstermektedir.

Ön Böbrek: 4. ve 7. günlerde çok güçlü IL-10 artışı saptanmış, 48. saatte ise ekspresyon düzeyi ciddi biçimde baskılanmıştır. Bu, sistemik inflamasyon regülasyonunun dinamik ve değişken bir yanıt gösterdiğine işaret etmektedir.

Dalak: 4., 48. ve 14. günlerde IL-10 gen ekspresyonunda yüksek seviyeler kaydedilmiş, 24. saatte ise baskılanma izlenmiştir. Bu veriler, sistemik düzeyde anti-inflamatuar regülasyonun geç fazda etkinleştiğini düşündürmektedir.

Bağırsak: 48. saatte belirgin IL-10 artışı izlenmiş, 14. günde ise ekspresyon düzeyi baskılanmıştır. Mukozal anti-inflamatuar yanıtın erken dönemde aktive olduğu ancak geç dönemde inhibe edildiği görülmektedir.



Şekil 111. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, IL-10 geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif ekspresyon düzeyleri gösterilmektedir.

IL-10, anti-inflamatuar özellikleriyle bilinen bir immün regülatör sitokin olup, özellikle geç dönem zaman noktalarında (7. ve 14. gün) mukozal ve sistemik düzeyde belirgin artışlar sergilemiştir. Bu bulgu, aşının inflamatuar denge üzerinde immünomodülatör etkisini ve tolerojenik yanıtın aktive edildiğini göstermektedir. Solungaç ve ön böbrekte gözlenen ekspresyon artışları, aşının mukozal ve sistemik anti-inflamatuar profiline katkısını desteklemektedir.

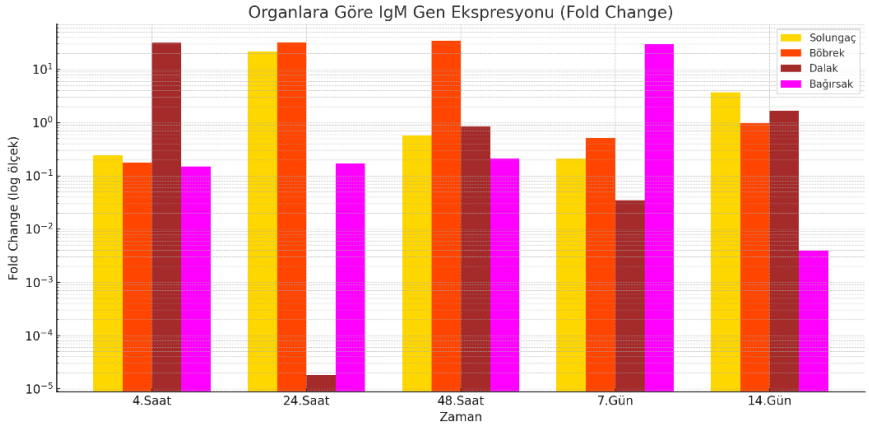
4.7.1.4 IgT Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: 24. saatte IgT gen ekspresyonu belirgin şekilde artış göstermiş, ancak 14. günde güçlü bir baskılanma izlenmiştir. Bu bulgu, mukozal düzeyde IgT aracılı humoral yanıtın geçici olarak aktive edildiğini ve sonrasında regüle edildiğini düşündürmektedir.

Ön Böbrek: 48. saatte çok güçlü bir IgT ekspresyonu gözlenmiş, diğer zaman noktalarında baskılanma ile artış arasında geçişler izlenmiştir. Sistemik IgT yanıtının özellikle 48. saatte aktifleştiği görülmektedir.

Dalak: 48. saatte çok güçlü IgT ekspresyonu kaydedilmiş olup, diğer tüm zaman noktalarında ekspresyon düzeyi düşük veya baskılanmış seyretmiştir. Bu durum, sistemik IgT yanıtının kısa süreli ve geç dönemde sınırlı bir aktivasyonla ortaya çıktığını göstermektedir.

Bağırsak: 7. günde çok güçlü ekspresyon artışı ve 48. saatte de belirgin artış gözlenmiştir. Mukozal IgT yanıtı, geç fazda aktive olmuş ve lokal bağışıklıkta etkili olmuştur.



Şekil 112. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, IgT geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif ekspresyon düzeyleri sunulmaktadır.

Mukozal immünitenin önemli bir bileşeni olan IgT, özellikle bağırsak ve solungaç dokularında geç dönemde artan ekspresyon düzeyleri ile dikkat çekmiştir. Ön böbrek ve dalakta ise geç dönemdeki (7. ve 14. gün) yükseliş, sistemik IgT yanıtının da aktive olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, BT1 banyo aşısının hem lokal hem sistemik düzeyde IgT aracılı mukozal bağışıklığı uyardığını ve mukozal immün hafıza oluşumuna katkı sağladığını ortaya koymaktadır.

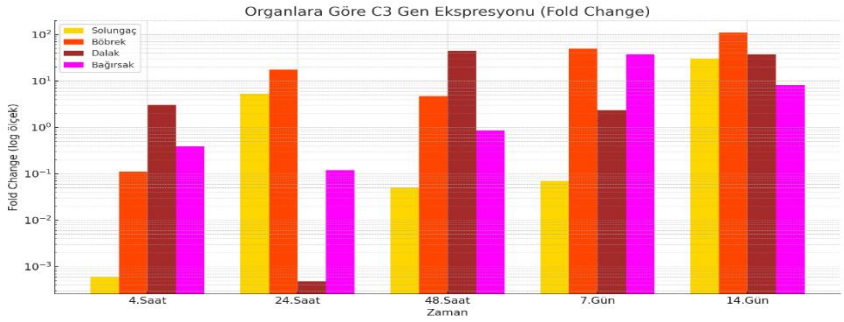
4.7.1.5 C3 Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: 4. saatte çok güçlü baskılanma, 14. günde ise çok güçlü artış izlenmiştir. Mukozal kompleman yanıtı geç dönemde aktive olmuştur.

Ön Böbrek: Tüm geç dönem zaman noktalarında çok güçlü artış izlenmiştir. Sistemik kompleman cevabı güçlü ve sürekli olmuştur.

Dalak: 48. saat ve 14. günde çok güçlü artış, 24. saatte çok güçlü baskılanma izlenmiştir. Dalakta geç dönem kompleman aktivasyonu belirgindir.

Bağırsak: 7. ve 14. günde güçlü artışlar izlenmiştir. Mukozal kompleman yanıtı geç dönemde aktive olmuştur.



Şekil 113. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, C3 geninin solungaç, ön böbrek,

dalak ve bağırsak dokularındaki zamana bağlı relatif ekspresyon düzeyleri (4. saat–14. gün) gösterilmektedir.

C3, kompleman sisteminin merkezi bileşeni olarak doğuştan bağışıklıkta önemli rol oynamaktadır. Solungaç ve bağırsakta 24. saat ve 14. günde belirgin artış gözlenmesi, mukozal kompleman aktivasyonunun geç dönemde devreye girdiğini göstermektedir. Ön böbrek ve dalakta ise 7. ve 14. günlerde izlenen yüksek ekspresyon düzeyleri, sistemik doğuştan bağışıklık yanıtının aşının etkisiyle geç fazda aktive edildiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, BT1 banyo aşısının hem lokal hem sistemik kompleman aracılı bağışıklığı uyardığını göstermektedir.

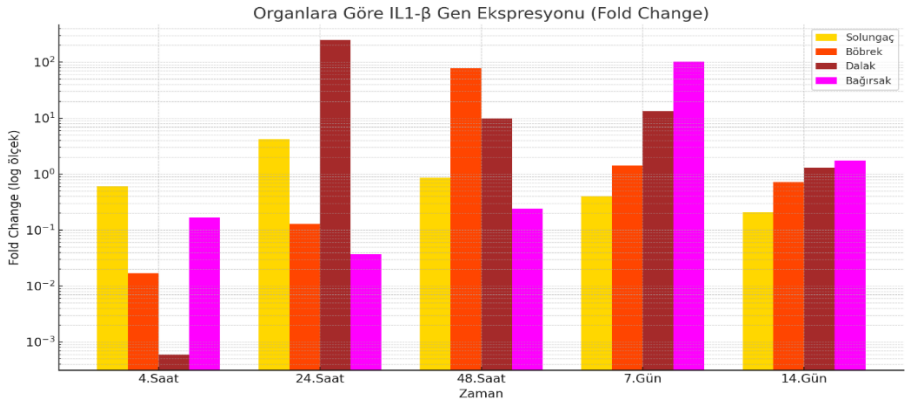
4.7.1.6 IL-1β Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: Erken (4. saat) ve orta dönem (48. saat ve 7. gün) zaman noktalarında IL-1β ekspresyonu baskılanmış; 14. günde ekspresyon düzeyinin dengeye yaklaştığı gözlenmiştir. Bu bulgu, aşı uygulaması sonrası mukozal inflamatuar yanıtın büyük ölçüde inhibe edildiğini göstermektedir.

Ön Böbrek: 24. saatte güçlü bir ekspresyon artışı gözlenmiş, bu artışın 14. güne kadar sürdüğü belirlenmiştir. Bu, sistemik düzeyde IL-1β aracılı proinflamatuar yanıtın geç fazda etkin hale geldiğini göstermektedir.

Dalak: 4. saatte baskılanma izlenmiş, ancak 48. saatten itibaren IL-1β ekspresyonu çok güçlü düzeylerde artış göstermiştir. Bu durum, aşıya karşı dalakta gecikmeli fakat güçlü inflamatuar bir yanıtın ortaya çıktığını göstermektedir.

Bağırsak: 7. günde çok güçlü bir ekspresyon artışı gözlenmiş, 14. günde ise ekspresyon düzeyi dengelenmiştir. Bu bulgu, bağırsakta akut bir mukozal inflamasyonun oluştuğunu ve ardından regüle edildiğini göstermektedir.



Şekil 114. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, IL-1β geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki zamana bağlı relatif ekspresyon düzeyleri (4. saat–14. gün) gösterilmektedir.

IL-1β, inflamatuar yanıtın başlatılmasında kritik rol oynayan proinflamatuar bir sitokindir. Solungaç dokusunda erken dönemde baskılanma izlenirken, 14. günde gözlenen artış geç dönemde mukozal inflamatuar yanıtın aktive olduğunu göstermektedir. Ön böbrekte 48. saatten itibaren başlayan ve 14. günde çok yüksek seviyelere ulaşan ekspresyon, sistemik inflamasyonun geç fazda kuvvetli biçimde uyarıldığını ortaya koymaktadır. Dalakta 48. saat ve 7. günde belirgin artış, 14. günde ise denge durumu gözlenmiş, bu da geçici bir sistemik IL-1β aktivasyonuna işaret etmektedir. Bağırsakta ise 4. saatte başlayan erken artış, 24. saatteki baskılanma ve 7. gündeki güçlü yükseliş ile hem erken hem geç fazda iki pikli bir inflamatuar yanıt gözlenmiştir. Bu veriler, BT1 banyo aşısının hedef dokularda farklı kinetiklerde inflamatuar yanıt oluşturduğunu göstermektedir.

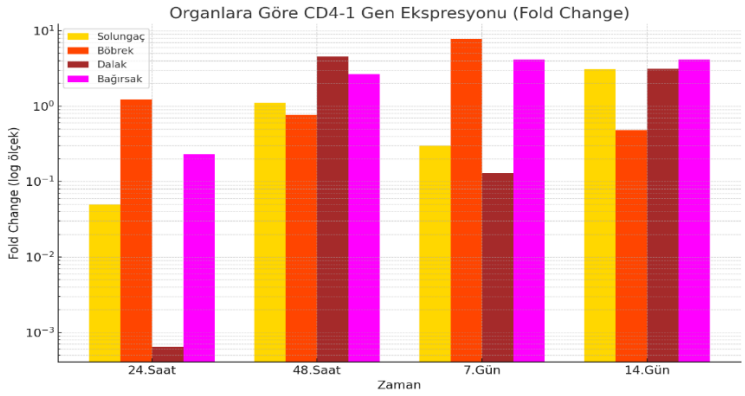
4.7.1.7 IFN-γ Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: 24. saatte IFN-γ ekspresyonunda artış gözlenmiş, ancak 14. günde bu yanıt baskılanmıştır. Bu durum, mukozal antiviral yanıtın kısa süreli ve sınırlı kaldığını göstermektedir.

Ön Böbrek: 48. saatte çok güçlü ekspresyon artışı izlenmiş, bu artış 14. günde de devam etmiştir. Sistemik antiviral bağışıklığın geç dönemde aktive olduğu görülmektedir.

Dalak: 48. saatte ekspresyon düzeyi artmış, diğer zaman noktalarında ise baskılanmıştır. Bu, dalakta geçici fakat etkili bir IFN-γ yanıtının geliştiğini göstermektedir.

Bağırsak: 7. günde çok güçlü IFN-γ ekspresyonu izlenmiş, bu artış 14. günde de sürmüştür. Mukozal antiviral savunmanın geç fazda aktifleştiği anlaşılmaktadır.



Şekil 115. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, IFN-γ geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı değişimi (4. saat–14. gün) gösterilmektedir.

IFN-γ, antiviral ve hücresel bağışıklık yanıtının temel düzenleyicilerinden biridir. Solungaç dokusunda, erken dönem boyunca baskılanan IFN-γ ekspresyonu, yalnızca 14. günde gözlenen çok güçlü artışla mukozal antiviral yanıtın geç dönemde aktive edildiğini göstermektedir. Ön böbrek dokusunda ise 48. saatten itibaren artan ekspresyon 14. günde en yüksek seviyeye ulaşmış, bu da sistemik düzeyde geç dönem antiviral bağışıklığın uyarıldığını

ortaya koymuştur. Dalakta 48. saatte belirgin artış izlenmiş, 7. günde ise baskılanma meydana gelmiş olup IFN-γ yanıtı düzensiz ve geçici bir karakter sergilemiştir. Bağırsak dokusunda ise 7. günde gözlenen çok güçlü artış, lokal antiviral yanıtın geç fazda belirginleştiğini göstermektedir. Bu veriler, banyo aşısının mukozal ve sistemik antiviral immün yanıtları farklı zaman noktalarında etkili biçimde uyardığını ortaya koymaktadır.

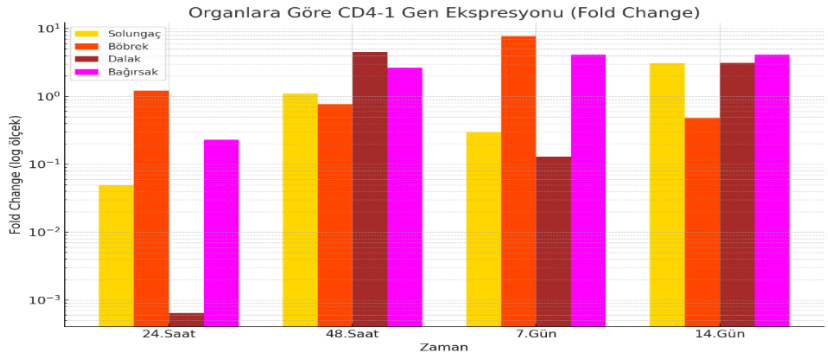
4.7.1.8 CD4-1 Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: 14. günde belirgin ekspresyon artışı izlenmiş, 24. saatte ise baskılanma gözlenmiştir. Bu bulgu, geç fazda mukozal düzeyde CD4+ T-hücre aktivasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir.

Ön Böbrek: 7. günde artış gözlenmiş, diğer zaman noktalarında baskılanma izlenmiştir. Sistemik CD4+ T-hücre yanıtı geçici ve sınırlı bir aktivasyon profili sergilemiştir.

Dalak: 48. saatte ekspresyon düzeyinde artış görülürken, 24. saatte çok güçlü baskılanma kaydedilmiştir. Bu durum, dalakta CD4+ T-hücre yanıtının zamana bağlı değişkenlik gösterdiğini düşündürmektedir.

Bağırsak: 48. saatten itibaren artış eğilimi başlamış, bu yanıt 14. güne kadar devam etmiştir. Mukozal düzeyde CD4+ hücre yanıtının geç fazda aktive olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 116. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, CD4-1 geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki relatif ekspresyon düzeylerinin 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi gösterilmektedir.

CD4-1, yardımcı T lenfosit ($CD4^+$) hücrelerine ait yüzey belirteçlerinden biri olup, hücresel bağışıklık cevabının aktivasyonu ve düzenlenmesinde kritik rol oynar.

Solungaç dokusunda, yalnızca 14. günde gözlenen çok güçlü ekspresyon artışı, mukozal $CD4^+$ T hücre yanıtının geç dönemde aktif hale geldiğini göstermektedir. Ön böbrek dokusunda ise CD4-1 ekspresyonu 14. günde maksimum düzeye ulaşarak sistemik T hücre yanıtının geç dönemde belirginleştiğini ortaya koymuştur. Dalakta, 48. saatte gözlenen artış sonrasında ekspresyon düzeyinin dengeye geldiği görülmekte olup, bu durum geçici bir aktivasyonu işaret etmektedir. Bağırsak dokusunda ise 7. ve 14. günlerde gözlenen belirgin ekspresyon artışı, lokal $CD4^+$ T hücre cevabının geç fazda aktive olduğunu göstermektedir.

Bu bulgular, banyo aşı uygulamasının özellikle geç dönemde T yardımcı hücrelerini hedef alarak, hem sistemik hem de mukozal düzeyde hücresel bağışıklık yanıtını uyardığını ortaya koymaktadır.

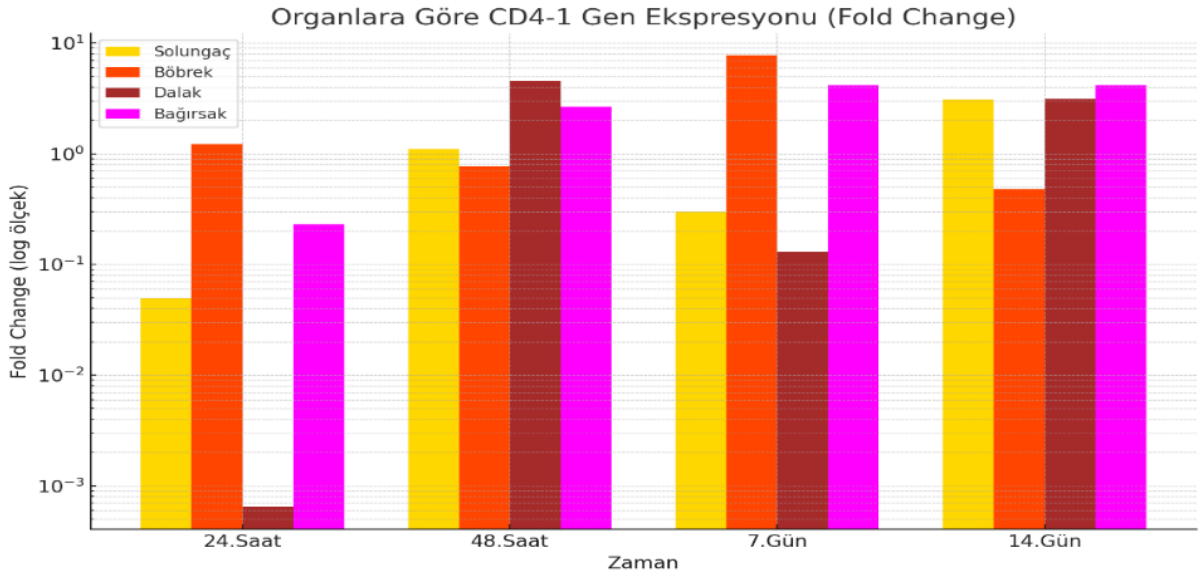
4.7.1.9 CD8-α Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: 7. günde CD8-α ekspresyon düzeyi güçlü şekilde baskılanmıştır. Bu, mukozal sitotoksik T-hücre yanıtının baskılı seyrettiğini göstermektedir.

Ön Böbrek: 24. ve 48. saatlerde artış izlenmiş olup, özellikle 48. saatte ekspresyon düzeyinin çok yüksek olduğu görülmüştür. Bu, sistemik düzeyde güçlü bir sitotoksik T-hücre (CTL) yanıtını işaret etmektedir.

Dalak: 48. ve 7. günde artış izlenmiş, 24. saatte ise çok güçlü baskılanma gözlenmiştir. Bu, dalakta CD8+ T-hücre yanıtının geçici ve dalgalı bir aktivasyon profiline sahip olduğunu göstermektedir.

Bağırsak: 7. günde çok güçlü ekspresyon artışı kaydedilmiş, diğer zaman noktalarında baskılanma izlenmiştir. Mukozal sitotoksik yanıtın geçici ve pik yaparak aktive olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 117. *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısı uygulanan grupta, CD8-α geninin solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki ekspresyon düzeylerinin 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi gösterilmektedir.

CD8-α, sitotoksik T hücrelerin ($CD8^+$) karakteristik belirteçlerinden biridir ve özellikle virüsler ile intraselüler bakterilere karşı hücresel bağışıklığın sitolitik fazında görev alır. Solungaç dokusunda ilk üç zaman noktasında baskılanma gözlenmiş; ancak 14. günde çok güçlü bir ekspresyon artışı meydana gelmiştir. Bu durum, geç dönemde mukozal sitotoksik T hücre yanıtının etkinleştiğini göstermektedir. Ön böbrekte, 48. saatten itibaren başlayan ekspresyon artışı 14. günde maksimum düzeye ulaşmış ve sistemik $CD8^+$ yanıtın geç fazda

kuvvetli şekilde aktive olduğunu ortaya koymuştur. Dalakta ise 48. saat ve 7. günde gözlenen artışlar, ardından 14. günde görülen baskılanma, CD8-α ekspresyonunun sistemik düzeyde geçici ve dalgalı bir seyir izlediğini düşündürmektedir. Bağırsak dokusunda 7. günde çok güçlü bir artış gözlenmiş, ancak 14. günde baskılanma ile sonlanmıştır. Bu bulgu, mukozal $CD8^+$ yanıtın kısa süreli ve keskin bir pik ile karakterize olduğunu göstermektedir.

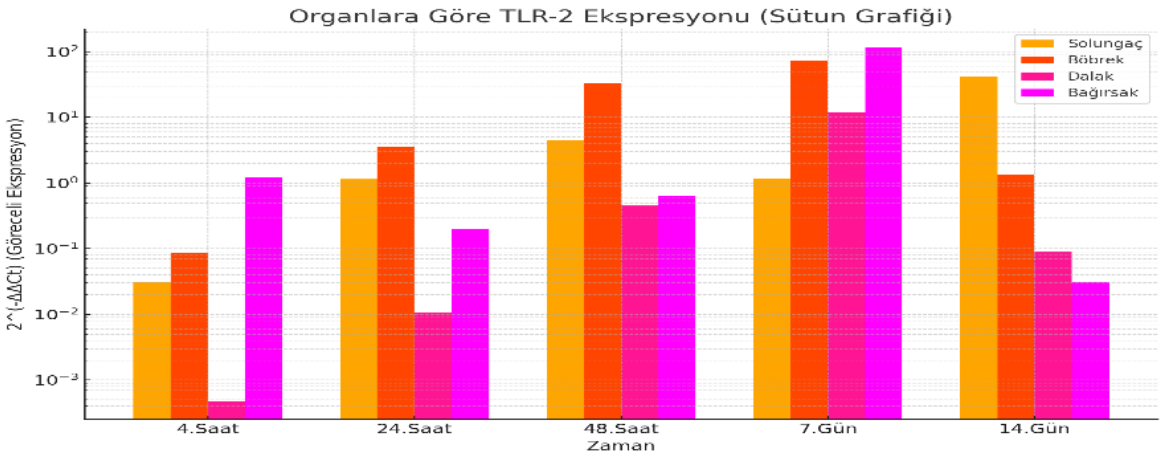
Genel olarak bu ekspresyon profili, *Y. ruckeri* O1 BT1 banyo aşısının özellikle geç dönemde, sistemik ve mukozal düzeyde sitotoksik T hücre aktivasyonunu indükleyebildiğini ortaya koymaktadır.

4.7.2 *Y. ruckeri* O1 BT2 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşı Gen Ekspresyon Sonuçları

4.7.2.1 TLR-2 Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: Erken ve orta dönemlerde baskılanma gözlenmiş, 24. ve 14. günde güçlü ekspresyon artışı izlenmiştir. Mukozal TLR-2 yanıtı dalgalı ancak son evrede aktive olmuştur. **Ön Böbrek:** İlk saatlerde baskılanma izlenmiş, 24. ve 48. saatlerde artış gözlenmiştir. 14. günde değişiklik izlenmemiştir. Sistemik doğuştan bağışıklık geçici aktivasyon göstermiştir.

Dalak: İlk iki zaman noktasında güçlü baskılanma, 48. saat ve 7. günde çok güçlü artış, 14. günde tekrar baskılanma izlenmiştir. Dalaktaki yanıt geçici ve değişkendir. Bağırsak: Erken dönemde baskılanma, 7. günde artış, 14. günde tekrar güçlü baskılanma gözlenmiştir. Mukozal düzeyde TLR-2 yanıtı düzensiz seyretmiştir.



Şekil 118. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulamasını takiben TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Toll-like reseptör 2 (TLR-2), özellikle Toll-benzeri reseptör 2 (TLR-2), gram-negatif bakterilere karşı doğuştan bağışıklık yanıtının ilk basamağında görev alan önemli bir örüntü (patern) tanıyıcı reseptördür. Bu reseptör, patojenlere ait yapısal bileşenleri (PAMP'leri) tanıyarak sitokin üretimini ve immün yanıtın aktivasyonunu başlatır. Solungaç dokusunda

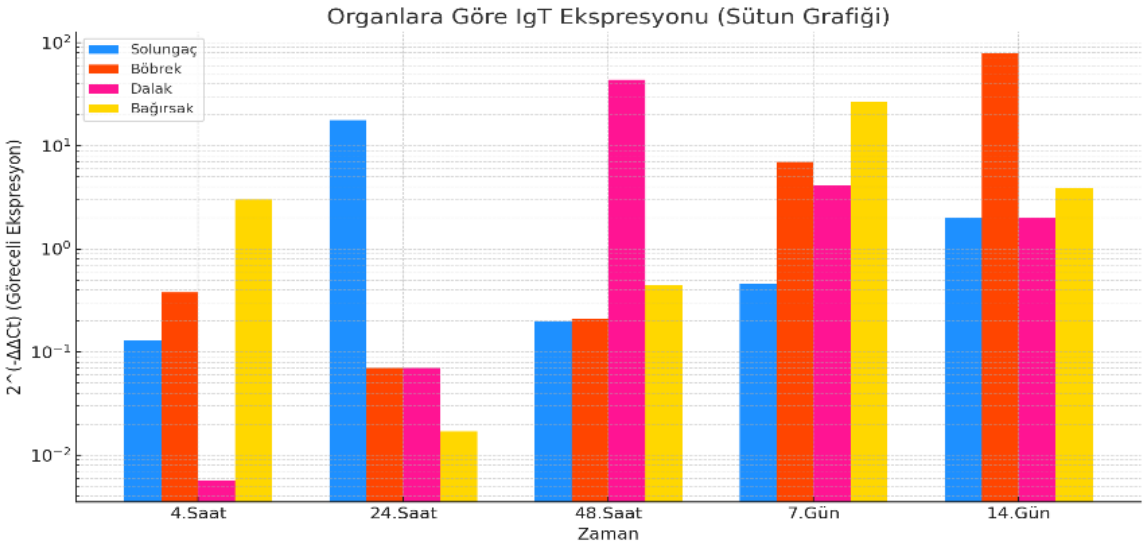
erken dönemlerde baskılanma gözlenmiş, 48. saatten itibaren artış başlamış ve 14. günde çok güçlü bir ekspresyon seviyesine ulaşılmıştır. Bu durum, mukozal yüzeyde TLR-2 aracılı doğuştan bağışıklık aktivasyonunun geç dönemde belirginleştiğini göstermektedir.

4.7.2.2 IgT Gen Ekspresyon Sonuçları

Ön Böbrek: İlk üç zaman noktasında (4. saat–48. saat) ekspresyon düzeyleri baskılanmış, ancak 7. ve 14. günlerde belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu bulgular, sistemik IgT yanıtının geç dönemde aktive edildiğini göstermektedir.

Dalak: 4. ve 24. saatlerde baskılanma izlenmiş, 48. saatten itibaren ise ekspresyon artışı başlamış ve 14. güne kadar bu artış eğilimi sürmüştür. Dalaktaki IgT ekspresyon profili, sistemik adaptif yanıtın geç ve istikrarlı bir şekilde şekillendiğine işaret etmektedir.

Bağırsak: 4. saatte başlayan ekspresyon artışı, 24. saatte baskılanma ile kesilmiş; ancak 7. ve 14. günlerde yüksek düzeyli ekspresyon ile mukozal IgT yanıtının geç dönemde güçlendiği tespit edilmiştir. Bu durum, bağırsak mukozasında humoral bağışıklık yanıtının yeniden aktive olduğunu göstermektedir.



Şekil 119. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulamasını takiben IgT gen ekspresyonunun, solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

İmmunoglobulin T (IgT), teleost balıklarda mukozal yüzeylerin özgül bağışıklık yanıtında görev alan temel bir antikordur ve özellikle solungaç, deri ve bağırsak gibi mukozal bariyerlerde patojenlere karşı savunmada kritik rol oynar.

Bu çalışmada, IgT gen ekspresyonu özellikle **solungaç ve bağırsak** gibi mukozal dokularda **7. ve 14. günlerde belirgin şekilde artış göstermiş**, bu da **geç dönemde lokal mukozal bağışıklığın** aktive olduğunu ortaya koymuştur. Sistemik bağışıklık organları olan **ön böbrek ve dalakta** da **48. saatten itibaren başlayan ve 14. güne kadar süren ekspresyon**

artışı, banyo aşısının **sistemik IgT cevabını da etkili şekilde uyardığını** göstermektedir. Sonuç olarak, *Y. ruckeri* O1 BT2 suşuna karşı geliştirilen banyo aşısı, hem **lokal mukozal** hem de **sistemik IgT aracılı bağışıklık** açısından anlamlı düzeyde immün aktivasyon sağlamıştır.

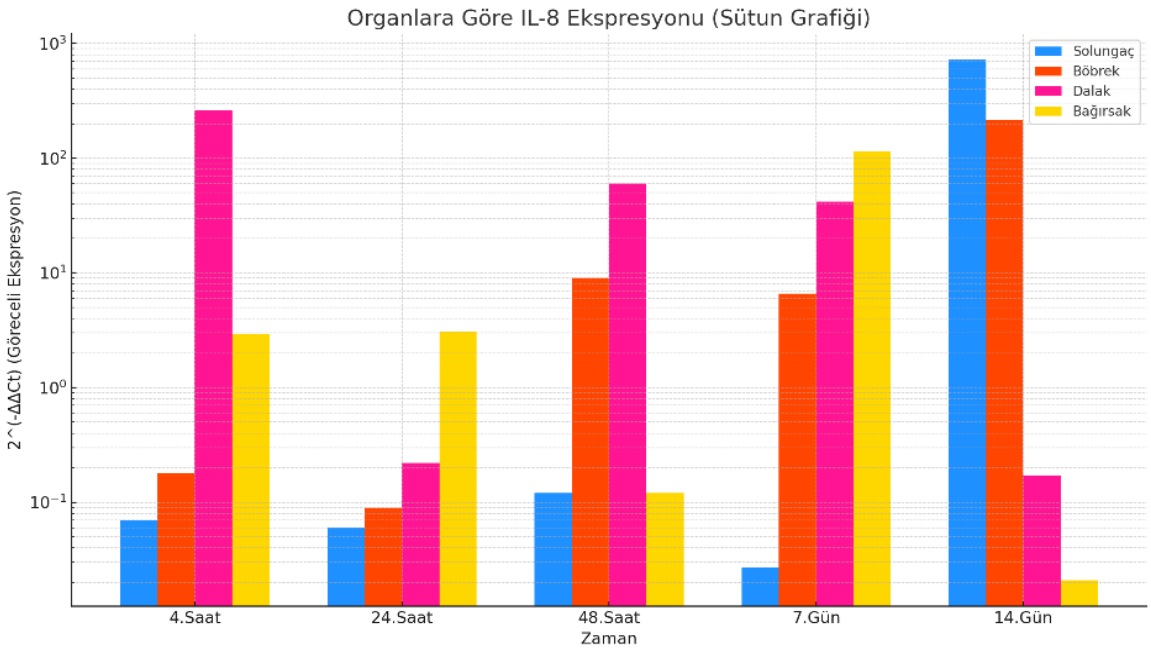
4.7.2.3 IL-8 Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: İlk dört zaman noktasında baskılanma izlenmiş, yalnızca 14. günde çok güçlü artış gözlenmiştir. Mukozal inflamatuar yanıt geç fazda aktive olmuştur.

Ön Böbrek: Erken dönemde baskılanma, 24. ve 48. saatte artış, 7. ve 14. günlerde tekrar baskılanma izlenmiştir. Sistemik yanıt kısa süreli uyarılmıştır.

Dalak: 4. saatte çok güçlü artış izlenmiş, 24. saatte güçlü baskılanma, 7. günde tekrar artış gözlenmiştir. Dalaktaki yanıt oldukça dalgalıdır.

Bağırsak: 24. saatte artış, 7. günde çok güçlü artış izlenmiş, 14. günde ise baskılanma izlenmiştir. Mukozal yanıt geç dönemde aktiftir.



Şekil 120. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulaması sonrası IL-8 gen ekspresyonunun, solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Interlökin-8 (IL-8), doğuştan bağışıklık sisteminde görev alan kemotaktik bir sitokindir ve enfeksiyonlara karşı nötrofillerin ve diğer bağışıklık hücrelerinin inflamasyon bölgesine göçünü sağlar. Bu özelliği ile **erken inflamatuar yanıtın belirleyici medyatörlerinden biridir.**

Bu çalışmada, IL-8 ekspresyonu **solungaç dokusunda erken dönem boyunca baskılanmış**, ancak **14. günde belirgin bir artış göstererek geç dönemde mukozal inflamatuar yanıtın aktive olduğunu** ortaya koymuştur. **Ön böbrek dokusunda**, IL-8 ekspresyonu **48. saatten itibaren yükselişe geçmiş ve 14. günde en yüksek seviyeye**

ulaşarak sistemik inflamasyonun geç fazda güçlendiğini göstermiştir. **Dalakta**, IL-8 ekspresyonu **erken (4. saat) ve orta dönemlerde (48. saat) artış göstermiş, 14. günde ise tekrar baskılanmıştır**, bu da dalakta **geçici bir inflamatuar yanıtın** geliştiğini düşündürmektedir. **Bağırsak dokusunda** ise **erken başlayan IL-8 artışı**, 48. saatte baskılanmış; ancak **7. günde pik yaparak geçici ve keskin bir inflamatuar tepkiyi** yansıtmıştır.

Sonuç olarak, ***Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı**, başta ön böbrek olmak üzere tüm hedef organlarda **zamanla farklılaşan ve çoğunlukla geç dönemde belirginleşen bir IL-8 yanıtını** indüklemiş; bu durum, **lokal ve sistemik inflamatuar cevabın aşılama ile başarılı biçimde uyarıldığını** göstermektedir.

4.7.2.4 IL-8 Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: Tüm erken dönem zaman noktalarında (4. saat, 24. saat, 48. saat, 7. gün) IL-8 ekspresyon düzeyleri belirgin şekilde baskılanmış, yalnızca 14. günde çok güçlü bir artış izlenmiştir. Bu bulgular, aşıya bağlı mukozal inflamatuar yanıtın geç fazda aktive olduğunu göstermektedir.

Ön Böbrek: IL-8 ekspresyonu 48. saatten itibaren artış eğilimi göstermiş ve 14. günde en yüksek seviyelere ulaşmıştır. Bu durum, sistemik inflamasyon yanıtının geç fazda belirginleştiğini ve ön böbrekte güçlü bir IL-8 cevabı oluştuğunu ortaya koymaktadır.

Dalak: 4. ve 48. saatlerde IL-8 ekspresyon düzeylerinde artış gözlenirken, 14. günde baskılanma meydana gelmiştir. Dalaktaki ekspresyon profili, IL-8 yanıtının erken ve geç fazlar arasında dalgalı bir seyir izlediğini göstermektedir.

Bağırsak: IL-8 ekspresyonu 4. saatte artışla başlamış, 48. saatte baskılanma ile kesintiye uğramış; 7. günde ise çok güçlü bir artışla pik yapmıştır. Ancak 14. günde yeniden baskılanma izlenmiştir. Bu durum, bağırsak mukozasında IL-8 yanıtının geçici, pik şeklinde ve fazlar arasında değişken bir profile sahip olduğunu göstermektedir.

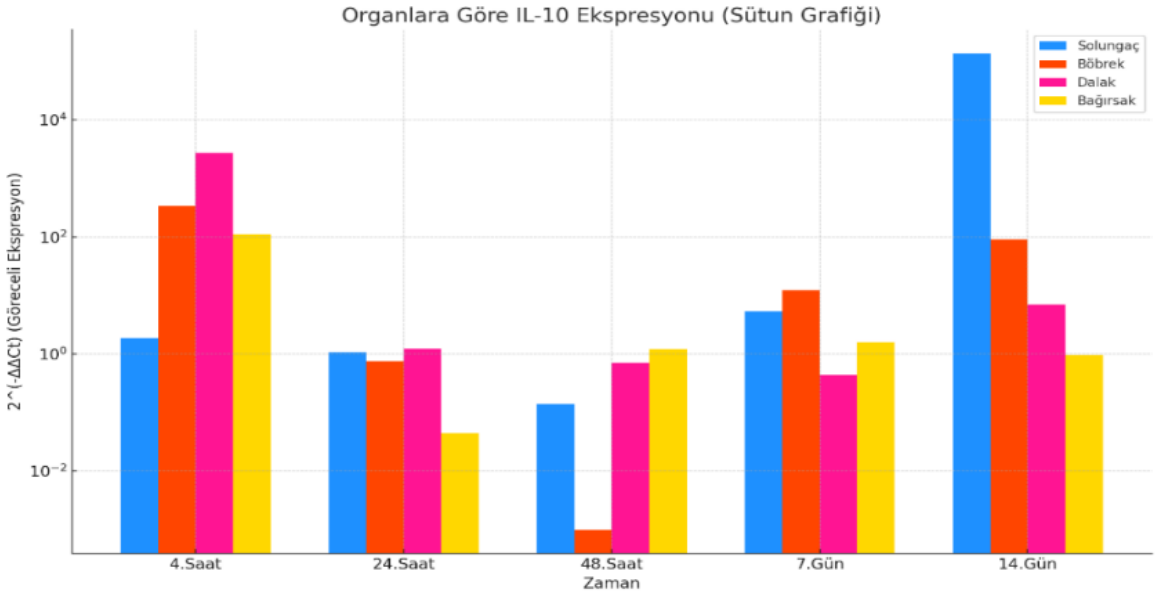
4.7.2.5 IL-10 8 Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: Tüm zaman noktalarında baskılanma, yalnızca 14. günde artış izlenmiştir. Mukozal anti-inflamatuar yanıt geç dönemde aktive olmuştur.

Ön Böbrek: 4. saatte çok güçlü artış, 48. saatte güçlü baskılanma, 7. ve 14. günde artış izlenmiştir. Sistemik IL-10 ekspresyonu değişken seyretmiştir.

Dalak: Tüm zaman noktalarında artış baskın olup, 4., 48. ve 14. günlerde çok güçlü ekspresyon artışı dikkat çekmektedir. Dalakta güçlü bir IL-10 yanıtı oluşmuştur.

Bağırsak: 48. saatte çok güçlü artış izlenmiş, diğer zaman noktalarında daha hafif düzeylerde dalgalanmalar gözlenmiştir. Mukozal düzeyde IL-10 ekspresyonu dengeli artmıştır.



Şekil 121. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanan grupta IL-10 gen ekspresyonunun, solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Interlökin-10 (IL-10), başlıca anti-inflamatuar sitokinlerden biridir ve proinflamatuar yanıtları baskılayarak doku hasarını sınırlandırır. Aşılama sonrası oluşan immün yanıtın regülasyonu açısından IL-10, **dengeleyici bağışıklık mekanizmalarının** önemli bir göstergesidir.

Bu çalışmada, **solungaç dokusunda IL-10 ekspresyonu erken dönemde stabil seyretmiş**, ancak **7. ve 14. günlerde gözlenen belirgin artış**, **geç dönemde mukozal anti-inflamatuar yanıtın aktif hale geldiğini** ortaya koymaktadır. **Ön böbrek dokusunda**, IL-10 ekspresyonu **4. saatte çok güçlü bir artış göstermiş**, 48. saatte baskılanmış, ancak **14. günde yeniden yükselerek sistemik anti-inflamatuar dengenin geç dönemde sağlandığını** düşündürmüştür. **Dalakta**, **4. saatte ve 14. günde belirgin artışlar**, diğer zaman noktalarında ise ekspresyonun düşük olması, **dalaktaki yanıtın hem erken hem de geç fazlarda kontrollü biçimde aktive olduğunu** göstermektedir. **Bağırsak dokusunda** ise IL-10 ekspresyonu **erken dönemde yüksektir**, 24. saatte baskılanmış, ancak **daha sonraki zamanlarda dengeye oturmuştur**.

Bu durum, **bağırsak mukozasında erken başlayan regülatör yanıtın zamanla homeostatik düzeye döndüğünü** düşündürmektedir.

Sonuç olarak, ***Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı**, IL-10 ekspresyonunu hem sistemik hem de mukozal düzeyde **geç dönemde aktive ederek aşının neden olduğu proinflamatuar yanıtın düzenlenmesine katkı sağlamıştır**. Bu sonuç, **aşının immün homeostazı destekleyici etkisini** ortaya koymaktadır.

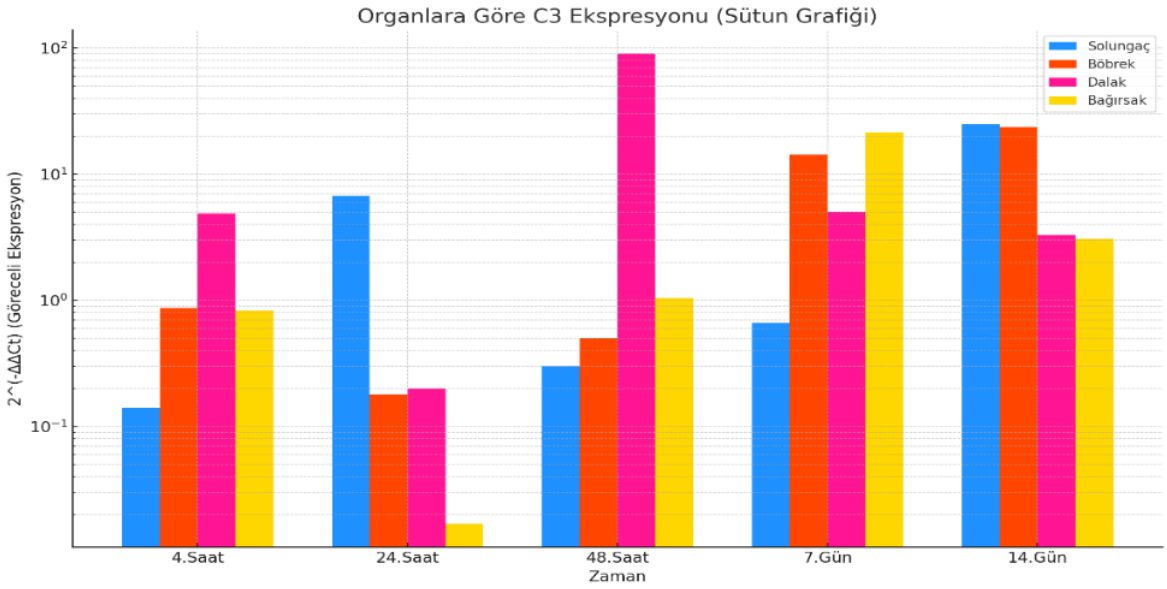
4.7.2.6 C3 Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: 24. saat ve 14. günde belirgin ekspresyon artışı izlenmiş; diğer zaman noktalarında ise ekspresyon düzeyleri baskılanmıştır. Bu durum, mukozal yüzeylerde kompleman sisteminin geç fazda aktive olduğunu ve aşının etkisinin zamanla belirginleştiğini göstermektedir.

Ön Böbrek: 7. ve 14. günlerde çok güçlü ekspresyon artışları meydana gelmiş, erken dönemlerde ise baskılanma dikkat çekmiştir. Bu durum, ön böbrekte sistemik kompleman yanıtının geç dönemde aktive olduğunu göstermektedir.

Dalak: 48. saatte çok güçlü ekspresyon artışı gözlenmiş, diğer zaman noktalarında da artış eğilimi sürmüştür. Bu profil, dalakta geç dönem C3 aktivasyonunun belirgin şekilde geliştiğini ortaya koymaktadır.

Bağırsak: 7. ve 14. günlerde güçlü C3 ekspresyonu izlenmiş; erken dönemlerde ise ekspresyon dengeli kalmıştır. Bu sonuçlar, mukozal kompleman yanıtının geç dönemde etkinleştiğini ve bağışıklık sürecine katkıda bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 122. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanan grupta C3 gen ekspresyonunun, solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki 4. saat – 14. gün arasındaki relatif ekspresyon düzeyleri grafiksel olarak sunulmaktadır.

Kompleman bileşeni 3 (C3), hem klasik hem de alternatif kompleman yolaklarının merkezinde yer alan, opsonizasyon, kemotaksis ve hücre lizisi gibi bağışıklık mekanizmalarını başlatan temel bir komponenttir. C3'ün gen ekspresyon seviyeleri, doğuştan gelen bağışıklık yanıtın aktivasyonu açısından kritik bir biyobelirteçtir.

Bu çalışmada, **solungaç dokusunda**, C3 ekspresyonu **24. saatte ve 14. günde anlamlı bir artış göstermiş**, bu da **mukozal kompleman yanıtının geç dönemde etkinleştirildiğini**

göstermektedir. Bu durum, solungaç gibi dış ortamla doğrudan temas eden bir dokuda **geç başlayan fakat etkili bir doğuştan bağışıklık aktivasyonuna** işaret etmektedir.

Ön böbrek, teleost balıklarda başlıca immün organlardan biri olup, burada C3 gen ekspresyonunun **7. ve 14. günlerde çok güçlü artışlar göstermesi**, **sistemik kompleman yanıtının geç fazda güçlü şekilde aktive olduğunu** ortaya koymuştur.

Dalakta, **48. saatte çok güçlü bir ekspresyon artışı**, ardından devam eden artış eğilimi, bu dokuda **geç dönem kompleman yanıtının devamlılığını** göstermektedir. Bu bulgu, antijen sunumu ve adaptif bağışıklık yanıtlarının şekillenmesinde önemli rol oynayan dalakta **kompleman sistemi aracılığıyla desteklenen bir immün modülasyonu** işaret etmektedir.

Bağırsak dokusunda, C3 ekspresyonu özellikle **7. ve 14. günlerde belirgin artışlar göstermiş**, bu da **lokal mukozal doğuştan bağışıklık yanıtının geç dönemde aktive olduğunu** göstermektedir. Bu geç aktivasyon, aşının bağırsak mukozasında zamanla oluşan antijen sunumu ve immün adaptasyonun bir yansıması olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak, *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı, C3 ekspresyonunu **geç dönemde hem mukozal hem de sistemik düzeyde belirgin şekilde artırarak doğuştan bağışıklık sistemini güçlü şekilde aktive etmiştir**. Bu bulgular, aşının bağışıklık sisteminin ilk savunma hattını oluşturan kompleman sistemi üzerinden etkili bir yanıt oluşturduğunu göstermektedir.

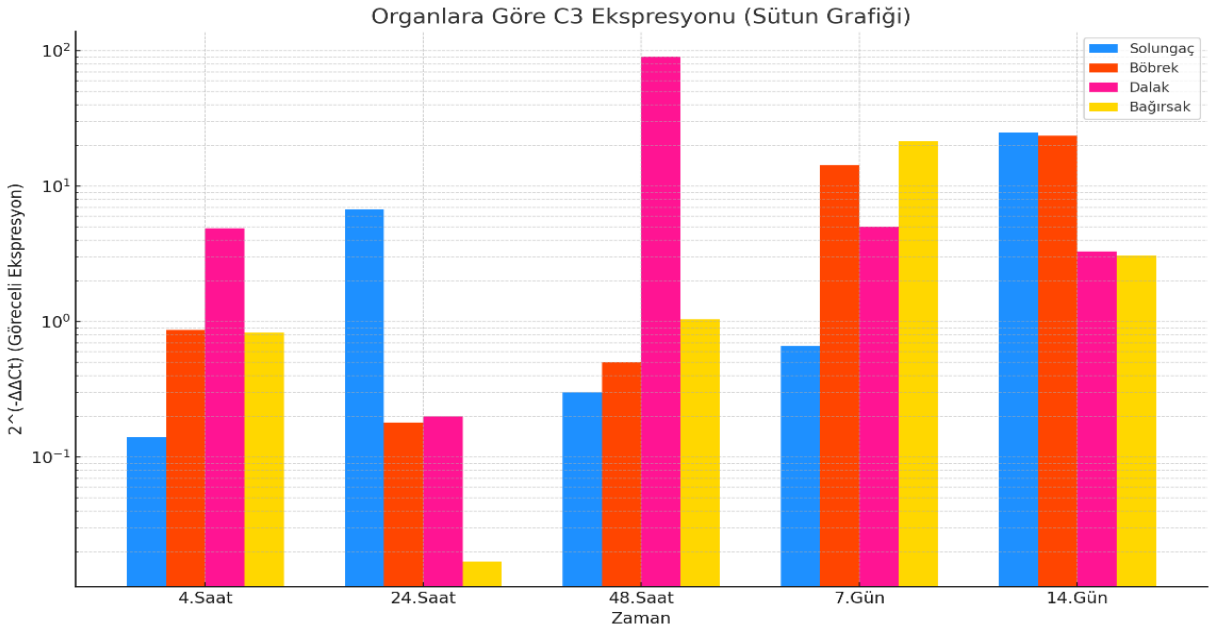
4.7.2.7 CD4-1 Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: 14. günde çok güçlü ekspresyon artışı gözlenmiştir. Bu artış, mukozal T-hücre yanıtının geç dönemde belirgin bir şekilde aktive olduğunu göstermektedir.

Ön Böbrek: 14. günde maksimum düzeye ulaşan ekspresyon düzeyleri, sistemik düzeyde CD4+ T-hücre yanıtının geç fazda kuvvetli şekilde aktive olduğunu işaret etmektedir.

Dalak: 48. saatte gözlenen artıştan sonra ekspresyon profili dalgalı seyretmiş, 14. günde ise dengeli bir seviyeye ulaşmıştır. Bu durum, dalakta T-hücre aktivasyonunun geçici piklerle ilerlediğini göstermektedir.

Bağırsak: 7. ve 14. günlerde belirgin artışlar kaydedilmiştir. Bu bulgular, lokal CD4+ yanıtın geç dönemde etkinleştiğini göstermektedir.



Şekil 123. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşı uygulanması sonrasında, C3 gen ekspresyonunun farklı organlarda zamana bağlı değişimi (4. saat – 14. gün) grafiksel olarak sunulmaktadır.

Kompleman bileşeni 3 (**C3**), hem doğuştan hem de kazanılmış bağışıklık sisteminin köprü elemanı olup, patojenlerin tanınması, opsonizasyon, kemotaksis ve immün kompleman oluşumu süreçlerinde temel rol oynar. Bu yönüyle C3'ün gen ekspresyon profili, aşının bağışıklık sistemi üzerindeki etkisini değerlendirmede kritik bir biyobelirteçtir.

Solungaç dokusunda, C3 ekspresyonu **24. saatte anlamlı düzeyde artmış**, 48. saatte bir miktar düşüş göstermiş, ancak **14. günde tekrar belirgin şekilde yükselmiştir**. Bu durum, **mukozal yüzeylerde antijenle teması takiben geç fazda güçlü bir doğuştan bağışıklık yanıtı oluştuğunu** göstermektedir.

Ön böbrekte, özellikle 7. ve 14. günlerde C3 ekspresyonu yüksek seviyelere ulaşmıştır. Bu artış, sistemik düzeyde doğuştan bağışıklık aktivasyonunun geç dönemde güçlendiğini ve aşının sistemik koruyuculuk açısından etkili olduğunu göstermektedir.

Dalakta, 48. saatte çok güçlü bir ekspresyon artışı izlenmiş; bu artış 7. ve 14. günlerde de devam etmiştir. Bu eğilim, dalakta kompleman sistemine dayalı antijen sunumu ve immün adaptasyon sürecinin aktif olduğunu işaret etmektedir.

Bağırsakta, C3 ekspresyonu 4. saatte sınırlı düzeydeyken, 7. ve 14. günlerde belirgin şekilde artmıştır. Bu durum, bağırsak mukozasında geç fazda aktive olan ve lokal bağışıklıkta önemli rol oynayan kompleman yanıtını yansıtmaktadır.

Sonuç olarak, *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı, **C3 gen ekspresyonunu hem mukozal hem de sistemik dokularda özellikle geç dönemde artırarak** kompleman aracılı doğuştan bağışıklık yanıtını kuvvetli şekilde uyarmıştır. Bu bulgular, aşının hem lokal hem sistemik bağışıklıkta etkili bir immün stimülasyon sağladığını göstermektedir.

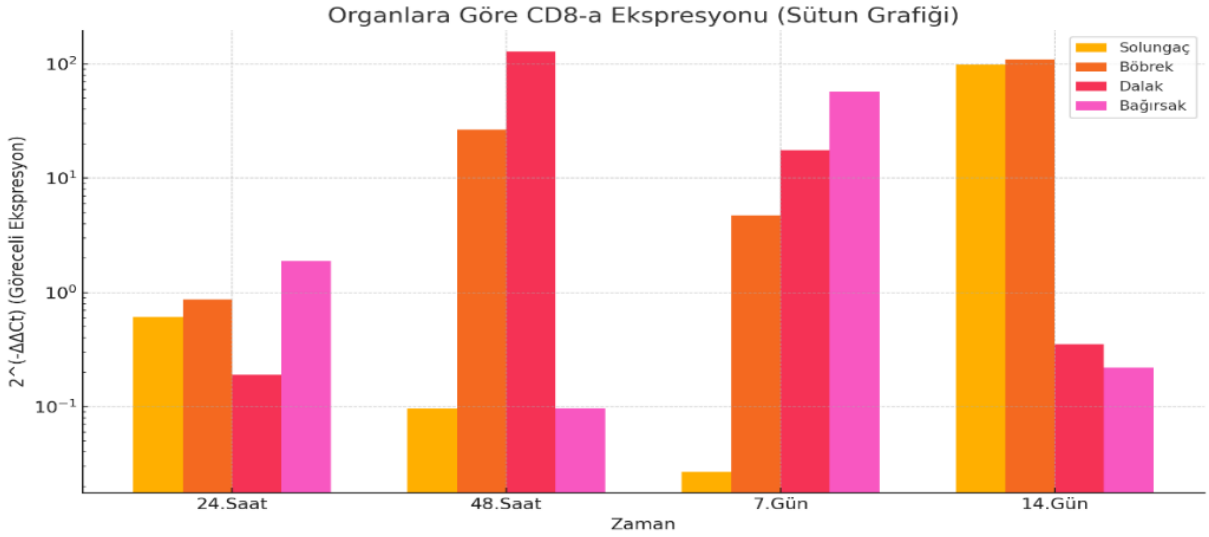
4.7.2.8 CD8-α Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: İlk üç zaman noktasında ekspresyon baskılanmış; 14. günde ise çok güçlü bir artış gözlenmiştir. Bu durum, sitotoksik CD8+ T-hücre yanıtının mukozal düzeyde geç dönemde aktive olduğunu göstermektedir.

Ön Böbrek: 48. saatten itibaren artmaya başlayan ekspresyon, 14. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Sistemik düzeyde CD8+ yanıtın geç fazda güçlendiği anlaşılmaktadır.

Dalak: 48. saat ve 7. günde artışlar gözlenmiş, ancak 14. günde tekrar baskılanma izlenmiştir. Bu, sistemik sitotoksik yanıtın dalgalı seyrettiğini göstermektedir.

Bağırsak: 7. günde çok güçlü bir artış izlenmiş; 14. günde ise ekspresyon baskılanmıştır. Bu da mukozal CD8+ yanıtın geçici ve keskin pik şeklinde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 124. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşı uygulanması sonrasında, CD8-α gen ekspresyonunun farklı organlarda zamana bağlı değişimi (4. saat – 14. gün) grafiksel olarak sunulmaktadır.

CD8-α, özellikle hücre içi patojenlere karşı geliştirilen **sitotoksik T hücre yanıtının** önemli bir göstergesi olup, balıklarda da hücresel bağışıklık mekanizmalarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

Solungaçta, 4. ve 24. saatlerde baskılanma izlenmiş; 48. saatte ekspresyonda artış başlamış, 14. günde ise çok güçlü ekspresyon artışı gözlenmiştir. Bu durum, mukozal CD8+ sitotoksik T hücre yanıtının geç dönemde aktive edildiğini göstermektedir.

Ön böbrekte, erken zaman noktalarında baskılanma izlenmiş, 48. saatten itibaren ekspresyon belirgin şekilde artmış ve 14. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu bulgu, sistemik CD8+ T hücre yanıtının geç dönemde güçlendiğine işaret etmektedir.

Dalakta, 48. saat ve 7. günde artışlar gözlenmiş, ancak 14. günde ekspresyon düzeyi düşmüştür. Bu durum, dalakta CD8+ aktivasyonun geçici bir pikle sınırlı kaldığını, yanıtın sürdürülebilir olmadığını düşündürmektedir.

Bağırsakta, özellikle 7. günde çok güçlü bir artış izlenmiş, ancak 14. günde baskılanma eğilimi gözlenmiştir. Bu bulgu, mukozal CD8+ sitotoksik yanıtın geçici ve ani bir artışla sınırlı kaldığını göstermektedir.

Y. ruckeri O1 BT2 banyo aşısı, özellikle **ön böbrek ve solungaçta CD8-α gen ekspresyonunu geç dönemde artırarak**, **hücresel bağışıklık yanıtının sistemik ve mukozal düzeyde aktive edilmesini sağlamıştır**. Ancak dalak ve bağırsakta gözlenen geçici yanıtlar, bu dokularda **immün regülasyon mekanizmalarının** daha erken devreye girdiğini düşündürmektedir. CD8-α ekspresyonunun artışı, aşının **sitotoksik T hücre aracılı adaptif bağışıklık üzerine etkili olduğunu** ortaya koymaktadır.

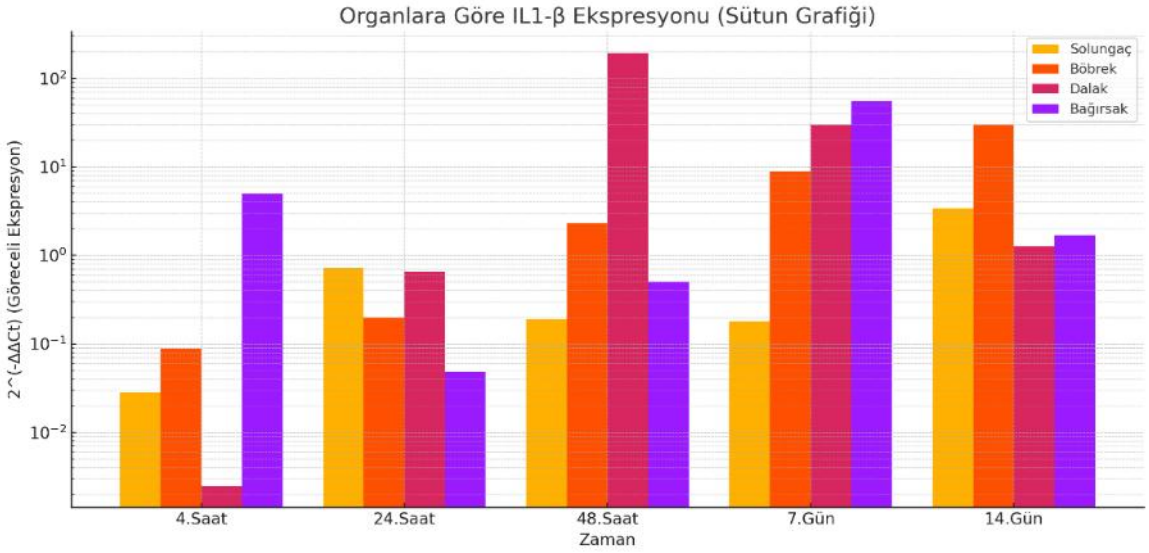
4.7.2.9 IL-1β Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: İlk dört zaman noktasında baskılanma gözlenmiş, 14. günde ise ekspresyon artışı meydana gelmiştir. Mukozal inflamatuar yanıtın geç dönemde aktive olduğu anlaşılmaktadır.

Ön Böbrek: 48. saatten itibaren artmaya başlayan IL-1β ekspresyonu, 14. günde çok yüksek düzeylere ulaşmıştır. Bu bulgular, sistemik inflamasyonun geç dönemde belirginleştiğini göstermektedir.

Dalak: 48. saat ve 7. günde çok güçlü ekspresyon artışları gözlenmiş; 14. günde ise ekspresyon dengelenmiştir. Bu da dalakta geç dönem inflamatuar yanıtın geliştiğini göstermektedir.

Bağırsak: 4. saatte başlayan erken ekspresyon artışı, 24. saatte baskılanmış; 7. günde ise çok güçlü bir artış izlenmiştir. Bu iki ayrı pik, mukozal IL-1β yanıtının hem erken hem de geç fazlarda aktive olduğunu göstermektedir.



Şekil 125. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanması sonrasında, IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

IL-1β, enfeksiyonlara karşı erken inflamatuar yanıtı başlatan kilit bir sitokindir. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanan grupta, özellikle **ön böbrek ve dalak** dokularında 48. saatten itibaren gözlenen ekspresyon artışı, aşıya bağlı sistemik inflamatuar aktivasyonun başladığını göstermektedir.

Bağırsakta 4. saatte görülen erken ekspresyon pikine karşılık, **solungaç dokusunda** inflamatuar yanıtın daha geç ve zayıf şekilde aktive olması, mukozal immün yanıtın sınırlı ve zamansal farklılık gösterdiğine işaret etmektedir.

Bu bulgular, IL-1β'nin aşı uygulamasını takiben hem sistemik hem de lokal inflamatuar süreçlerde farklı zamanlamalarla görev aldığını ortaya koymaktadır. Yanıt profili, özellikle ön böbrekte geç dönemde güçlenmiş ve kalıcı bir inflamasyon varlığına işaret etmiştir.

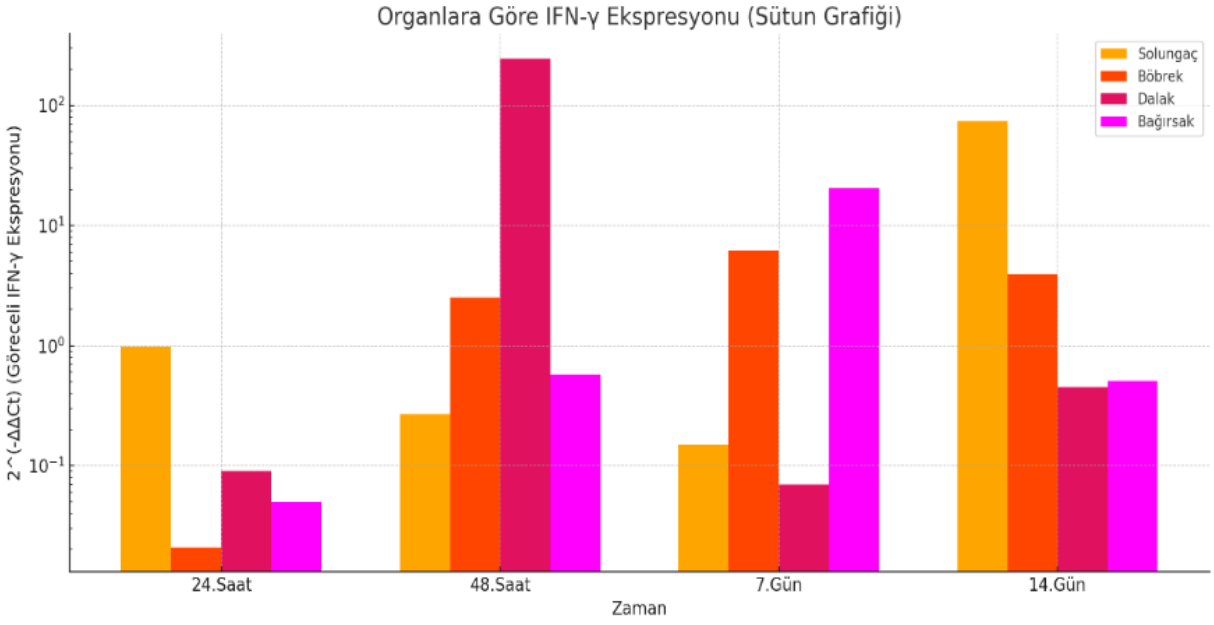
4.7.2.10 IFN-γ Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: 14. günde çok güçlü bir artış izlenmiştir. Diğer zaman noktalarında ise ekspresyon düzeyi baskılanmıştır. Bu durum, mukozal düzeyde antiviral yanıtın geç fazda aktive olduğunu göstermektedir.

Ön Böbrek: 48. saatten itibaren başlayan ekspresyon artışı, 14. günde yüksek seviyelere ulaşarak sistemik düzeyde antiviral yanıtın geç dönemde etkinleştiğini göstermektedir.

Dalak: 48. saatte çok güçlü bir ekspresyon artışı kaydedilmiş, ancak 7. günde belirgin bir baskılanma izlenmiştir. Bu, dalaktaki IFN-γ yanıtının geçici ve düzensiz seyrettiğini göstermektedir.

Bağırsak: 7. günde çok güçlü bir artış izlenmiş, diğer zaman noktalarında ise baskılanma egemen olmuştur. Mukozal antiviral yanıtın geç dönemde kısa süreli bir aktivasyon gösterdiği anlaşılmaktadır.



Şekil 126. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanması sonrasında, IFN-γ gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün

arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

IFN-γ, viral ve hücre içi bakteriyel enfeksiyonlara karşı Th1 hücre yanıtı ve makrofaj aktivasyonu ile ilişkili temel bir sitokindir.

Y. ruckeri O1 BT2 banyo aşısı uygulamasını takiben ön böbrek ve solungaç dokularında 14. günde gözlenen güçlü IFN-γ ekspresyonu, geç fazda antiviral/antibakteriyel immün yanıtın aktive edildiğini göstermektedir. Özellikle ön böbrekteki yüksek ekspresyon, sistemik bağışıklık yanıtının bu dokuda etkinleştiğine işaret ederken, bağırsakta 7. günde ortaya çıkan pik, mukozal düzeyde IFN-γ aracılı savunmanın gecikmeli ama güçlü şekilde başladığını göstermektedir.

Dalakta ise geçici ve sınırlı bir ekspresyon profili gözlenmiş, bu durum sistemik bağışıklıkta IFN-γ'nin zamana bağlı kısa süreli etkisini yansıtıyor olabilir.

Bulgular, IFN-γ'nin aşılama sonrası özellikle geç fazda etkinleşerek hücresel bağışıklıkta önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır.

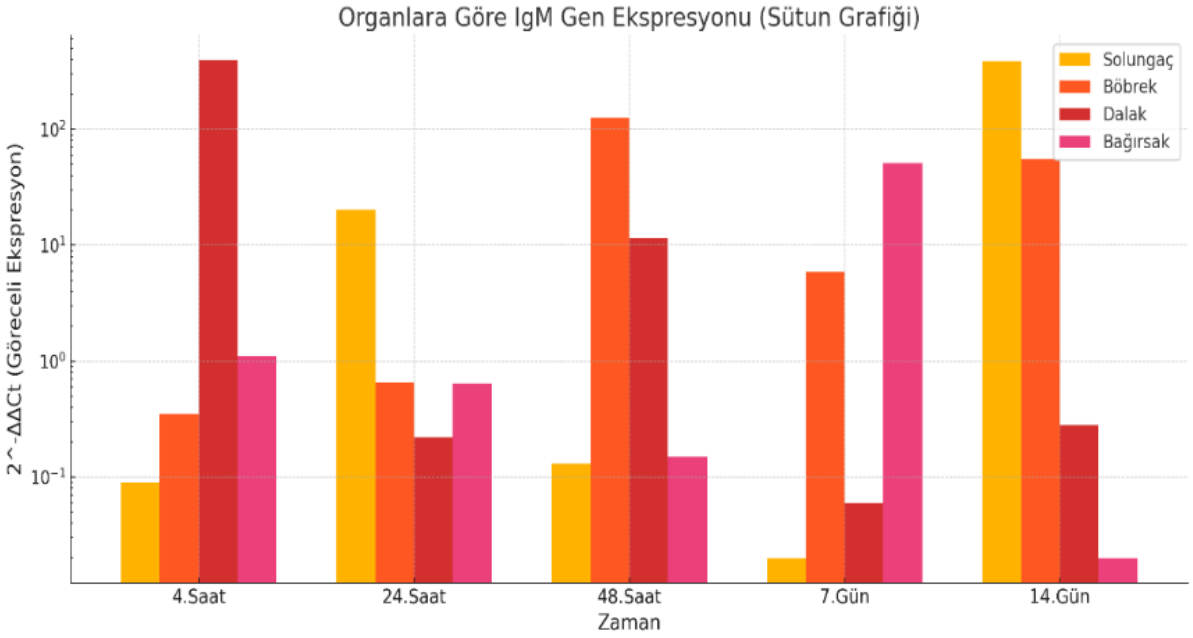
4.7.2.11 IgM Gen Ekspresyon Sonuçları

Solungaç: 24. saatte ve 14. günde güçlü ekspresyon artışları gözlenmiştir. Diğer zaman noktalarında ise baskılanma izlenmiştir. Bu sonuçlar, mukozal IgM yanıtının geç dönemde belirginleştiğini göstermektedir.

Ön Böbrek: 48. saatten itibaren artış gösteren IgM ekspresyonu, 14. günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Sistemik humoral yanıtın geç fazda güç kazandığı görülmektedir.

Dalak: 4. saatte başlayan güçlü bir ekspresyon artışı, sonraki zamanlarda baskılanma ve ardından 48. saatte yeniden artış şeklinde iki fazlı bir yanıt paterni ortaya koymuştur. Bu durum, dalakta çift fazlı bir IgM yanıtının oluştuğunu göstermektedir.

Bağırsak: 7. günde güçlü ekspresyon artışı gözlenmiş, 14. günde ise ekspresyonun baskılandığı belirlenmiştir. Mukozal humoral yanıt geçici ve sınırlı kalmıştır.



Şekil 127. *Y. ruckeri* O1 BT2 banyo aşısı uygulanması sonrasında, CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

CD4-1 geni, yardımcı T hücre (Th) aktivitesini belirleyen önemli bir belirteçtir. BT2 aşısı sonrası ön böbrek ve solungaçta 14. günde gözlenen belirgin ekspresyon artışı, sistemik ve mukozal düzeyde geç faz Th hücre yanıtının aktifleştiğini ortaya koymaktadır.
Bağırsakta 7. günden itibaren süregelen artış, mukozal adaptif bağışıklığın geliştiğini göstermektedir.
Dalağın ise erken dönemde baskılanma, 48. saatte geçici aktivasyon sergilemesi, CD4+ hücrelerin dalakta geçici ve sınırlı bir rol oynadığını göstermektedir.
Bu bulgular, BT2 banyo aşısının özellikle geç dönemde CD4+ T hücre aracılı yanıtları tetikleyebildiğini göstermektedir.

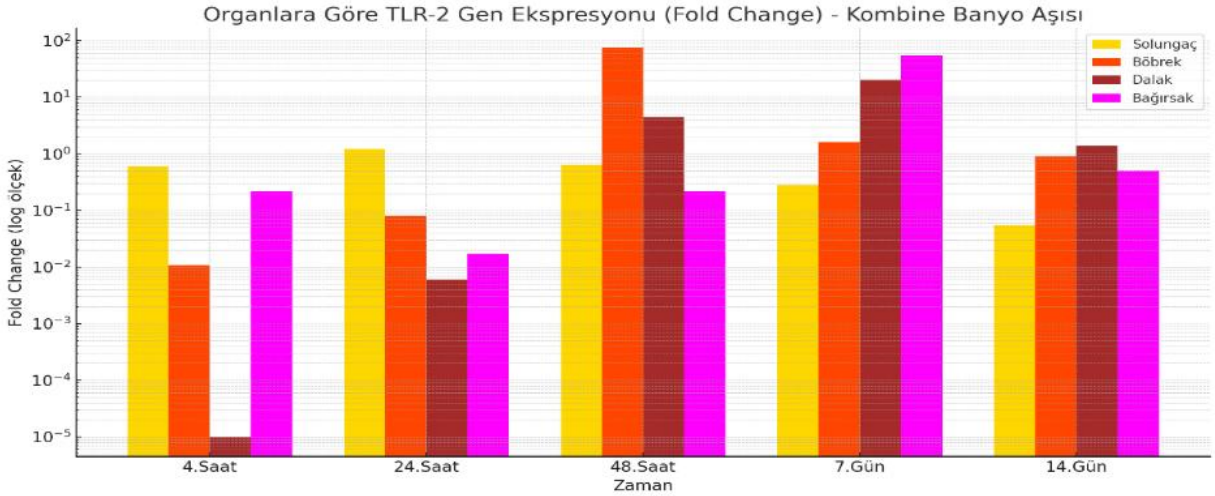
4.7.3 *Y. ruckeri* O1 İnaktif Bivalan Emülsiyon Banyo Aşı Gen Ekspresyon Bulguları

4.7.3.1 TLR-2 Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: Erken dönemlerde hafif ve belirgin düzeyde baskılanma izlenmiştir. Özellikle 14. günde çok güçlü baskılanma kaydedilmiştir. Bu durum, mukozal doğuştan bağışıklık yanıtının baskılandığını ve aşıya karşı belirgin bir TLR-2 aracılı uyarının oluşmadığını göstermektedir.
Ön Böbrek: 4. ve 24. saatlerde çok güçlü baskılanma gözlenmiş, bunu takiben 48. saatte TLR-2 ekspresyonunda keskin bir artış izlenmiştir. 14. günde ise ekspresyon düzeyinin normale döndüğü saptanmıştır. Sistemik doğuştan bağışıklık yanıtı erken fazda baskılanmış, orta fazda aktive olmuş, geç fazda ise stabilizasyon göstermiştir.

Dalak: Erken zaman noktalarında (4. ve 24. saat) çok güçlü baskılanma izlenmiş, 48. saat ve 7. günde ise ekspresyonda artış gözlenmiştir. Bu bulgular, dalakta geç fazda sınırlı bir TLR-2 aracılı yanıtın geliştiğine işaret etmektedir.

Bağırsak: Erken dönemlerde ekspresyon düzeyleri baskılanmış, 7. günde çok güçlü bir artış izlenmiştir. Ancak 14. günde tekrar baskılanma gözlenmiştir. Bu bulgular, bağırsakta TLR-2 aracılı doğuştan bağışıklık yanıtının geçici ve dalgalı bir karakter taşıdığını göstermektedir.



Şekil 128. *Y. ruckeri* O1 BT1 kombine banyo aşısı uygulanması sonrasında, TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

LR-2 (Toll-benzeri reseptör 2), Gram-pozitif ve bazı Gram-negatif bakterilere ait hücre duvarı bileşenlerini (ör. lipoproteinler, peptidoglikan) tanıyan, doğuştan bağışıklık sisteminin önemli bir paterin tanıyıcı reseptörüdür.

Bu çalışmada, kombine banyo aşı uygulaması sonrasında:

Ön böbrekte, 4. ve 24. saatlerde çok güçlü baskılanma, 48. saatte ise yüksek ekspresyon artışı, ardından 14. günde normale dönüş gözlenmiştir. Bu durum, sistemik doğuştan bağışıklığın dalgalı ancak erken uyarılan bir profile sahip olduğunu göstermektedir.

Dalakta, erken zamanlarda baskılanma, 48. saat ve 7. günde ise belirgin artış gözlenmiştir. Bu desen, dalağın geç dönem doğuştan bağışıklık cevabında rol oynadığını göstermektedir.

Solungaçta, özellikle 14. günde çok güçlü baskılanma, mukozal düzeyde doğuştan bağışıklığın baskılandığını işaret etmektedir.

Bağırsakta, 7. günde güçlü bir artış görülmüş, diğer zamanlarda baskılanma izlenmiştir. Bu durum, lokal mukozal TLR-2 cevabının kısa süreli ve geçici bir aktivasyonla sınırlı kaldığını göstermektedir.

Bu sonuçlar, *Y. ruckeri* O1 kombine banyo aşısının, TLR-2 üzerinden doğuştan bağışıklık sistemini özellikle ön böbrek ve dalakta geçici ve fazlı bir şekilde aktive ettiğini, solungaçta ise TLR-2 aracılı sinyallemenin baskılandığını göstermektedir. Bu desen, aşının mukozal tolerans

ve sistemik immün modülasyon arasında dengeleyici bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

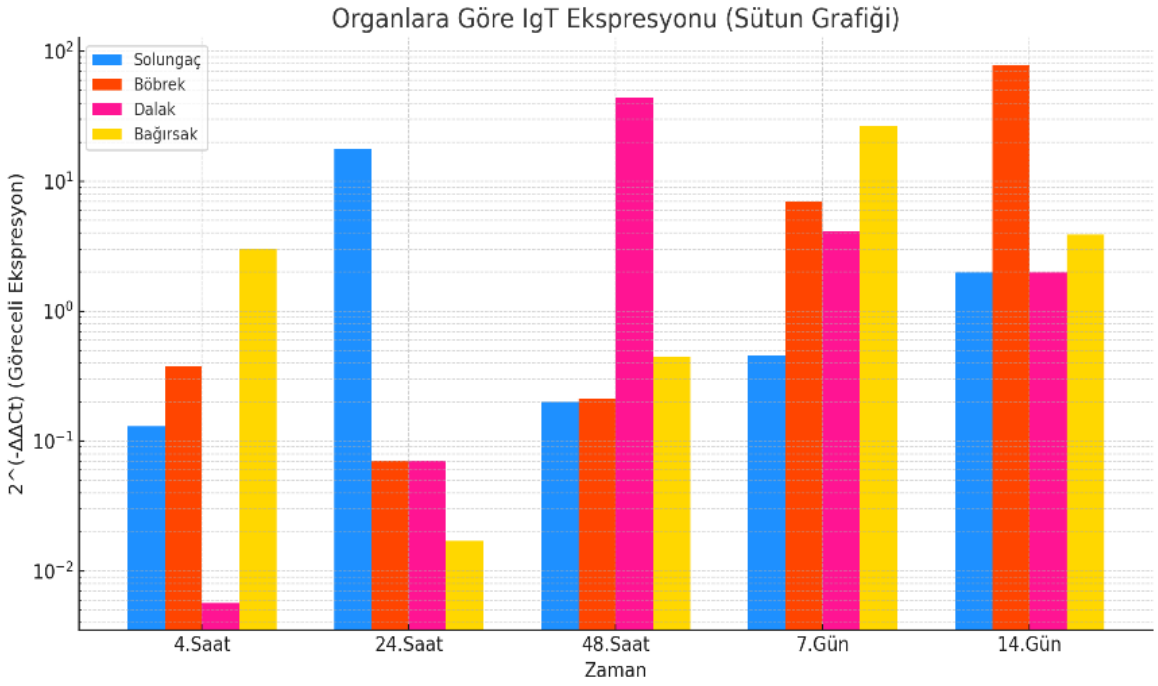
4.7.3.2 IgT Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: 24. saatte güçlü bir ekspresyon artışı izlenmiş, 14. günde ise baskılanma eğilimi gözlenmiştir. Mukozal IgT yanıtı geçici olmuştur.

Ön Böbrek: 48. saatte çok güçlü artış izlenmiş, 7. ve 14. günlerde ise ekspresyon düzeyleri normale dönmüştür. Sistemik IgT yanıtı pik yaparak sonlanmıştır.

Dalak: 48. saatte artış gözlenmiş, diğer zaman noktalarında baskılanma eğilimi belirginleşmiştir. IgT yanıtı kısa süreli olarak aktive olmuştur.

Bağırsak: 7. günde çok güçlü artış, 14. günde ise belirgin baskılanma izlenmiştir. Mukozal IgT yanıtı geç dönemde keskin bir pik göstermiştir.



Şekil 129. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulamasını takiben, IgT gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

IgT (Immunoglobulin T), teleost balıklarda mukozal yüzeylerde görev alan temel bir immünoglobulindir ve özellikle solungaç, bağırsak gibi mukozal dokularda patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturur.

Bu çalışmada, *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulaması sonrası elde edilen ekspresyon profiline göre:

Solungaçta, 24. saatte belirgin artış sonrası IgT ekspresyonu baskılanmış; ancak 14. günde yeniden artış eğilimi göstermiştir. Bu durum, geç dönemde yeniden mukozal IgT yanıtının aktive olduğunu düşündürmektedir.

Ön böbrekte, ilk üç zaman noktasında ekspresyon düzeyleri baskılı iken, 7. ve 14. günlerde güçlü IgT artışı gözlenmiştir. Bu bulgu, sistemik mukozal IgT yanıtının geç fazda aktive olduğunu göstermektedir.

Dalakta, erken dönemde baskılanma, 48. saatten itibaren ise istikrarlı ve giderek artan IgT ekspresyonu izlenmiştir. Bu desen, dalakta geç dönem IgT aracılı humoral yanıtın oluştuğunu göstermektedir.

Bağırsakta, 4. saatte başlayan ekspresyon artışı, 24. saatte geçici baskılanma, 7. ve 14. günlerde ise yüksek ekspresyon düzeyleri ile IgT yanıtının geç dönemde yeniden aktive olduğunu göstermektedir.

Bu sonuçlar, **kombine BT1–BT2 banyo aşısının**, IgT üzerinden özellikle **geç dönem mukozal ve sistemik humoral bağışıklığı uyardığını**, ayrıca IgT cevabının **dokuya özgü ve zamanla değişen** bir profile sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

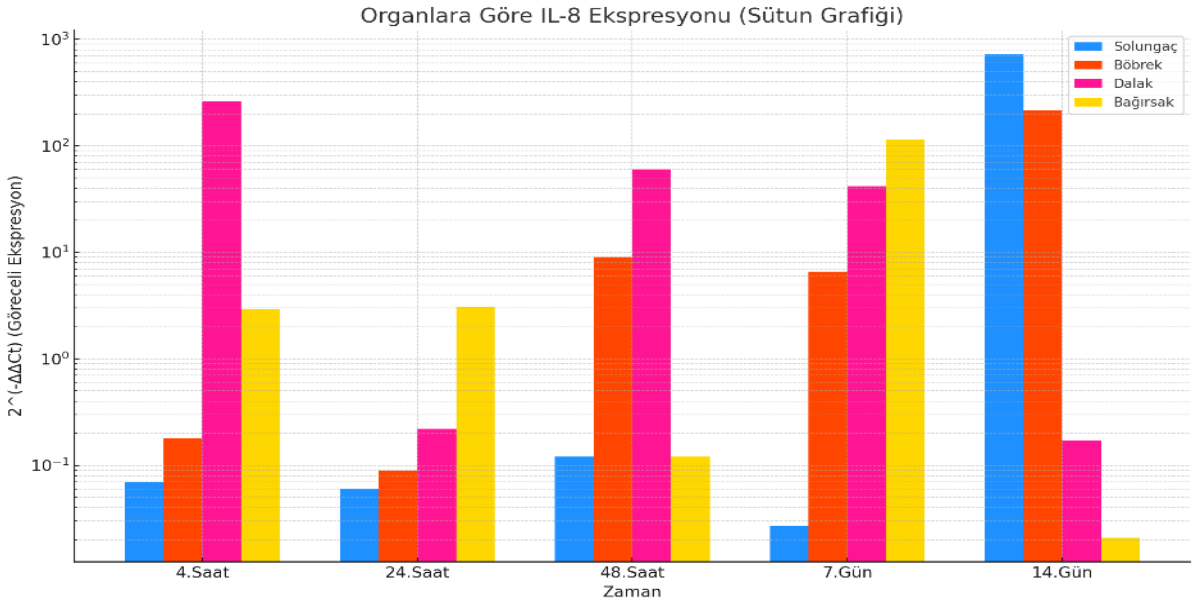
4.7.3.3 IL-8 Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: Erken dönemlerde düşük düzeyde ekspresyon görülmüş, 14. günde çok güçlü artış izlenmiştir. Mukozal inflamatuar yanıt geç dönemde belirginleşmiştir.

Ön Böbrek: 48. saatte ve 14. günde belirgin ekspresyon artışı gözlenmiştir. Sistemik IL-8 düzeyleri geç dönemde en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

Dalak: 4. saatte ve 48. saatte artış izlenmiş, 14. günde baskılanma gözlenmiştir. Dalakta IL-8 cevabı geçici ve dalgalı seyretmiştir.

Bağırsak: 7. günde çok güçlü artış izlenmiş, 14. günde ise ekspresyon baskılanmıştır. Mukozal inflamasyon kısa süreli etkinleşmiştir.



Şekil 130. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulamasını takiben, IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Bu çalışmada *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulaması sonrası elde edilen IL-8 gen ekspresyon profiline göre:

Solungaçta, ilk zaman noktalarında IL-8 ekspresyonu baskılanmış, ancak 14. günde çok güçlü bir artış göstermiştir. Bu durum, mukozal inflamatuar yanıtın geç dönemde aktive olduğunu göstermektedir.

Ön böbrekte, 48. saatten itibaren ekspresyon düzeyinde belirgin artış eğilimi gözlenmiş ve 14. günde en yüksek düzeye ulaşmıştır. Bu bulgu, geç fazda sistemik inflamatuar yanıtın güçlendiğini ortaya koymaktadır.

Dalakta, 4. saat ve 48. saatte güçlü artışlar, 14. günde ise baskılanma gözlenmiştir. Bu desen, dalaktaki IL-8 yanıtının erken ve geç fazlar arasında dalgalı bir seyir izlediğini düşündürmektedir.

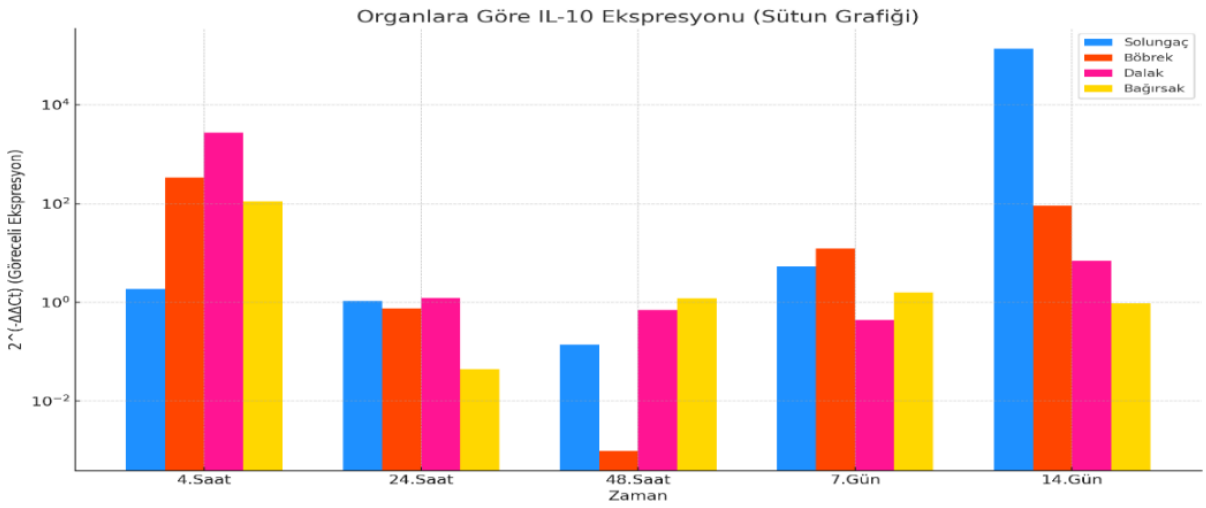
Bağırsakta, erken dönemde başlayan ekspresyon artışı, 48. saatte baskılanma, 7. günde çok güçlü pik, 14. günde ise tekrar baskılanma ile karakterizedir. Bu, mukozal IL-8 cevabının geçici ve kısa süreli inflamatuar piklerle şekillendiğini göstermektedir.

Genel olarak bu sonuçlar, kombine banyo aşısının IL-8 düzeyinde geç faz inflamatuar yanıtı özellikle sistemik (ön böbrek) düzeyde aktive ettiğini, mukozal dokularda ise daha geç ve pik şeklinde sınırlı yanıtların oluştuğunu ortaya koymaktadır.

4.7.3.4 IL-10 Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: 7. ve 14. günlerde çok güçlü artış gözlenmiştir. Mukozal anti-inflamatuar yanıt geç dönemde belirginleşmiştir.

Ön Böbrek: 4. ve 14. günlerde yüksek düzeyde ekspresyon izlenmiş, 48. saatte baskılanma görülmüştür. Sistemik IL-10 yanıtı çift fazlı bir karakter sergilemiştir.
Dalak: 14. günde artış izlenmiş, diğer zaman noktalarında ise ekspresyon düzeyi baskılı seyretmiştir. Dalakta geç dönem anti-inflamatuar aktivasyon oluşmuştur.
Bağırsak: 4. saatte artış izlenmiş, sonraki zaman noktalarında dalgalı ekspresyon gözlenmiştir. Mukozal IL-10 yanıtı erken dönemde aktive olmuştur.



Şekil 131. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulanması sonrasında, IL-10 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

IL-10, pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı üretimini baskılayan ve dokuların zarar görmesini önleyen temel bir **anti-inflamatuar sitokindir**. Balıklarda IL-10, hem sistemik hem de mukozal immün dengeyi sağlamak üzere aşılama sonrası bağışıklık regülasyonunda kritik bir rol oynar. Bu çalışmada kombine banyo aşısı (*Y. ruckeri* O1 BT1–BT2) sonrası IL-10 gen ekspresyon profiline göre:
Solungaçta, ilk saatlerde dengeye yakın ekspresyon düzeyi korunmuş, 7. ve 14. günlerde ise çok güçlü ekspresyon artışı izlenmiştir. Bu durum, mukozal anti-inflamatuar cevabın geç dönemde aktive olduğunu göstermektedir.
Ön böbrekte, 4. saatte çok güçlü artış, 48. saatte baskılanma, 14. günde ise yeniden yüksek düzeylere ulaşan bir desen gözlenmiştir. Bu, sistemik düzeyde IL-10 yanıtının dinamik ve geç fazda etkili bir baskılama mekanizması yürüttüğünü ortaya koymaktadır.
Dalakta, 4. ve 14. günlerde güçlü ekspresyon artışları izlenirken, diğer zaman noktalarında düşük seviyeler gözlenmiştir. Bu bulgular, dalakta geç dönemde gelişen anti-inflamatuar dengenin oluştuğunu desteklemektedir.

Bağırsakta, ilk saatlerde yüksek ekspresyon, 24. saatte baskılanma, sonraki dönemlerde ise dengeye dönüş gözlenmiştir. Bu da mukozal IL-10 cevabının erken aktivasyonu ile bağışıklık dengesinin sağlandığını göstermektedir.

Sonuç olarak, **kombine banyo aşısı** uygulamasının ardından **IL-10 ekspresyonunun zaman ve dokuya bağlı olarak farklı şekilde regüle edildiği**, özellikle **ön böbrek ve solungaçta geç fazda baskılayıcı bağışıklık mekanizmalarının aktive olduğu** görülmüştür. Bu durum, **inflamasyonun kontrol altına alınarak immün homeostazın sağlanmasında aşının etkili olabileceğini** düşündürmektedir.

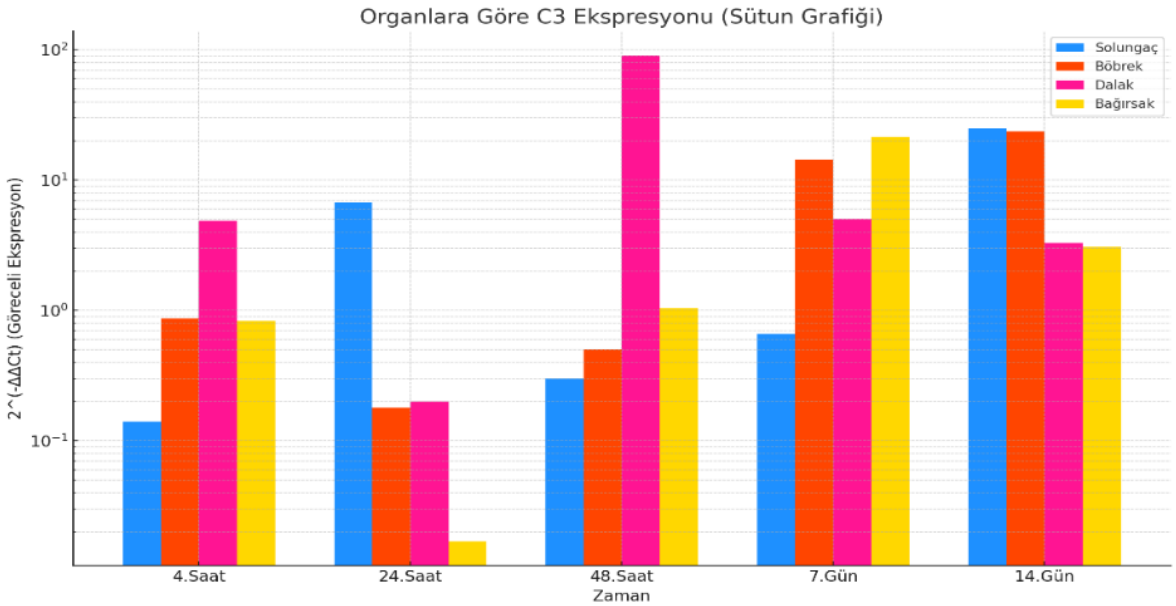
4.7.3.5 C3. Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: 24. saatte ve 14. günde ekspresyon artışı izlenmiş, diğer zamanlarda baskılanma gözlenmiştir. Mukozal kompleman yanıtı geç dönemde aktive olmuştur.

Ön Böbrek: 7. ve 14. günlerde çok güçlü artış gözlenmiştir. Sistemik kompleman yanıtı geç fazda belirginleşmiştir.

Dalak: 48. saatte artış, diğer zamanlarda düşük düzeyli ekspresyon izlenmiştir. Dalakta geç dönemde sınırlı aktivasyon oluşmuştur.

Bağırsak: 7. günde belirgin ekspresyon artışı, 14. günde ise dengeli bir düzey gözlenmiştir. Mukozal kompleman yanıtı geç dönemde etkinleşmiştir.



Şekil 132. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulanması sonrasında, C3 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

C3 (kompleman komponenti 3), hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemlerinde merkezi rol oynayan, patojen tanınması ve lizisine aracılık eden bir doğuştan bağışıklık bileşenidir.

Balıklarda C3'ün ekspresyonu, aşılamaya karşı verilen ilk immün yanıtın ve kompleman aracılı patojen eliminasyonunun göstergesi olarak değerlendirilir.

Bu çalışmada *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulamasını takiben C3 gen ekspresyonu aşağıdaki şekilde gözlenmiştir:

Solungaçta, 24. saat ve 14. günde güçlü ekspresyon artışları gözlenmiş, diğer zaman noktalarında baskılanma izlenmiştir. Bu durum, mukozal yüzeyde geç fazda etkinleşen kompleman yanıtını işaret etmektedir.

Ön böbrekte, 7. ve 14. günlerde belirgin artışlar izlenmiş, erken dönemlerde ise baskılanma gözlenmiştir. Bu, sistemik kompleman aktivasyonunun geç dönemde devreye girdiğini göstermektedir.

Dalakta, 48. saatte çok güçlü ekspresyon artışı, diğer zamanlarda da belirgin artış eğilimi izlenmiştir. Bu profil, dalakta persistente yakın bir kompleman yanıtı oluştuğunu göstermektedir.

Bağırsakta, 7. ve 14. günlerde artış izlenmiş, erken zamanlarda ise denge korunmuştur. Bu, mukozal kompleman aktivasyonunun geç dönemde uyarıldığını düşündürmektedir.

Genel olarak, C3 ekspresyon profilindeki bu zamansal farklılıklar, **kombine banyo aşısının hem lokal (solungaç ve bağırsak) hem de sistemik (ön böbrek ve dalak) bağışıklıkta kompleman sistemini geç fazda aktive ettiğini** ortaya koymaktadır. Bu da, patojen temizliğinde ve antijen sunumunda aşının etkili olduğunu desteklemektedir.

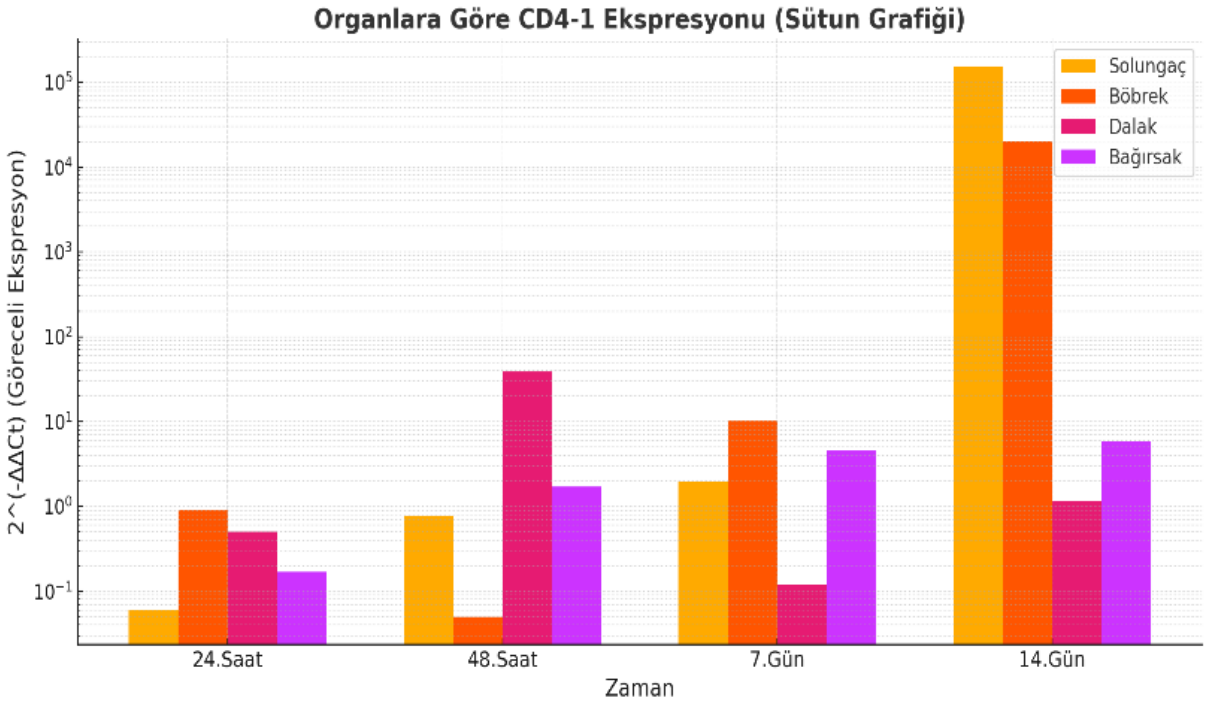
4.7.3.6 CD4-1 Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: 14. günde çok güçlü ekspresyon artışı izlenmiştir. Bu durum mukozal düzeyde geç dönemde T-helper ($CD4^+$) hücre aktivasyonunun belirginleştiğini göstermektedir.

Ön Böbrek: 14. günde maksimum düzeye ulaşan ekspresyon düzeyi, sistemik düzeyde $CD4^+$ hücre yanıtının geç dönemde aktifleştiğini ortaya koymaktadır.

Dalak: 48. saatte artış gözlenmiş, 7. günde ekspresyon düşmüş, 14. günde yeniden denge sağlanmıştır. Sistemik yardımcı T hücre yanıtı dalgalı ancak geç dönemde stabilize olmuştur.

Bağırsak: 7. ve 14. günlerde belirgin ekspresyon artışı izlenmiştir. Mukozal $CD4^+$ T hücre yanıtı geç dönemde etkinleşmiştir.



Şekil 133. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulanması sonrasında, CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

CD4-1, teleost balıklarda T yardımcı hücrelerinin (Th) bir belirteci olup, antijen tanıma, B hücre aktivasyonu ve sitokin üretimi gibi adaptif bağışıklık yanıtlarının yönlendirilmesinde kritik rol oynamaktadır. Bu genin ekspresyon seviyeleri, aşının T-hücre aracılı immün cevabı uyarıp uyarmadığını göstermesi açısından önemlidir. Yapılan analizlerde, *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulaması sonrasında CD4-1 ekspresyonunda aşağıdaki dokuya özgü ve zamana bağlı değişiklikler gözlenmiştir:

Solungaçta, 14. günde çok belirgin bir artış izlenmiş, bu durum geç dönemde mukozal T-hücre aktivasyonunu ortaya koymaktadır.

Ön böbrekte, 14. günde maksimum düzeye ulaşan ekspresyon, sistemik bağışıklıkta CD4+ T hücrelerinin aktif rol oynadığını göstermektedir.

Dalakta, 48. saatte gözlenen artışı takiben ekspresyon dalgalı bir seyir izlemiş, 14. günde yeniden dengeye ulaşmıştır. Bu, ikincil lenfoid dokuda geç faz immün modülasyonu ile uyumludur.

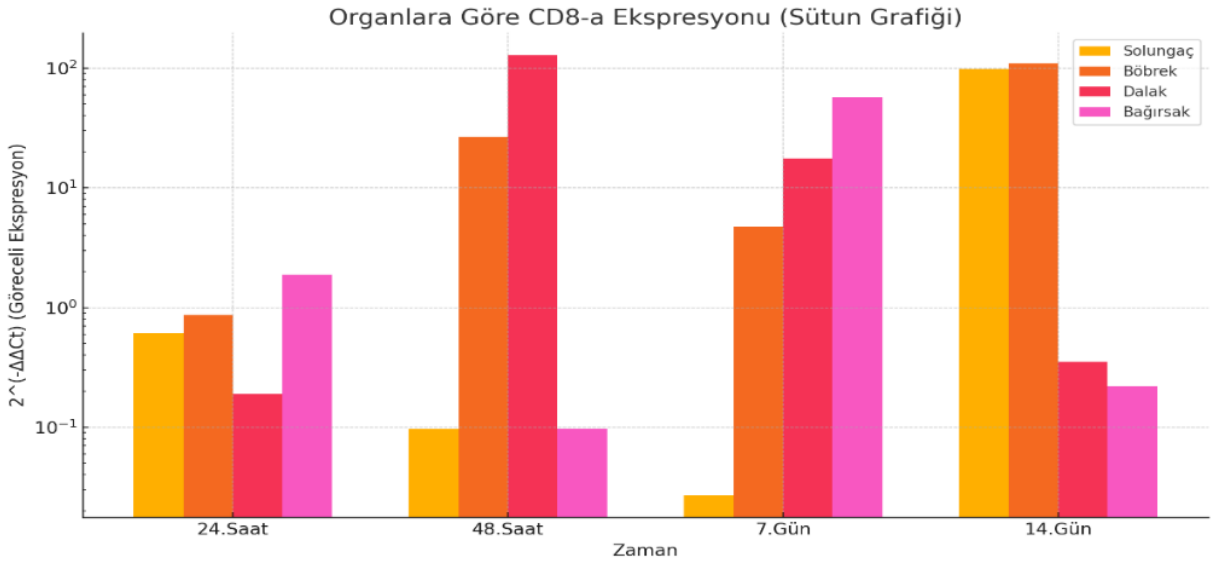
Bağırsakta, 7. ve 14. günlerdeki belirgin artış, lokal T-hücre aktivasyonunun geç dönemde güçlendiğini göstermektedir.

Bu veriler, kombine banyo aşısının yalnızca doğuştan bağışıklığı değil, aynı zamanda **Th hücre aracılı adaptif yanıtı da etkili şekilde aktive ettiğini**, bunun da **mukozal ve sistemik bağışıklıkta eş zamanlı bir CD4+ hücre yanıtı oluşturduğunu** göstermektedir. Özellikle 14.

günde gözlenen yüksek ekspresyon düzeyleri, aşının **uzamış T hücresi belleği** oluşturma potansiyelini de işaret etmektedir.

4.7.3.7 CD8-α Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: İlk üç zaman noktasında baskılanma izlenmiş, 14. günde ise çok güçlü ekspresyon artışı gözlenmiştir. Mukozal sitotoksik T hücre ($CD8^+$) yanıtı geç dönemde aktive olmuştur.
Ön Böbrek: 48. saatten itibaren artan ekspresyon 14. günde maksimum seviyeye ulaşmıştır. Bu bulgu, sistemik $CD8^+$ T hücre yanıtının geç dönemde güçlü biçimde aktive olduğunu göstermektedir.
Dalak: 48. saatte ve 7. günde artış, 14. günde baskılanma gözlenmiştir. Sistemik sitotoksik yanıt dalgalı seyir göstermiştir.
Bağırsak: 7. günde çok güçlü ekspresyon artışı izlenmiş, 14. günde ise baskılanma gözlenmiştir. Mukozal düzeyde $CD8^+$ yanıt geçici ve pik şeklinde gerçekleşmiştir.



Şekil 134. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı uygulanması sonrasında, CD8-α gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

CD8-α, sitotoksik T hücreleri (CTL) üzerinden gelişen hücre aracılı bağışıklık yanıtının önemli bir göstergesidir. Bu genin ekspresyon düzeyindeki artışlar, aşının özellikle intraselüler patojenlere karşı CTL cevabını uyarıcı etkisinin bir yansımasıdır.

- **Solungaçta**, ilk üç zaman noktasında (4., 24. ve 48. saat) baskılanmış ekspresyon dikkat çekerken, 14. günde belirgin bir artış gözlenmiş ve bu artış, geç dönemde mukozal CD8+ yanıtın aktive olduğunu göstermektedir.

- **Ön böbrekte**, 48. saatten itibaren başlayan ekspresyon artışı, 14. günde en yüksek seviyeye ulaşarak, sistemik düzeyde güçlü bir sitotoksik yanıtın varlığını ortaya koymaktadır.
- **Dalakta**, 48. saat ve 7. günde gözlenen ekspresyon artışı, 14. günde baskılanma ile sonuçlanmıştır. Bu durum, sistemik yanıtın geçici ve dokuya özgü regülasyon altında olduğunu düşündürmektedir.
- Bağırsakta, 7. günde belirgin bir artış, 14. günde ise baskılanma izlenmiştir. Bu bulgular, bağırsak mukozasında CD8+ hücre yanıtının geçici ve pik yaparak ilerlediğini göstermektedir.

Bu veriler, kombine banyo aşısının özellikle **ön böbrek ve solungaç gibi primer immün dokularda CD8+ sitotoksik yanıtı geç fazda etkinleştirdiğini**, ancak **dalak ve bağırsak gibi sekonder immün dokularda yanıtın daha sınırlı veya geçici olduğunu** ortaya koymaktadır. Bu da aşının **mukozal ve sistemik düzeyde farklı doku spesifik immün modülasyonları** başlatabildiğini göstermektedir.

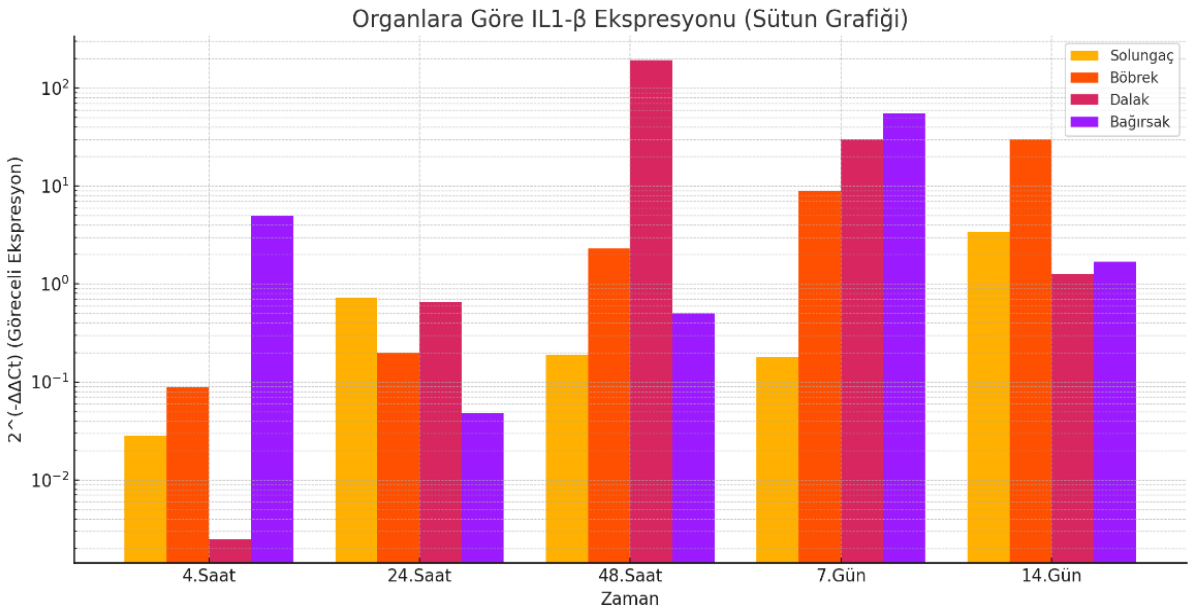
4.7.3.8 IL-1β Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: İlk dört zaman noktasında baskılanma izlenmiş, yalnızca 14. günde ekspresyon artışı kaydedilmiştir. Mukozal inflamatuar yanıt geç dönemde aktive olmuştur.

Ön Böbrek: 48. saatten itibaren başlayan ekspresyon artışı, 14. günde çok güçlü düzeylere ulaşmıştır. Sistemik inflamatuar yanıt geç dönemde güç kazanmıştır.

Dalak: 48. saat ve 7. günde çok güçlü artışlar izlenmiş, 14. günde ise ekspresyon dengeye dönmüştür. Dalakta geç dönem inflamatuar yanıt oluşmuştur.

Bağırsak: 4. saatte erken artış, 24. saatte baskılanma, 7. günde ise çok güçlü artış izlenmiştir. Mukozal yanıt erken ve geç fazlarda iki ayrı pik göstermiştir.



Şekil 135. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı ile aşılama sonrası, IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

L-1β, doğuştan bağışıklık sisteminde pro-inflamatuar yanıtların başlatılmasında rol oynayan, özellikle makrofajlar ve monositler tarafından üretilen anahtar bir sitokindir.

Bu çalışmada elde edilen gen ekspresyon düzeyleri, kombine banyo aşısının dokulara özgü inflamatuar etkisini ortaya koymaktadır:

- **Solungaç dokusunda**, erken dönemlerde (4. saat–48. saat) ekspresyonun belirgin biçimde baskılandığı, ancak 14. günde önemli bir artışla mukozal inflamatuar yanıtın geç dönemde aktive olduğu gözlenmiştir.
- **Ön böbrekte**, 48. saatten itibaren artmaya başlayan IL-1β ekspresyonu, 14. günde maksimum düzeye ulaşarak sistemik inflamatuar yanıtın geç fazda kuvvetli biçimde oluştuğunu ortaya koymaktadır.
- **Dalakta**, 48. saat ve 7. günde iki ayrı pikle güçlü ekspresyon artışları kaydedilmiş, 14. günde denge sağlanmıştır. Bu durum, dalakta geçici ve kontrollü bir inflamatuar yanıt geliştiğini düşündürmektedir.
- **Bağırsak** dokusunda, 4. saatte erken inflamatuar artış, 24. saatte baskılanma, ardından 7. günde tekrar güçlü ekspresyon ile iki fazlı bir inflamasyon profili izlenmiştir. Bu da mukozal immün yanıtın hem erken hem geç fazda devreye girdiğini göstermektedir.

Bu bulgular genel olarak, **kombine banyo aşısının IL-1β üzerinden hem mukozal hem de sistemik düzeyde gecikmeli fakat güçlü inflamatuar bir yanıt oluşturduğunu**, bunun da

aşı sonrası **doğuştan bağışıklığın uyarıldığını ve aşının immünomodülatör etkisinin** sürdürülebilir olduğunu göstermektedir.

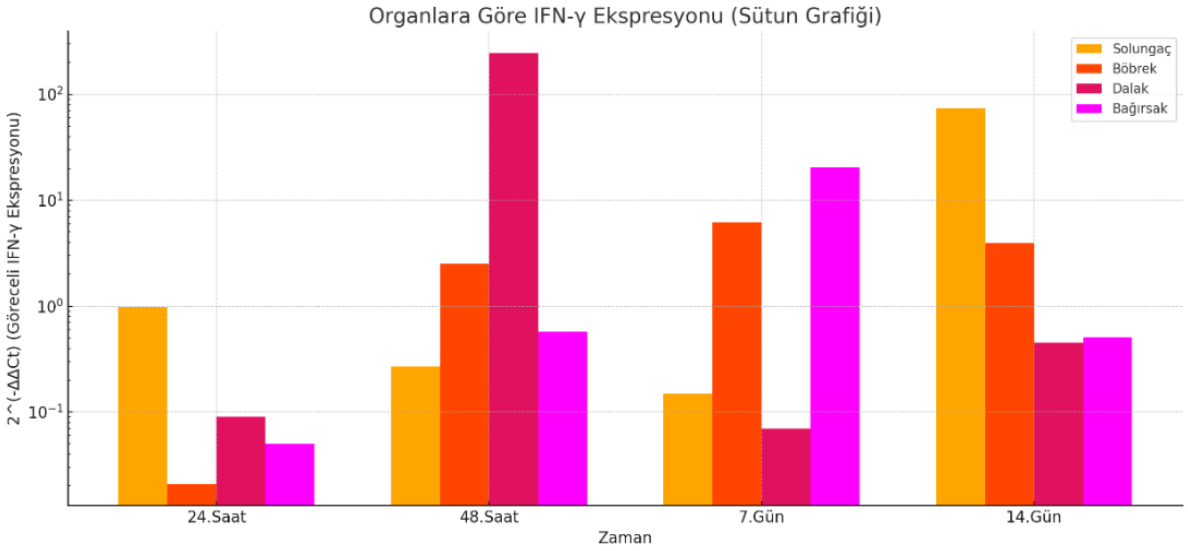
4.7.3.9 IFN-γ Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: 14. günde çok güçlü artış izlenmiş, diğer zaman noktalarında baskılanma hakimdir. Mukozal antiviral yanıt geç dönemde aktive olmuştur.

Ön Böbrek: 48. saatten itibaren ekspresyon artışı başlamış ve 14. günde yüksek düzeye ulaşmıştır. Sistemik IFN-γ yanıtı geç dönemde güçlenmiştir.

Dalak: 48. saatte çok güçlü artış gözlenmiş, 7. günde baskılanma izlenmiştir. Dalaktaki IFN-γ yanıtı geçici ve düzensizdir.

Bağırsak: 7. günde çok güçlü ekspresyon artışı, diğer zamanlarda ise baskılanma izlenmiştir. Mukozal IFN-γ yanıtı geç dönemde uyarılmıştır.



Şekil 136. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı ile aşılama sonrası IFN-γ gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

İnterferon gamma (IFN-γ), adaptif bağışıklık yanıtında özellikle **Th1 hücreleri ve doğal öldürücü hücreler (NK)** tarafından salınan temel bir **pro-inflamatuar sitokindir**. Hücresel immün yanıtın düzenlenmesinde, makrofajların aktivasyonunda ve antijen sunumunun güçlendirilmesinde rol oynar.

Kombine banyo aşısı sonrası IFN-γ ekspresyonunun dokulara göre zamana bağlı dağılımı aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir:

- **Solungaç:** Erken dönemlerde düşük düzeyde seyreden IFN-γ ekspresyonu, 14. günde çok belirgin şekilde artarak, mukozal düzeyde geç dönemde etkinleşen antiviral ve hücresel bağışıklık yanıtını yansıtmaktadır.

- **Ön Böbrek:** 48. saatten itibaren artış gösteren ekspresyon, 14. günde en yüksek seviyeye ulaşmış, bu durum sistemik hücresel bağışıklık cevabının gecikmeli fakat güçlü şekilde aktive olduğunu göstermektedir.
- **Dalak:** 48. saatte keskin bir artış, 7. günde baskılanma ve 14. günde denge gözlenmiştir. Bu desen, geçici bir sistemik yanıtın hızla aktive olup sonra kontrol altına alındığını düşündürmektedir.
- **Bağırsak: 7**. günde güçlü bir artış, 14. günde ise baskılanma gözlenmiştir. Bu durum, lokal mukozal antiviral yanıtın geçici ve sınırlı olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak bu desen, **kombine banyo aşısının IFN-γ yanıtı üzerinden özellikle geç dönemde mukozal ve sistemik düzeyde hücresel bağışıklığı aktive ettiğini**, böylece **aşının virüs ve hücre içi bakterilere karşı koruyucu potansiyelini** ortaya koymaktadır.

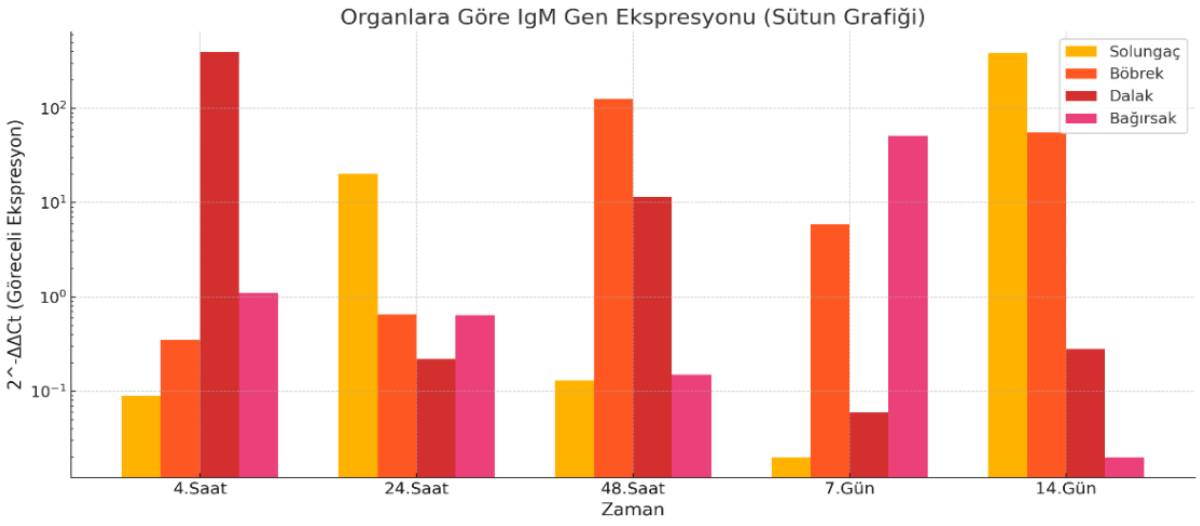
4.7.3.10 IgM Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: 24. saatte ve 14. günde belirgin ekspresyon artışı izlenmiştir. Mukozal IgM yanıtı geç dönemde güç kazanmıştır.

Ön Böbrek: 48. saatten itibaren başlayan ekspresyon artışı 14. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Sistemik humoral yanıt geç dönemde belirginleşmiştir.

Dalak: 4. saatte ekspresyon artışı gözlenmiş, sonrasında baskılanma ve 48. saatte yeniden artış izlenmiştir. Bu durum iki fazlı bir IgM yanıtını işaret etmektedir.

Bağırsak: 7. günde güçlü ekspresyon artışı gözlenmiş, 14. günde ise baskılanma meydana gelmiştir. Mukozal yanıt geçici ve sınırlı olmuştur.



Şekil 137. *Y. ruckeri* O1 BT1–BT2 kombine banyo aşısı ile aşılama sonrası IgM gen

ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Immunoglobulin M (IgM), balıklarda ilk oluşan ve genellikle sistemik primer immün yanıta aracılık eden antikordur. IgM gen ekspresyon düzeyleri, aşılama sonrası humoral bağışıklık yanıtının başlatılması ve ilerleyişini yansıtır.

Kombine banyo aşısı sonrası dokulara göre IgM ekspresyonunun zamana bağlı değişimi şu şekilde özetlenebilir:

- **Solungaç:** 24. saatte belirgin artış ile lokal mukozal humoral yanıtın erken başladığı, 14. günde tekrar yükselerek geç dönemde ikinci bir pik yaptığı gözlenmiştir. Bu durum, solungaç düzeyinde iki fazlı bir mukozal IgM yanıtını düşündürmektedir.
- **Ön Böbrek**: 48. saatten itibaren artış göstermiş ve 14. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Bu desen, sistemik humoral bağışıklığın geç dönemde güçlü şekilde aktive edildiğini göstermektedir.
- **Dalak:** 4. saatte ani bir artış, ardından geçici baskılanma ve 48. saatte yeniden yükselme gözlenmiştir. Bu, dalağın hem erken fazda hızlı bir humoral yanıt oluşturduğunu, hem de geç fazda sekonder bir aktivasyon geliştirdiğini göstermektedir.
- **Bağırsak:** 7. günde güçlü bir ekspresyon artışı, 14. günde ise baskılanma izlenmiştir. Bu sonuç, lokal mukozal yanıtın geçici ve sınırlı olduğunu göstermektedir.

Bu bulgular, **kombine banyo aşısının** hem **mukozal hem de sistemik düzeyde IgM üretimini uyarmada etkili olduğunu**, özellikle **ön böbrek ve dalakta humoral bağışıklık tepkisinin geç dönemde güçlendiğini** ortaya koymaktadır. Ayrıca solungaçta gözlenen iki fazlı IgM yanıtı, mukozal bağışıklık belleği açısından dikkate değerdir. Bu durum, kombine aşıların **primer ve sekonder humoral yanıtı stimüle etme potansiyelini** desteklemektedir.

4.7.4 *V. anguillarum* O1 İnaktif Emülsiyon Banyo Aşı Gen Ekspresyon Bulguları

4.7.4.1 TLR-2 Gen Ekspresyon Bulguları

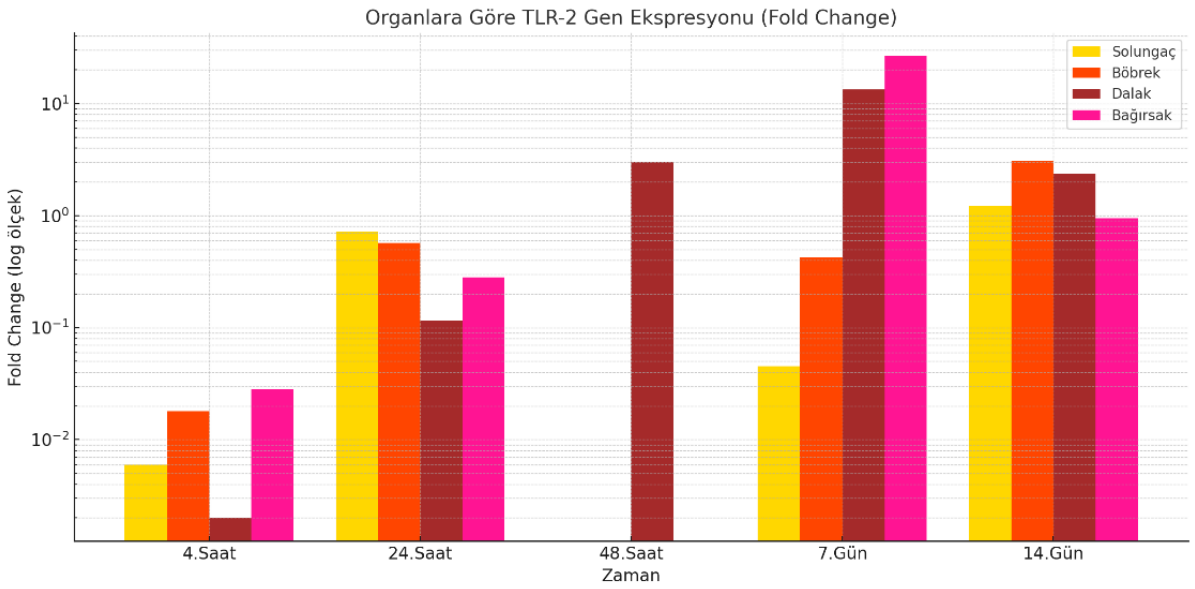
V. anguillarum etkenine yönelik immun gen ekspresyon sonuçlarına ilişkin grafikler Şekil 139-148'de sunulmuştur.

Solungaç: Erken (4–24 saat) ve orta dönemlerde (48 saat–7. gün) ekspresyon düzeyleri baskılı kalmış, yalnızca 14. günde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu bulgu, sistemik doğuştan bağışıklık yanıtının geç fazda aktive olduğunu ve aşının etkisinin zamanla ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Ön Böbrek: Erken (4. ve 24. saat) ve orta dönem (48. saat) ölçüm noktalarında **TLR-2** gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir baskılanma tespit edilmiştir. Ancak yalnızca 14. günde belirgin bir artış gözlenmiş, bu da ön böbrekte sistemik doğuştan bağışıklık yanıtının geç fazda aktive edildiğini göstermektedir.

Dalak: Ik üç zaman noktasında (4., 24. ve 48. saat) TLR-2 gen ekspresyon düzeyleri belirgin şekilde baskılanmış, ardından 7. günde keskin bir ekspresyon artışı gözlenmiştir. Bu durum, dalaktaki doğuştan bağışıklık yanıtının erken fazda inhibe edildiğini, ancak geç dönemde (7. gün) yeniden aktive olduğunu ve immün sistemin aşılama ile uyarıldığını ortaya koymaktadır.

Bağırsak: Erken zaman noktalarında (4., 24. ve 48. saat) IgT gen ekspresyon düzeylerinde belirgin bir baskılanma izlenmiştir. 7. günde ekspresyonda anlamlı ve güçlü bir artış meydana gelmiş, 14. günde ise relatif ekspresyon düzeyleri dengelenerek stabil bir seyir kazanmıştır. Bu durum, bağırsak mukozasında IgT aracılı adaptif bağışıklık yanıtının geç fazda aktive olduğunu göstermektedir.



Şekil 138. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulamasını takiben TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat – 14. gün aralığında zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

TLR-2, bakteri hücre duvarına ait lipoproteinleri ve peptidoglikan yapıları tanıyan, balıklarda **doğuştan bağışıklık sisteminin en erken yanıtlarını başlatan** önemli bir reseptördür. *V. anguillarum* gibi Gram-negatif bakterilere karşı TLR-2 aktivitesi, özellikle enfeksiyonun erken tanınması ve uygun immün yanıtın şekillenmesinde kritik rol oynamaktadır.

Doku bazlı değerlendirme şu şekildedir:

- **Solungaç:** TLR-2 ekspresyonu erken dönemlerde (4. saat ve 24. saat) düşük düzeyde seyretmiş, ancak 14. günde belirgin bir artış göstermiştir. Bu durum, mukozal bariyerde geç dönem doğuştan bağışıklık aktivasyonunun ortaya çıktığını düşündürmektedir.
- **Ön Böbrek:** Erken zaman noktalarında baskılanmış olan ekspresyon seviyesi, 48. saatten itibaren artış eğilimi göstermiş ve 14. günde en yüksek düzeye ulaşmıştır. Bu desen, sistemik doğuştan bağışıklık yanıtının aşının etkisiyle geç dönemde uyarıldığını göstermektedir.
- **Dalak:** Ekspresyon düzeyleri, 48. saatte belirgin artış, 7. günde stabilizasyon ve 14. günde artmış düzeyin korunması şeklinde seyretmiştir. Bu, dalaktaki immün hücre populasyonlarında ***V. anguillarum'***a özgü doğuştan **tanımanın geç dönemde arttığını** ortaya koymaktadır.
- **Bağırsak:** Erken dönemlerde düşük düzeyde seyreden ekspresyon, 7. günde pik yapmış, 14. günde ise dengeli bir düzeyde kalmıştır. Bu bulgu, mukozal doğuştan yanıtın lokal düzeyde geç dönemde aktive edildiğini ve ardından dengeye ulaştığını göstermektedir.

V. anguillarum O1banyo aşısı, TLR-2 gen ekspresyonunu farklı dokularda farklı zaman noktalarında modüle ederek **hem mukozal hem sistemik doğuştan bağışıklık yanıtlarını geç dönemde aktive etmektedir.** Özellikle 7. ve 14. günlerde gözlenen ekspresyon artışı, **aşının bağışıklık sistemi tarafından geç tanınarak işlenmesi ve adaptif immün yanıtların öncüllerinin hazırlanması açısından önemlidir.** Bu profil, TLR-2'ye bağlı yanıtların inflamatuvar düzenlemelerde ve antijen sunumu öncesinde rol aldığını desteklemektedir.

4.7.4.2 IL-8 Gen Ekspresyon Bulguları

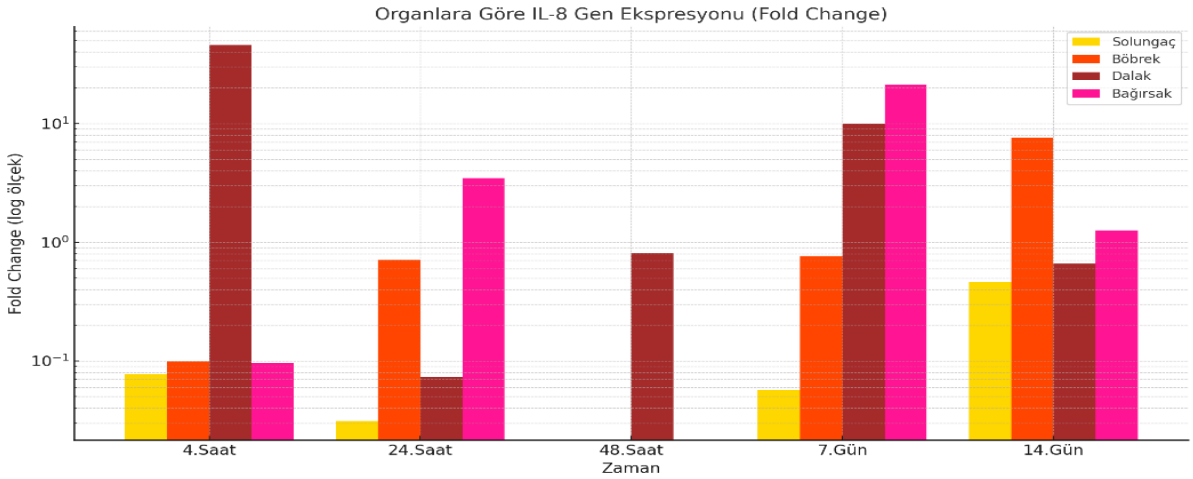
Solungaç: Tüm zaman noktalarında baskılanmış ekspresyon profili sergilenmiş, yalnızca 14. günde hafif düzeyde toparlanma eğilimi gözlenmiştir. Bu durum, mukozal yüzeyde proinflamatuar yanıtın aşı sonrası erken ve orta dönemlerde baskılandığını, geç dönemde ise sınırlı düzeyde yeniden aktive olduğunu düşündürmektedir.

Ön Böbrek: 4., 24. ve 48. saatlerde düşük ekspresyon seviyeleri izlenirken, yalnızca 14. günde belirgin bir artış gözlenmiştir. Sistemik inflamatuar yanıtın baskılı seyrettiği, ancak geç dönemde aktive olduğu anlaşılmaktadır.

Dalak: 4. ve 7. günlerde belirgin IL-8 ekspresyon artışı izlenmiş, 24. saatte ise baskılanma kaydedilmiştir. Bu bulgular, dalakta zamana bağlı olarak dalgalı ancak geç dönemde etkili bir proinflamatuar yanıtın oluştuğunu göstermektedir.

Bağırsak: Mukozal bağışıklıkla bağlantılı olan bağırsakta, IL-8 ekspresyon düzeyleri başlangıçta inhibe edilmiş ancak 7. ve 14. günlerde anlamlı şekilde artış göstermiştir. Bu durum, *V. anguillarum* O1 banyo aşısının, mukozal inflamatuar yanıtı erken fazda baskılarken,

geç dönemde nötrofil kemotaksisi ve proinflamatuar sitokin üretimini yeniden uyararak mukozal immün aktivasyon sağladığını düşündürmektedir.”



Şekil 139. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulamasını takiben, IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasında zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

IL-8, özellikle nötrofil kemotaksisi ve inflamatuar sürecin erken fazlarını düzenleyen önemli bir kemokin olup, aşı uygulamalarına verilen doğuştan bağışıklık yanıtının göstergelerinden biridir. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulandıktan sonra, balığın solungaç ve ön böbrek gibi bağışıklık sisteminin ilk savunma bölgelerinde IL-8 geninin aktivitesi (ekspresyonu) başlangıçta baskılanmıştır. Bu durum, aşının bağışıklık sistemini uyarırken aşırı iltihaplanmayı (inflamasyonu) engelleyecek şekilde dengeli bir yanıt oluşturduğunu düşündürmektedir. Ancak 14. günde IL-8 düzeylerinde yeniden artış gözlenmiştir. Bu geç dönemdeki artış, bağışıklık sisteminin daha uzun süreli ve hedefe yönelik savunma yanıtını (adaptif bağışıklık) başlatacak kadar sitokin üretildiğini göstermektedir. Yani aşı, ilk başta inflamasyonu sınırlayıp daha sonra kontrollü bir şekilde bağışıklığı güçlendiren bir etki yaratmıştır**.**

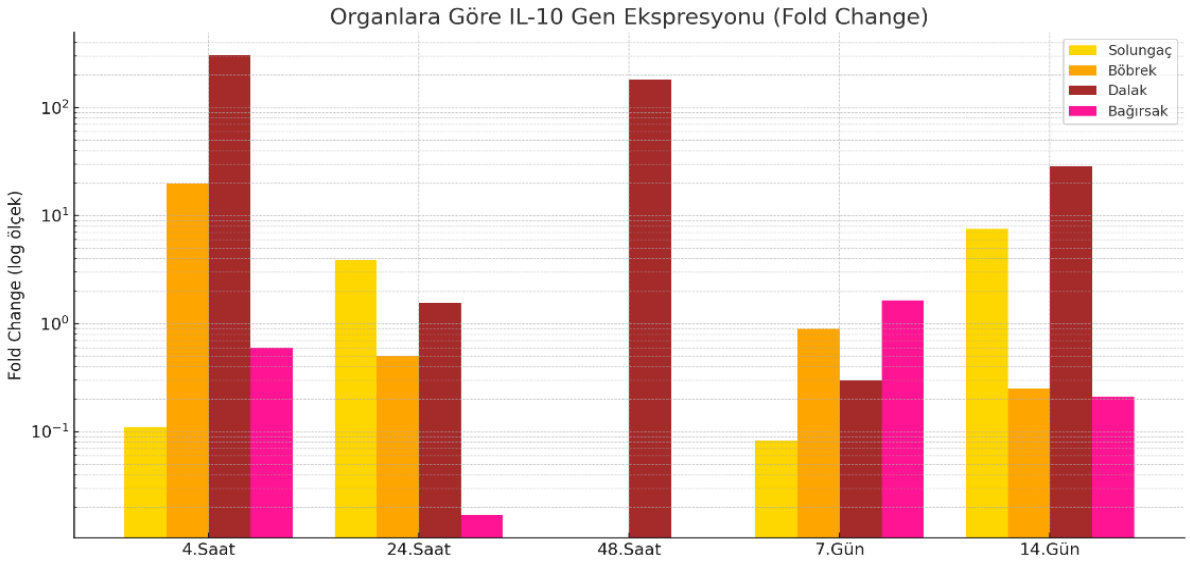
4.7.4.3 IL-10 Gen Ekspresyon Bulguları

Solungaç: IL-10 gen ekspresyonu 4. ve 7. gün zaman noktalarında inhibe edilmiş, 24. saatte ve özellikle 14. günde belirgin bir artış göstermiştir. Bu durum, mukozal anti-inflamatuar yanıtın baskılandıktan sonra geç fazda aktive olduğunu göstermektedir.

Ön Böbrek: 4. saatte çok güçlü bir IL-10 ekspresyonu gözlenmiş, bunu takip eden zaman dilimlerinde ekspresyon düzeyleri baskılanmıştır. Bu bulgu, sistemik anti-inflamatuar yanıtın erken bir pik gösterdiğini ve ardından regülasyona uğradığını ortaya koymaktadır.

Dalak: **:** IL-10 gen ekspresyonu 4., 48. saat ve 14. gün zaman noktalarında anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Bu durum, dalakta sürekli ve güçlü bir anti-inflamatuar regülasyonun oluştuğunu ve aşının bağışıklık modülasyon etkisini sürdürdüğünü göstermektedir.

Bağırsak: 24. saatte ekspresyon düzeyleri baskılanmış, diğer zaman noktalarında artış eğilimi göstermiştir. Bu bulgu, mukozal dokuda IL-10 yanıtının zamana bağlı olarak dalgalı bir seyir izlediğini ve lokal anti-inflamatuar mekanizmaların geçici olarak aktive olduğunu düşündürmektedir.



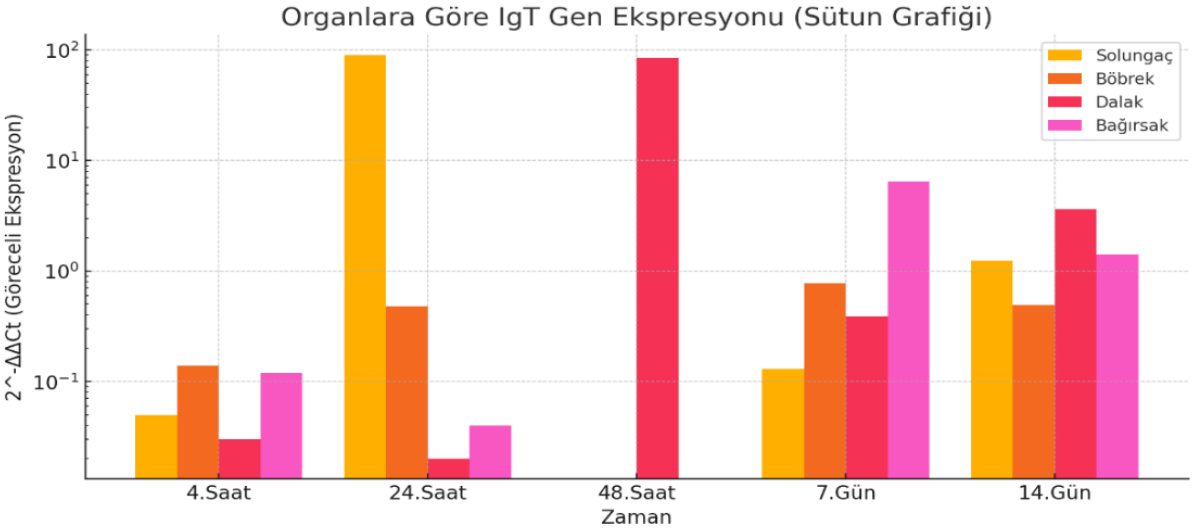
Şekil 140. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben IL-10 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

V. anguillarum O1 banyo aşısı sonrasında **IL-10 ekspresyon düzeyleri**, dokuya ve zamana bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Solungaç ve bağırsak gibi mukozal dokularda geç dönemde anti-inflamatuar yanıtların aktive olması, aşının lokal immün regülasyona katkı sağladığını göstermektedir. Sistemik bağışıklık merkezlerinden biri olan ön böbrekte erken bir IL-10 pikine rağmen, ekspresyon düzeylerinin hızla baskılanması, doğuştan gelen yanıtların dengelenmesine işaret etmektedir. Dalakta ise IL-10 ekspresyonunun sürekliliği, aşının anti-inflamatuar bağışıklık modülasyonunu kalıcı şekilde desteklediğini düşündürmektedir.
Bu bulgular, banyo aşısının **hem lokal hem sistemik düzeyde immün homeostazın sağlanmasına katkıda bulunduğunu** göstermektedir.

4.7.4.4 IgT Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 24. saatte IgT ekspresyonunda belirgin bir pik gözlenmiş, diğer tüm zaman noktalarında baskılanma mevcuttur. Bu durum, **mukozal düzeyde geçici bir IgT aktivasyonunu**, ardından hızlı bir baskılanmayı yansıtmaktadır. Bu profil, aşının solungaç mukozasında sınırlı süreli bir humoral yanıt oluşturduğunu göstermektedir..

- **Ön Böbrek**: Tüm zaman noktalarında IgT ekspresyon düzeyleri baskılanmıştır. Bu bulgu, **sistemik düzeyde plazma hücre yanıtının ve IgT sentezinin aktivasyonunun** minimal olduğunu göstermektedir.
- **Dalak**: 48. saatte çok güçlü bir ekspresyon artışı ve 14. günde yeniden artış gözlenmiştir. Bu durum, sekonder lenfoid dokulardan biri olan **dalakta IgT aracılı geç dönem bir humoral yanıtın oluştuğunu** göstermektedir.
- **Bağırsak**: 7. günde belirgin, 14. günde ise daha hafif düzeyde artış gözlenmiştir. Bu eğilim, bağırsak mukozasında geç dönem **IgT temelli bir bağışıklık yanıtının aktive olduğunu** göstermektedir.



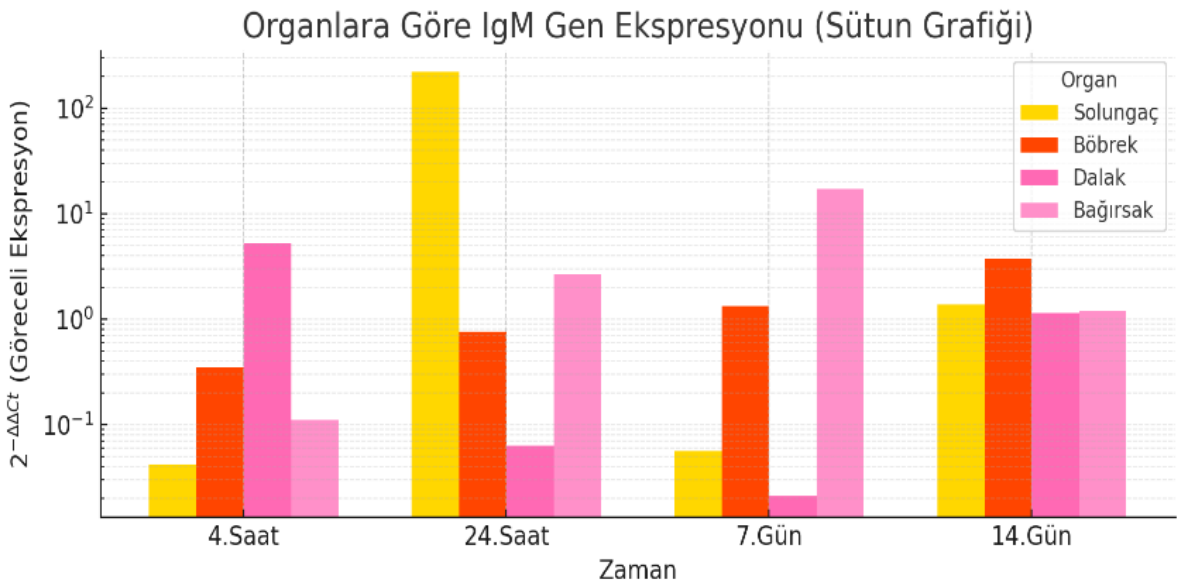
Şekil 141. *V. anguilarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben. IgT gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

V. anguillarum O1 banyo aşısı sonrasında gözlenen IgT ekspresyon profili, aşının **özellikle mukozal bağışıklıkta** geç dönemlerde etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Solungaçta gözlenen erken pik ve ardından gelen baskılanma, lokal IgT üretiminin hızlı ama sınırlı olduğunu gösterirken; dalak ve bağırsakta görülen geç dönem ekspresyon artışları, **adaptif mukozal ve sistemik IgT yanıtlarının** gecikmeli şekilde aktive olduğunu düşündürmektedir. Ön böbrekteki baskılanmış profil, sistemik IgT tepkisinin minimal kaldığını göstermektedir. Bu veriler, IgT'nin lokal mukozal koruma sağlamada daha aktif rol oynadığını desteklemektedir.

4.7.4.5 IgM Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 24. saatte çok güçlü ekspresyon artışı gözlenmiştir. Diğer zaman noktalarında baskılanma hâkimdir. Bu durum, **aşılama sonrası mukozal düzeyde kısa süreli fakat güçlü bir humoral yanıtın geliştiğini** göstermektedir.

- **Ön Böbrek**: 14. günde belirgin ekspresyon artışı gözlenmiştir. Diğer zaman noktalarında ekspresyon düzeyleri dengeye yakın seyretmiştir. Bu durum, **geç dönemde sistemik IgM yanıtının aktive olduğunu** düşündürmektedir.
- **Dalak**: 4. saatte gözlenen erken ekspresyon artışını, 7. günde baskılanma takip etmiştir. Bu dalgalı profil, **dalakta erken yanıtın baskılanarak geçici kaldığını** ortaya koymaktadır.
- **Bağırsak**: 7. günde çok güçlü artış, 14. günde ise hafif düzeyde devam eden artış izlenmiştir. Bu bulgu, **mukozal IgM yanıtının geç dönemde kuvvetlenerek devam ettiğini** göstermektedir.

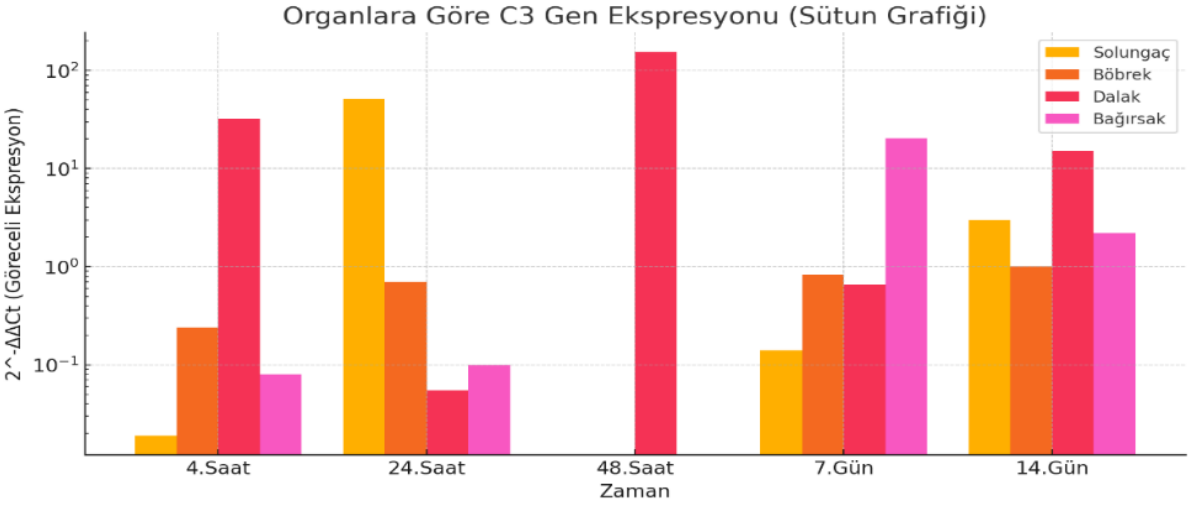


Şekil 142. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, IgM gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

V. anguillarum O1 banyo aşısı sonrası IgM gen ekspresyonu, **mukozal bağışıklıkta kısa süreli fakat güçlü bir yanıt**, sistemik düzeyde ise **gecikmeli bir aktivasyon** profili sergilemiştir. Solungaçta gözlenen erken pik, aşının mukozal immün sistemi hızla uyardığını; ön böbrek ve bağırsakta ise geç dönem IgM üretiminin devreye girdiğini göstermektedir. Bu veriler, banyo yoluyla uygulanan aşının lokal ve sistemik düzeyde farklı kinetiklerle humoral yanıt oluşturduğunu desteklemektedir.

4.7.4.6 C3 Gen Ekspresyon Bulguları

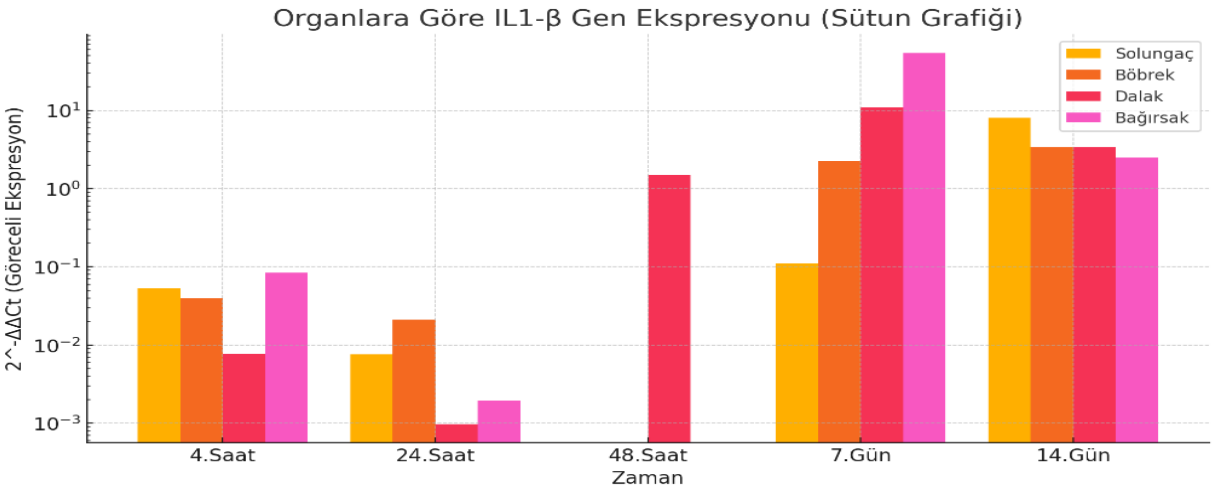
- **Solungaç**: 24. saatte belirgin, 14. günde ise daha hafif düzeyde ekspresyon artışı izlenmiştir. Bu durum, **mukozal kompleman sisteminin aşılama sonrası geç dönemde aktive olduğunu** göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: Tüm zaman noktalarında dengeye yakın veya hafif baskılanma gözlenmiştir. Sistemik C3 yanıtı düşük düzeyde kalmıştır.
- **Dalak**: 4. ve 48. saatlerde çok güçlü ekspresyon artışı izlenmiştir. Dalakta kompleman sistemi geç dönemde kuvvetli şekilde aktive olmuştur.
- **Bağırsak**: 7. günde çok güçlü artış izlenmiştir. Mukozal kompleman yanıtı geç dönemde aktive olmuştur.



Şekil 143. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, C3 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

4.7.4.7 IL-1β Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: İlk üç zaman noktasında baskılanma, 14. günde ekspresyon artışı izlenmiştir. Mukozal IL-1β yanıtı, geç dönemde belirgin inflamatuar aktiviteyle karakterizedir.
- **Ön Böbrek**: 7. ve 14. günlerde artış, erken dönemlerde baskılanma gözlenmiştir. Sistemik inflamatuar yanıt geç dönemde aktive olmuştur.
- **Dalak**: 4. ve 24. saatlerde baskılanma, 7. ve 14. günlerde artış izlenmiştir. Dalakta inflamasyon geç evrede uyarılmıştır.
- **Bağırsak**: 7. ve 14. günlerde ekspresyon artışı gözlenmiştir. Mukozal IL-1β cevabı geç fazda belirginleşmiştir.

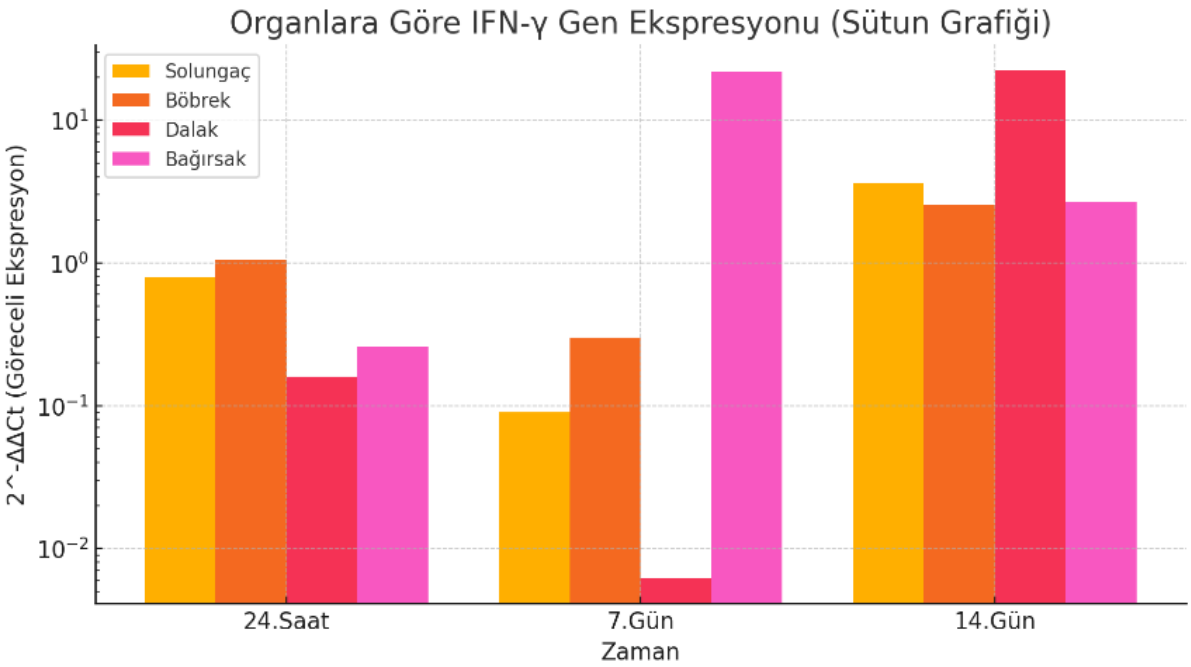


Şekil 144. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

IL-1β, inflamasyonun erken fazında görevli anahtar bir sitokindir. Bu bulgular, aşının uygulandığı mukozal ve sistemik bölgelerde geç döneme özgü bir IL-1β aktivasyonu olduğunu göstermektedir. Özellikle 7. ve 14. günlerde gözlenen artışlar, *V. anguillarum*'a karşı inflamatuar yanıtın geç fazda kuvvetlendiğine işaret etmektedir. Bu durum, banyo aşılamanın **sistemik inflamatuar hafızayı da uyarabildiğini göstermektedir**.

4.7.4.8 IFN-γ Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: Aşılama sonrası ilk üç zaman noktasında (4., 24. ve 48. saat) IL-1β gen ekspresyonunda baskılanma gözlenmiş; yalnızca 14. günde anlamlı bir ekspresyon artışı izlenmiştir. Bu durum, mukozal inflamatuar yanıtın geç fazda aktive olduğunu göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: Erken dönemlerde düşük ekspresyon seviyeleri izlenmiş; 7. ve 14. günlerde ise belirgin ekspresyon artışı kaydedilmiştir. Sistemik inflamatuar yanıtın gecikmeli bir şekilde aktive olduğu anlaşılmaktadır.
- **Dalak**: *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulamasını takiben, IFN-γ gen ekspresyonu 7. günde belirgin şekilde baskılanmış; ancak 14. günde istatistiksel olarak anlamlı ve güçlü bir ekspresyon artışı gözlenmiştir. Bu durum, dalağın geç dönemde Th1 tipi antiviral bağışıklık yanıtının merkezi bir organ olarak aktive olduğunu ve aşının sistemik immün stimülasyonu başarıyla tetiklediğini göstermektedir.
- **Bağırsak**: Mukozal düzeyde, IL-1β ekspresyonu 7. ve 14. günlerde artış göstermiştir. Bu durum, bağırsakta geç döneme özgü bir inflamatuar aktivasyon olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 145. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, IFN-γ gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

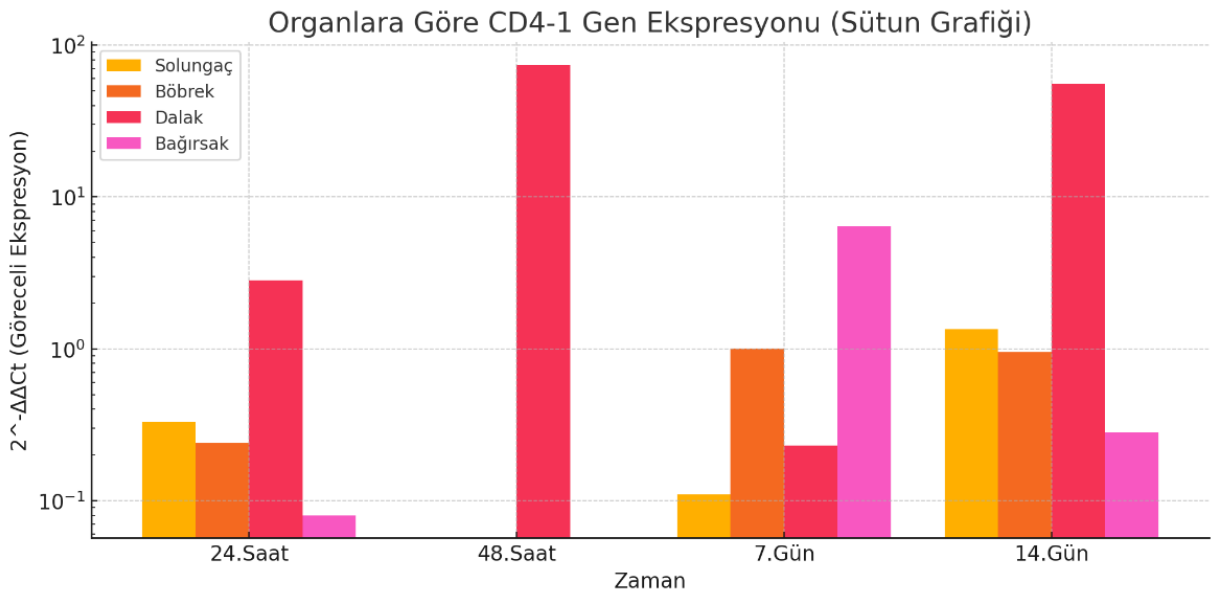
V. anguillarum O1 banyo aşısı uygulaması, IL-1β gen ekspresyonunda zamana ve dokuya bağlı olarak farklı yanıtlar oluşturmuştur. Mukozal düzeyde (özellikle solungaç ve bağırsak), IL-1β ekspresyonunun baskılanması, aşının lokal inflamatuar yanıtı ilk aşamada sınırlı tuttuğunu göstermektedir. Ancak 14. günde gözlenen ekspresyon artışları, adaptif bağışıklık yanıtlarının başlangıcına eşlik eden geç faz inflamasyonun işareti olabilir. Sistemik düzeyde (ön böbrek ve dalak), özellikle 7. ve 14. günlerde gözlenen artışlar, banyo aşısının gecikmeli olarak güçlü inflamatuar sitokin yanıtlarını tetikleyebildiğini ortaya koymaktadır.
Bu bulgular**, IL-1β'nin hem primer immün aktivasyon hem de aşının inflamatuar profilini değerlendirme açısından önemli bir biyobelirteç olduğunu** desteklemektedir.

4.7.4.9 CD4-1 Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: Tüm zaman noktalarında ekspresyon düzeyi fizyolojik sınırlara yakın seyretmiş, belirgin bir yükselme ya da baskılanma izlenmemiştir. **Bu durum** sistemik düzeyde $CD4^+$ hücrelerin aktivasyonu zayıf kalmış olduğunu, *V. anguillarum* O1 antijenlerine karşı T yardımcı hücre aracılı sistemik bir cevap oluşmadığını veya sınırlı kaldığını göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: Tüm zaman noktalarında ekspresyon düzeyi fizyolojik sınırlara yakın seyretmiş, belirgin bir yükselme ya da baskılanma izlenmemiştir. Sistemik düzeyde $CD4^+$ hücrelerin aktivasyonu zayıf kalmış, *V. anguillarum* O1

antijenlerine karşı T yardımcı hücre aracılı sistemik bir cevap oluşmamıştır veya sınırlı kalmıştır.

- **Dalak**:. 48. saat ve 14. günde CD4-1 ekspresyonunda çok güçlü artış izlenmiştir. Dalakta gözlenen bu belirgin ekspresyon artışı, antijen sunumu sonrası Th hücre aktivasyonunun ve adaptif bağışıklık yanıtının geç dönemde kuvvetle devreye girdiğini göstermektedir. Aşının immünojenik etkisi dalak düzeyinde anlamlıdır.
- **Bağırsak**: 7. günde artış izlenmiş, diğer zaman noktalarında baskılanma mevcuttur. Bağırsak mukozasında CD4-1 ekspresyonundaki bu geçici artış, lokal mukozal yanıtın kısa süreli aktive olduğunu, ancak sürdürülebilir bir adaptif aktivasyon oluşmadığını göstermektedir.



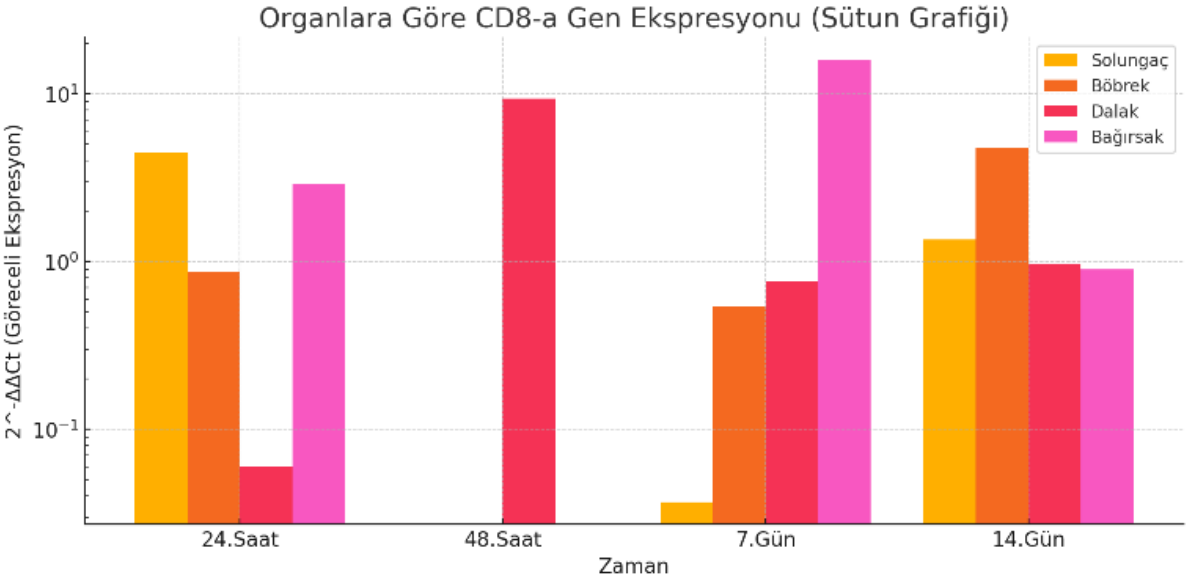
Şekil 146. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Bu sonuçlar, aşının dalak düzeyinde daha belirgin bir T yardımcı hücre yanıtı oluşturduğunu, ancak mukozal (özellikle solungaç ve bağırsak) CD4-1 hücre aktivasyonunun geçici ve zayıf kaldığını ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, mukozal bağışıklığın güçlendirilmesine yönelik adjuvan optimizasyonu veya yeniden dozlama stratejileriyle aşı etkinliğinin artırılması gerekebilir.

4.7.4.10 CD8-α Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 24. saatte artış, 7. günde baskılanma, 14. günde hafif artış izlenmiştir. Mukozal sitotoksik yanıt geçici dalgalanma göstermiştir.

- **Ön Böbrek**: 14. günde artış izlenmiş, diğer zaman noktalarında dengeye yakın değerler mevcuttur. Sistemik CD8+ yanıt geç dönemde aktive olmuştur.
- **Dalak**: 48. saatte ekspresyon artışı, 24. saatte baskılanma izlenmiştir. Dalakta sitotoksik yanıt geçici artış göstermiştir.
- **Bağırsak**: 7. günde güçlü artış izlenmiş, diğer zamanlarda denge düzeyine yakın seyir gözlenmiştir. Mukozal CD8+ yanıt geç dönemde aktive olmuştur.



Şekil 147. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulanmasını takiben, CD8-α gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Genel olarak bu bulgular, *V. anguillarum* O1 banyo aşısının CD8**-α** T hücre aktivasyonunu sınırlı düzeyde uyardığını, bu yanıtın dokuya göre farklılık gösterdiğini ve özellikle dalak ve bağırsakta geçici aktivasyonlar şeklinde seyrettiğini göstermektedir. Mukozal ve sistemik $CD8^+$ yanıtın güçlendirilmesi için adjuvan tipi, dozlama sıklığı veya booster uygulamaları gibi parametrelerin optimize edilmesi önerilebilir.

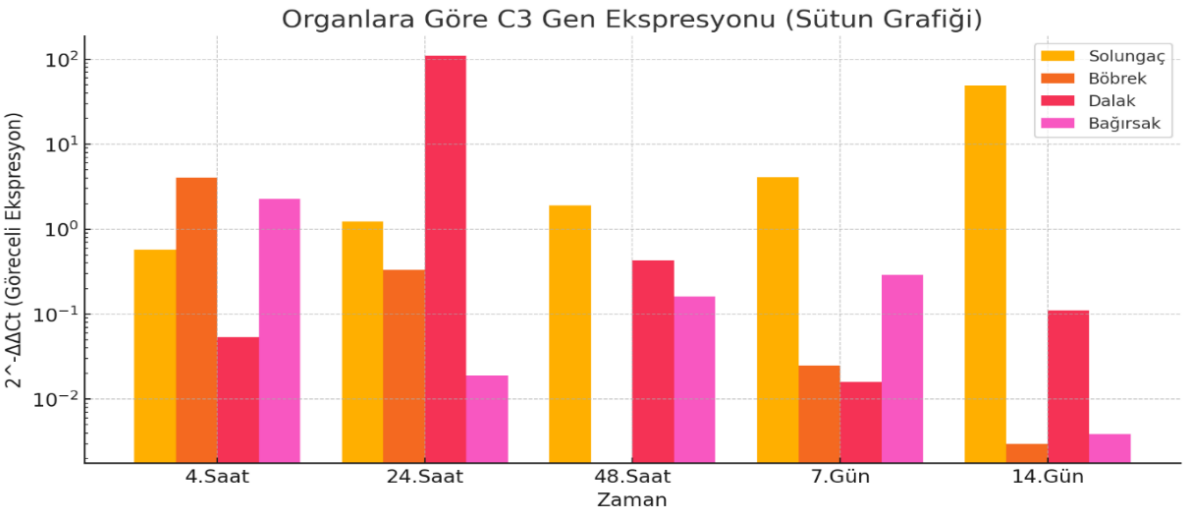
4.7.5 *L. garvieae* İnaktif Enjeksiyon Emülsiyon Aşı Gen Ekspresyon Bulguları

4.7.5.1 C3 Gen ekspresyon Bulguları

L. garvieae İnaktif Enjeksiyon Emülsiyon Aşı Gen Ekspresyon Bulgularına ait grafikler Şekil 149-158'de sunulmuştur.

- **Solungaç**: Ekspresyon düzeyinin 4. saatte baskılanmış olması, aşı uygulamasını takiben mukozal doğuştan bağışıklığın ilk aşamada suprese edildiğini göstermektedir. Ancak 14. güne kadar gözlenen istikrarlı artış, kompleman sisteminin geç fazda aktive olduğunu ve lokal bağışıklıkta rol üstlendiğini ortaya koymaktadır.

- **Ön Böbrek**: Erken dönemde gözlenen yüksek ekspresyon, aşıya karşı sistemik doğuştan bağışıklığın hızlı bir şekilde tetiklendiğini, ardından gelen baskılanma ise bu yanıtın geçici bir özellik taşıdığını göstermektedir.
- **Dalak**: 4. saatteki ani ve yüksek ekspresyon artışı, lenfoid dokuda kısa süreli fakat yoğun bir kompleman aktivasyonu oluştuğunu düşündürmektedir
- **Bağırsak**: Sadece 4. saatte artış gözlenmiş olup, bu artışın ardından gelen baskılanma mukozal C3 cevabının oldukça sınırlı ve erken evreye özgü olduğunu göstermektedir.



Şekil 148. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasınını takiben C3 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı relatif değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

L. garvieae enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben C3 gen ekspresyon düzeyleri, dokuya özgü olarak farklı zamansal paternler sergilemiştir. Kompleman sistemi içerisinde yer alan C3 komponenti, hem opsonizasyon hem de immün hücrelerin kemotaksisini sağlayarak erken doğuştan bağışıklık yanıtının temel aracılarından biridir.

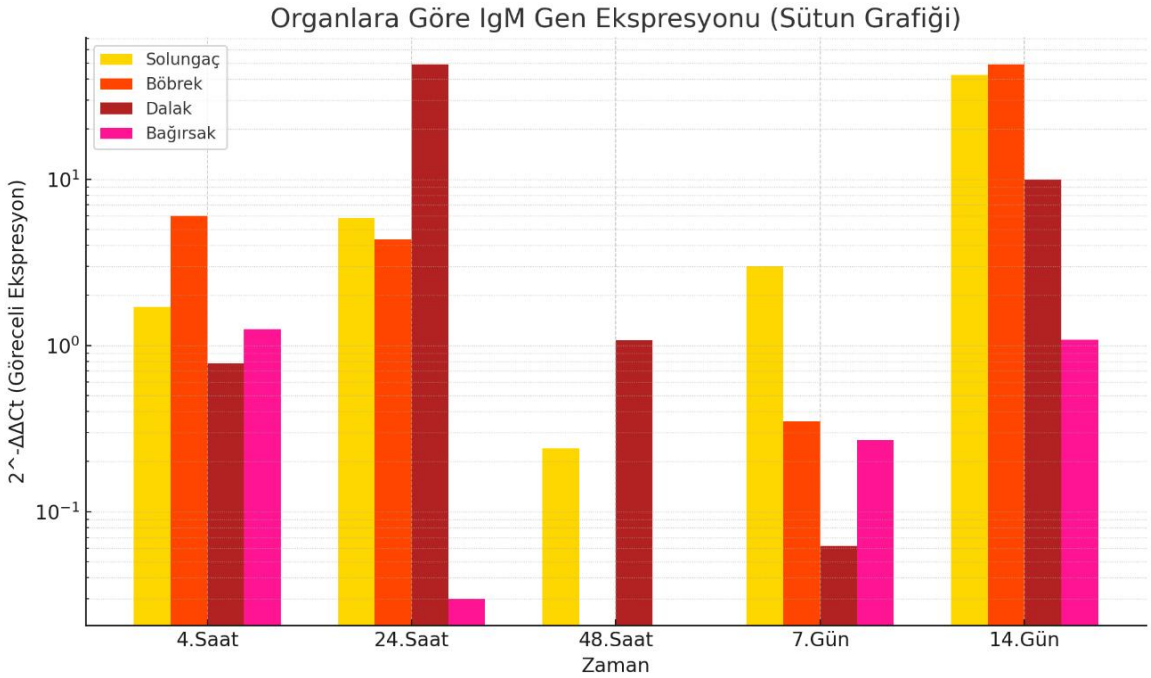
- **Solungaç dokusunda**, aşı uygulamasından sonra 14. güne kadar kademeli artış gösteren ekspresyon, mukozal yüzeylerde geç dönemde aktifleşen doğuştan bağışıklık yanıtına işaret etmektedir. Bu durum, balıklarda solungaçların hem solunum hem de patojenle ilk temas noktası olması nedeniyle **önemli bir lokal savunma rolü üstlendiğini göstermektedir.**
- **Ön böbrekte**, 4. saatteki erken aktivasyonun ardından ekspresyonun belirgin şekilde baskılanması, sistemik doğuştan bağışıklığın aşıya karşı hızlı ancak kısa süreli bir yanıt verdiğini düşündürmektedir. Bu profil, özellikle enjeksiyonla verilen inaktif aşıların ilk fazda **kompleman sistemini geçici olarak tetiklediğini, daha sonra adaptif yanıta zemin hazırladığını göstermektedir.**

- **Dalakta** 24. saatte gözlenen ani ve güçlü ekspresyon artışı, lenfoid dokunun aşı antijenlerine karşı erken fazda güçlü bir doğuştan bağışıklık tepkisi verdiğini göstermektedir. Ancak bu etkinin geçici olması, **dalakta kompleman sisteminin baskın değil, destekleyici bir rol oynadığını düşündürmektedir**.
- **Bağırsakta** ise ekspresyonun 4. saatten sonra sürekli azalma eğiliminde olması, **mukozal bağışıklığın bu aşamada kompleman aracılığıyla değil, muhtemelen diğer efektör sistemler (örneğin IgT yanıtı veya antimikrobiyal peptitler) üzerinden yürütüldüğünü ortaya koymaktadır**.

Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, **C3 ekspresyonu enjeksiyon aşısı sonrası erken ve geç faz bağışıklık etkileşimleri açısından organ-spesifik ve zaman bağlı olarak değişen bir bağışıklık modülasyonunu** ortaya koymaktadır. Aşı sonrası oluşan bu heterojen yanıt, inaktif emülsiyon aşıların sistemik immün uyarımı hızlı başlatıp, mukozal yanıtları ise geç evreye yaydığını göstermektedir. Bu sonuçlar, **teleost balıklarında aşı sonrası doğuştan bağışıklık dinamiklerinin** dokuya özgü farklılıklar taşıdığını ve özellikle C3 gibi efektör moleküllerin bağlamdan bağımsız olarak yorumlanmaması gerektiğini ortaya koymaktadır.

4.7.5.2 IgM Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 24. ve 14. günlerdeki yüksek ekspresyon düzeyleri, lokal mukozal dokuda humoral yanıtın geç dönemde aktive olduğunu ve IgM aracılı savunmanın mukozal bağışıklıkta önemli olduğunu göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: IgM yanıtı iki fazlı bir seyir göstermektedir: erken fazda yüksek ekspresyon ve geç dönemde (14. gün) çok güçlü artış, sistemik humoral bağışıklığın aşıya karşı etkili şekilde mobilize olduğunu düşündürmektedir.
- **Dalak**: 4. saat ve 14. gündeki artışlar, dalakta geç dönem adaptif humoral cevabın etkinleştiğini göstermekte; 7. gündeki baskılanma ise bu sürecin dalgalı bir yanıtla gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Dalakta aşıya karşı geç dönemde humoral bağışıklığın güçlendiği açıktır.
- **Bağırsak**: 4. saatteki baskılanma, mukozal IgM yanıtının bastırıldığını gösterirken; 14. gündeki hafif artış, bu dokuda sınırlı bir aktivasyonun geç dönemde oluştuğunu düşündürmektedir.



Şekil 149. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasınını takiben IgM gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

L. garvieae enjeksiyon aşısı sonrası IgM gen ekspresyon düzeyleri, organlara ve zamana bağlı olarak belirgin varyasyonlar göstermiştir. IgM, teleost balıklarda **ilk üretilen sistemik antikor** olup, **humoral adaptif bağışıklığın erken evre göstergesi** olarak kabul edilmektedir.

- **Solungaç dokusunda**, 24. ve 14. günlerde gözlenen ekspresyon artışları, mukozal yüzeylerde adaptif yanıtın geç evrede aktive olduğunu göstermektedir. 48. saatteki baskılanma, bu yanıtın geç başlamış ve transkriptomik düzeyde gecikmeli ilerlediğini düşündürmektedir. Bu bulgu, mukozal dokularda IgM ekspresyonunun sistemik dokulara kıyasla daha geç ve zayıf olabileceğini desteklemektedir.
- **Ön böbrekte**, erken fazda yüksek ekspresyon, ardından 7. günde baskılanma ve 14. günde tekrar güçlü artış şeklinde tanımlanan çift fazlı yanıt, tipik bir **prime ve boost** etki profili göstermektedir. Bu durum, ön böbreğin **bağışıklık sisteminin primer lenfoid organı** olarak sistemik antijen tanıma ve antikor üretiminde merkezi rol oynadığını ortaya koymaktadır.
- **Dalakta** 24. saat ve 14. günde görülen çok güçlü ekspresyon artışları, lenfoid yanıtın sistemik düzeyde sürdüğünü ve dalakta IgM transkripsiyonunun geç fazda yoğunlaştığını göstermektedir. 7. gündeki baskılanma ise geçici bir immün modülasyon sürecine işaret edebilir.
- **Bağırsakta** 24. saatteki baskılanma, muhtemelen lokal tolerans veya inflamatuar düzenleme ile ilişkilidir. 14. gündeki sınırlı artış ise mukozal bağışıklığın geç evrede

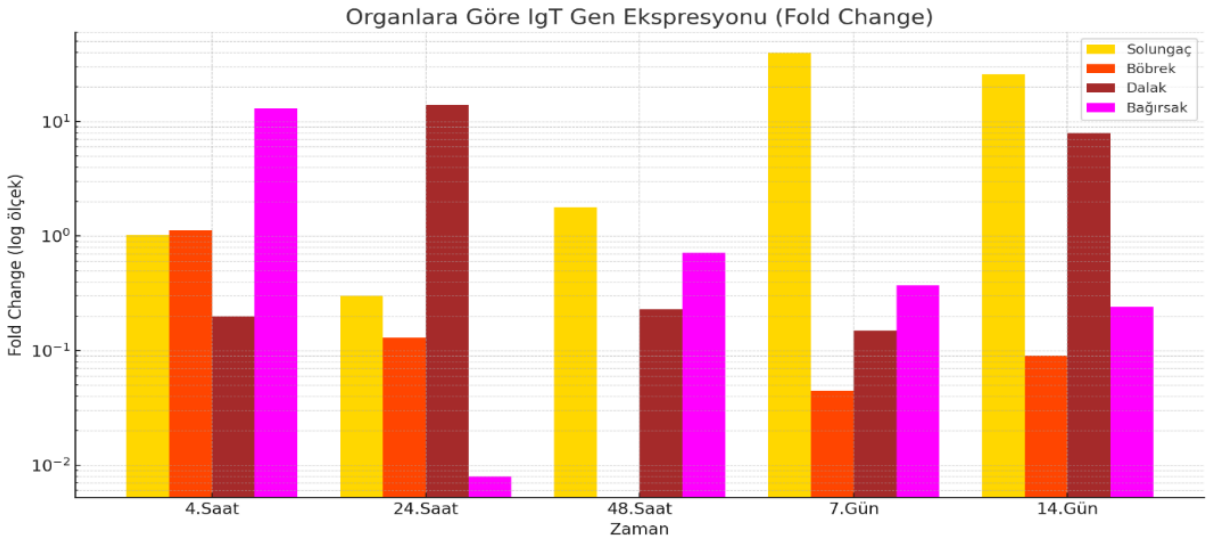
IgM aracılığıyla da uyarıldığını göstermektedir, ancak bu yanıt sistemik dokular kadar güçlü değildir.

Bu bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, **enjeksiyon yoluyla uygulanan *L. garvieae* aşısı**, sistemik dokularda (özellikle ön böbrek ve dalakta) **güçlü ve zamana yayılan bir IgM cevabı** oluştururken, mukozal dokularda bu yanıtın **daha zayıf ve geç ortaya çıktığı** gözlenmiştir. Aşının primer olarak sistemik bağışıklığı hedeflediği ve IgM gen transkripsiyonunun adaptif fazın önemli bir biyobelirteci olduğu anlaşılmaktadır.

Bu sonuçlar, ***L. garvieae*'ye karşı geliştirilen enjeksiyon inaktif emülsiyon aşının** etkinliğini değerlendirirken IgM ekspresyon dinamiklerinin, **aşı uygulama yolu, hedef doku ve antijen tipi** gibi faktörlerle ilişkili olarak dikkatle yorumlanması gerektiğini göstermektedir.

4.7.5.3 IgT Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 7. ve 14. günlerde gözlenen güçlü ekspresyon artışları, IgT'nin mukozal yüzeyde geç dönemde aktif bir bağışıklık yanıtı oluşturduğunu göstermektedir. Bu, IgT'nin mukozal patojenlere karşı spesifik savunmadaki rolü ile uyumludur.
- **Ön Böbrek**: Tüm zaman noktalarında baskılanma gözlenmiştir. Bu bulgu, sistemik dolaşımda IgT yanıtının belirgin bir aktivasyon oluşturmadığını ve bu izotipin daha çok mukozal dokularla ilişkili olduğunu göstermektedir.
- **Dalak**: 24. saatte ve 14. günde belirgin ekspresyon artışı gözlenmiş, diğer zamanlarda baskılanma izlenmiştir. Sistemik IgT aktivasyonu geç dönemde oluşmuştur.
- **Bağırsak**: 24. saat ve 14. gündeki artışlar, sistemik düzeyde geç dönemde IgT üretiminin başladığını ancak etkinliğinin sınırlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 150. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasınını takiben IgT gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana

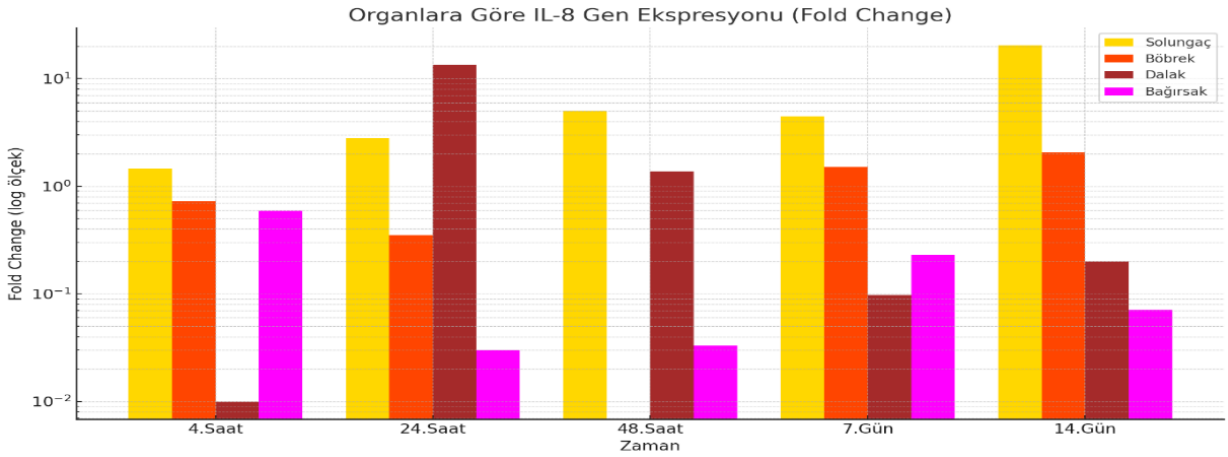
bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

IgT, teleost balıklarda mukozal yüzeylerin korunmasında rol alan ve IgA'ya fonksiyonel olarak benzeyen immünoglobulindir. Bu çalışma kapsamında, *L. garvieae* enjeksiyon aşısı sonrasında elde edilen IgT ekspresyon profilleri, aşının **mukozal ve sistemik bağışıklık üzerindeki etkisini** ortaya koymak açısından önemlidir.

L. garvieae enjeksiyon aşısı, IgT düzeyinde değerlendirildiğinde **lokal (özellikle solungaç) düzeyde geç dönem bir aktivasyon oluşturmuş**, ancak **sistemik (ön böbrek) ve enterik (bağırsak) mukozal dokularda sınırlı ekspresyon yanıtı** meydana getirmiştir. Bu durum, enjeksiyonla uygulanan aşıların **öncelikle sistemik IgM yanıtını hedeflediği**, mukozal IgT aktivasyonunun ise **ikincil ve sınırlı düzeyde** kaldığı yönündeki literatürle uyumludur.
Bu veriler, aşının etkinlik profilinde **IgT'nin tamamlayıcı rol oynadığını**, ancak mukozal aşılama yöntemlerine kıyasla **IgT transkripsiyonunun daha düşük düzeyde kaldığını** göstermektedir.

4.7.5.4 IL-8 Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: IL-8 transkripsiyonu 4. saatten itibaren sürekli artış göstermiş ve 14. günde çok güçlü düzeylere ulaşmıştır. Bu durum, mukozal dokuda zamanla progresif şekilde **nötrofil kemotaksisini uyaran proinflamatuar yanıtın arttığını** göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: Başlangıçta baskılı olan ekspresyon, 7. ve 14. günlerde artış göstermiştir. Bu, doğuştan bağışıklığın sistemik komponentlerinde **geç fazda IL-8 ile aktive edilen inflamatuar süreçlerin devreye girdiğini** düşündürmektedir.
- **Dalak**: 24. saatteki güçlü IL-8 artışı, aşıya yanıt olarak **erken inflamatuar aktivasyonun** tetiklendiğini; ancak bunu izleyen baskılanma, aşının etkisinin **kısa süreli bir IL-8 cevabı** ile sınırlı olduğunu göstermektedir.
- **Bağırsak**: Tüm zaman noktalarında baskılanma gözlenmiştir. Bu durum, aşının **enterik mukozal inflamatuar yanıtları inhibe ettiğini** ve bağışıklığın bu bölgede IL-8 yoluyla aktive edilmediğini göstermektedir. .

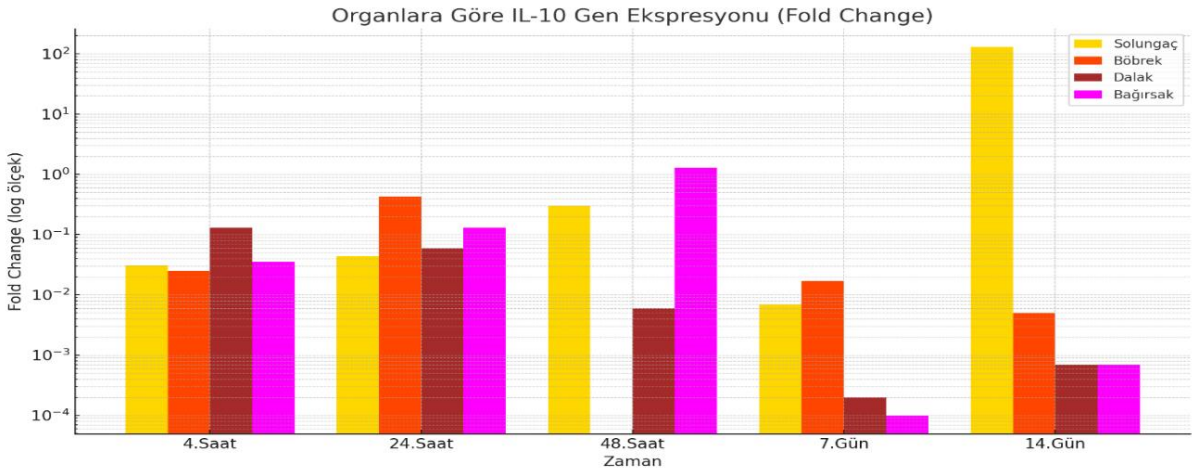


Şekil 151. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Şekilde, inflamatuar sürecin özellikle solungaç ve ön böbrekte geç fazda aktifleştiği, dalakta ise erken yanıtın kısa sürdüğü; bağırsakta ise IL-8 transkripsiyonunun tamamen inhibe olduğu gözlemlenmektedir.

4.7.5.5 IL-10 Gen Ekpresyon Bulguları

- **Solungaç**: 14. günde belirgin ekspresyon artışı izlenmiş olup, öncesinde baskılanmıştır. Bu durum, **ilk proinflamatuar süreci takiben anti-inflamatuar düzenleyici yanıtın** geç dönemde aktive olduğunu göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: Benzer şekilde geç dönemde IL-10 artışı, sistemik düzeyde **anti-inflamatuar modülasyonun gecikmeli olarak devreye girdiğini** göstermektedir.
- **Dalak**: Tüm zaman noktalarında IL-10 ekspresyonunun baskılanmış olması, **regülatör T hücre aktivasyonunun ve inflamasyon baskılanmasının dalakta yeterince oluşmadığını** göstermektedir.
- **Bağırsak**: 48. saatte hafif artış dışında, genel olarak baskılanma gözlenmiştir. Bu, **mukozal düzeyde IL-10 aracılı baskılayıcı mekanizmaların zayıf kaldığını** işaret eder.

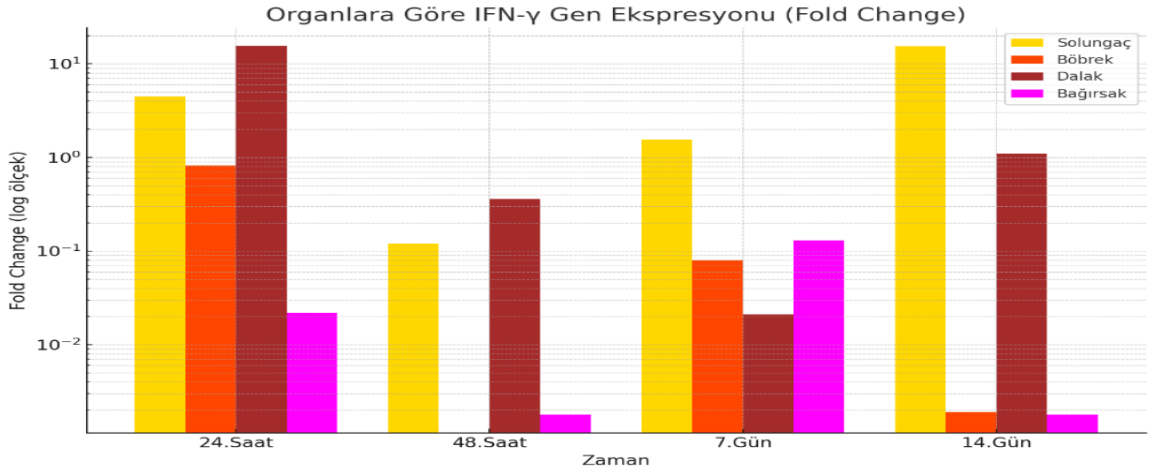


Şekil 152. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-10 gen ekspresyonunun zamana ve dokuya bağlı dağılımı sunulmaktadır.

Grafik, mukozal ve sistemik anti-inflamatuar yanıtın geç dönemde solungaç ve ön böbrekte aktive olduğunu, fakat dalak ve bağırsakt

4.7.5.6 IFN-γ Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 24. ve 14. günde gözlenen artış, **geç fazda mukozal antiviral yanıtın** IFN-γ aracılığıyla aktive edildiğini göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: 7. ve 14. günlerde baskılanma izlenmiştir. Bu, **sistemik düzeyde hücre aracılı antiviral yanıtın baskılandığını** gösterir.
- **Dalak**: 24. saatte artış gözlenmiş, 14. günde tekrar dengeye gelmiştir. **Geçici IFN-γ aktivasyonu** ile zayıf bir T-hücre yanıtı oluştuğu düşünülmektedir.
- **Bağırsak**: Tüm zaman noktalarında güçlü baskılanma olması, **lokal antiviral sitokin yanıtının enterik mukozada devreye girmediğini** ortaya koymaktadır.

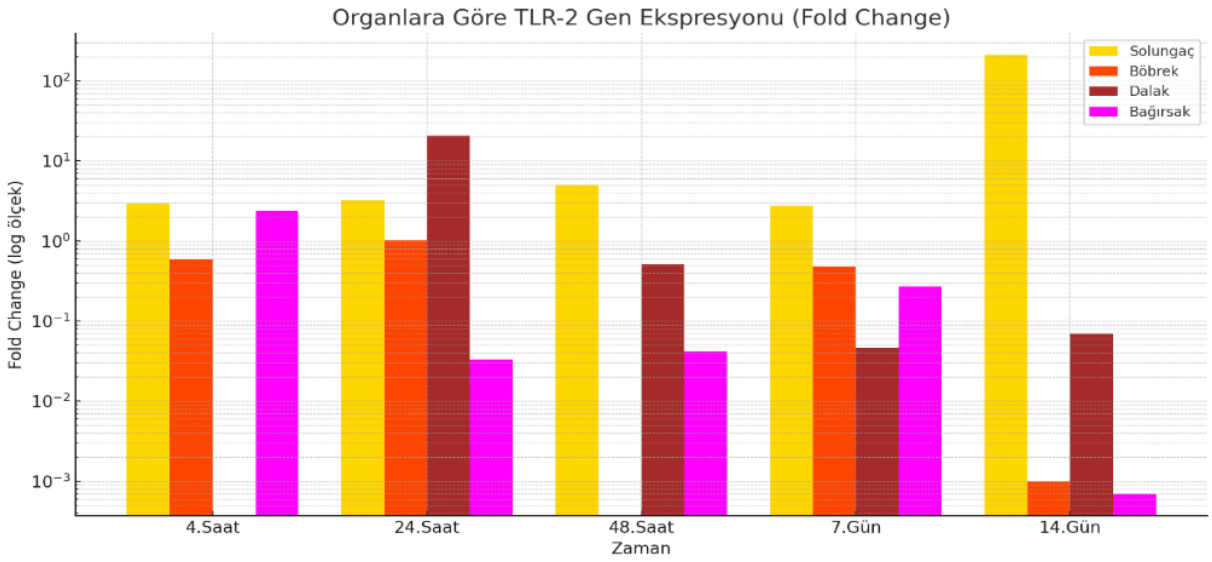


Şekil 153. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IFN-γ gen ekspresyonunun zamana ve dokuya bağlı dağılımı sunulmaktadır.

IFN-γ gen ekspresyon profili, aşı sonrası antiviral hücresel bağışıklığın solungaç ve kısmen dalakta geç fazda aktive olduğunu, buna karşın ön böbrek ve bağırsakta bu cevabın baskılandığını ortaya koymaktadır.

4.7.5.7 TLR-2 Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: Tüm zaman noktalarında ekspresyon artışı izlenmiş, 14. günde çok güçlü seviyelere ulaşmıştır. Bu durum**, mukozal doğuştan bağışıklığın TLR-2 aracılığıyla güçlü şekilde uyarıldığını** göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: İlk iki zaman noktasında nötr, ancak 7. ve 14. günlerde baskılanma gözlenmiştir. Bu, **sistemik** PAMP tanıma yanıtının geç dönemde baskılandığını işaret eder.
- **Dalak**: 24. saatteki ani artış ve sonrasındaki baskılanma, geçici sistemik doğuştan bağışıklık aktivasyonu oluşturulduğunu göstermektedir.
- **Bağırsak**: 4. saatte kısa süreli artış dışında, tüm zaman noktalarında güçlü baskılanma izlenmiştir. Bu durum, bağırsak mukozasında TLR-2 aracılı immün yanıtın inhibe edildiğini gösterir.



Şekil 154. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben TLR-2 gen ekspresyonunun zamana ve dokuya bağlı dağılımı sunulmaktadır.

TLR-2 gen ekspresyon grafiği, solungaç dokusunda güçlü ve sürekli bir doğuştan bağışıklık uyarımı olduğunu, dalakta geçici bir aktivasyon olduğunu; ön böbrek ve bağırsakta ise baskılayıcı bir düzenin hâkim olduğunu göstermektedir.

Genel olarak; *L. garvieae* enjeksiyon aşısı, **solungaç mukozasında belirgin şekilde proinflamatuar (IL-8), antiviral (IFN-γ) ve doğuştan bağışıklık (TLR-2) yanıtlarını geç dönemde aktive etmiş**, bu dokunun immun bir bariyer olarak önemini bir kez daha

vurgulamıştır. Buna karşın, **bağırsak dokusunda gen ekspresyon düzeyleri genel olarak baskılanmış**, bu durum mukozal immün cevap açısından enterik yanıtın sınırlı kaldığını göstermektedir.

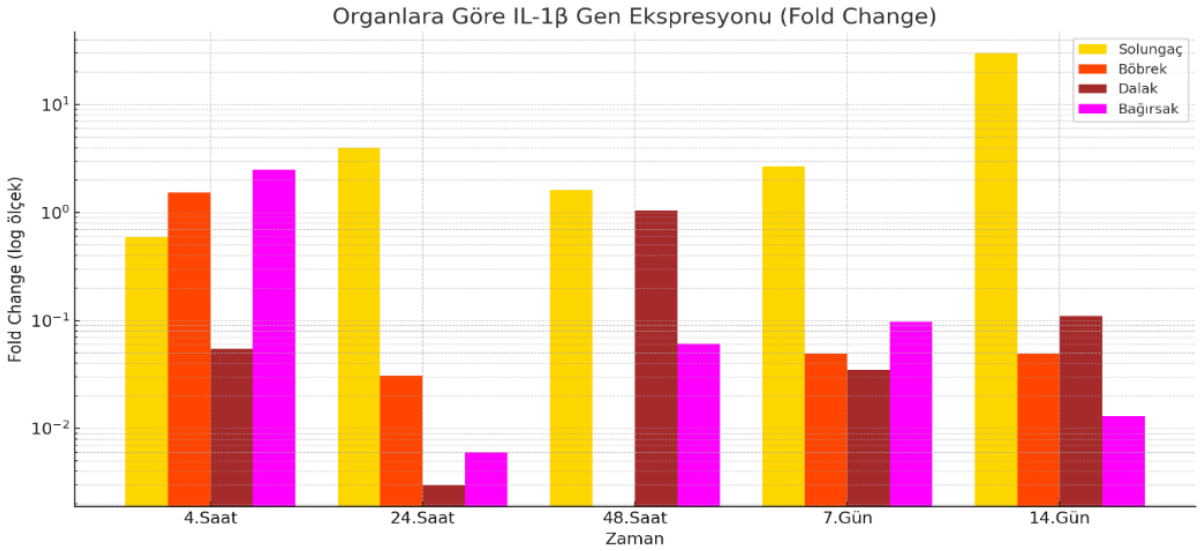
Sistemik organlardan ön böbrek, geç dönemde düzenleyici (IL-10) ve hafif proinflamatuar (IL-8) yanıtlar sergilerken, **dalak**, IL-8 ve IFN-γ gibi sitokinlerde daha çok geçici ve erken faz aktivasyonuna cevap vermiştir. TLR-2 ise sistemik organlarda genellikle baskılanmıştır.

Genel olarak, enjeksiyonla uygulanan bu aşının:

- Mukozal immün sistemde **(özellikle solungaçta) güçlü ve geç dönem bir immün uyarım** oluşturduğu,
- Bağırsak gibi bazı mukozal alanlarda ise baskılanmış veya sınırlı bir ekspresyon yanıtı oluştuğu,
- **Sistemik organlarda daha geç yanıtlarla regülasyon ve sınırlı inflamasyon** sağladığı görülmektedir.

4.7.5.8 IL-1β Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 24. saatten itibaren giderek artan ekspresyon, 14. günde çok güçlü düzeye ulaşmıştır. Mukozal inflamasyon geç dönemde aktive edilmiştir.
- **Ön Böbrek**: 24. ve 14. günlerde çok güçlü baskılanma, 4. saatte hafif artış gözlenmiştir. Sistemik IL-1β yanıtı baskılanmıştır.
- **Dalak**: Tüm zaman noktalarında çok güçlü baskılanma eğilimi göstermiştir. Dalakta inflamatuar yanıt oluşmamıştır.
- **Bağırsak**: Sadece 4. saatte belirgin artış izlenmiş, sonraki zamanlarda çok güçlü baskılanma görülmüştür.

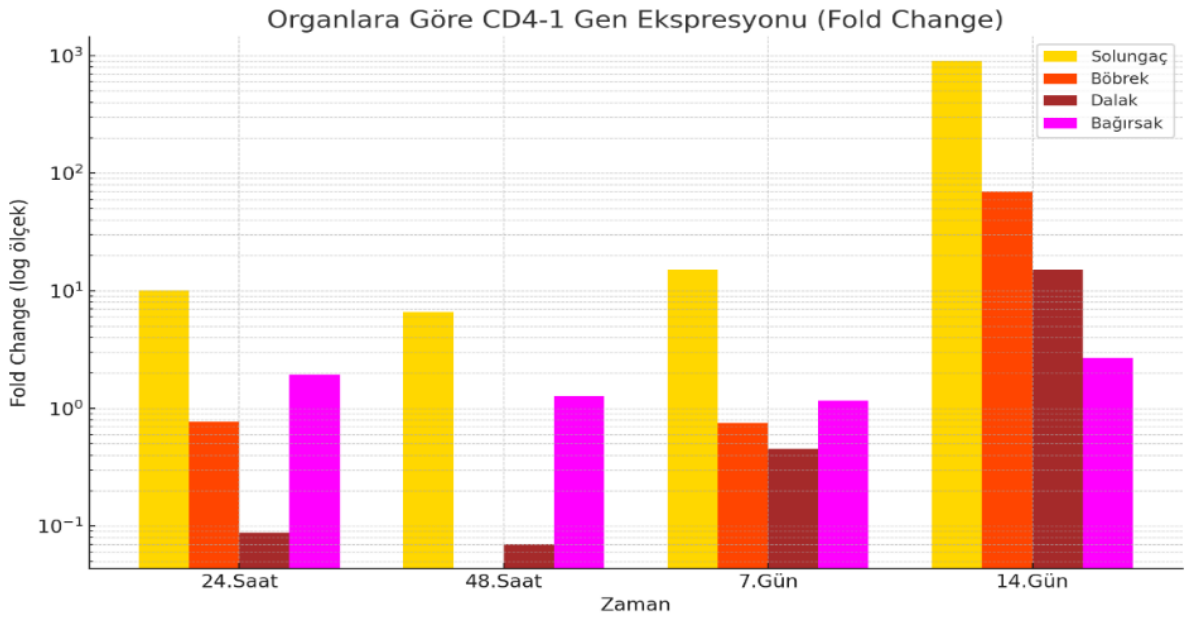


Şekil 155. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-1β gen ekspresyonunun

solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

4.7.5.9 CD4-1 Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 24. saatten itibaren ekspresyondaki artışın sürekli devam ederek 14. günde çok güçlü seviyelere ulaşması, mukozal yüzeydeki **proinflamatuar yanıtın geç dönemde güçlü şekilde aktive olduğunu** göstermektedir. Bu durum, *L. garvieae*'ye karşı solungaçta belirgin bir inflamatuar savunma tepkisinin oluştuğuna işaret etmektedir.
- **Ön Böbrek**: Yalnızca 14. günde çok güçlü bir artış izlenmiş olup, önceki zaman noktalarında anlamlı bir aktivasyon saptanmamıştır. Bu bulgu, **ön böbrekte CD4+ T-hücre yanıtının sistemik düzeyde geç dönemde uyarıldığını** ortaya koymaktadır.
- **Dalak**: İlk üç zaman noktasında baskılanma gözlenmiş, 14. günde ise ekspresyon düzeyinde çok güçlü bir artış oluşmuştur. Bu ifade, **dalakta CD4+ T-hücrelerin geç aktivasyonu** ile birlikte adaptif bağışıklık sisteminin geç yanıt verdiğini göstermektedir.
- **Bağırsak**: Ekspresyon düzeyleri zamana bağlı olarak hafif artış göstermiş ve 14. günde belirgin bir aktivasyon seviyesine ulaşmıştır. Bu, **mukozal düzeyde CD4+ T-hücre yanıtının yavaş ama giderek artan şekilde aktive olduğunu** göstermektedir.

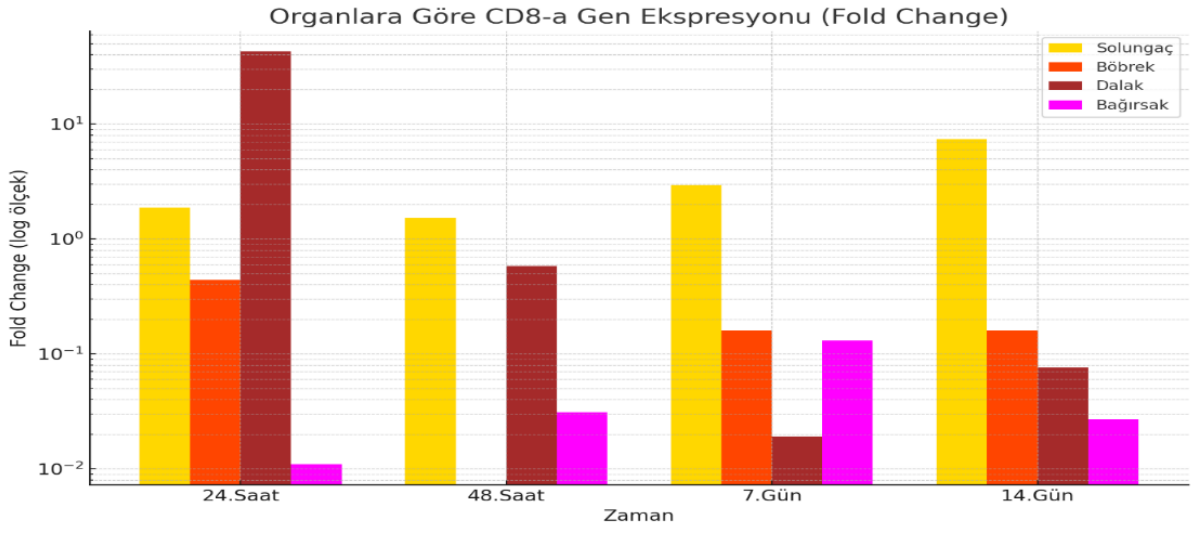


Şekil 156. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Bu bulgular, *L. garvieae* enjeksiyon aşısının **adaptif bağışıklık yanıtının geç dönemde, özellikle CD4-1 T-hücreler üzerinden aktive edildiğini** göstermektedir. Aşı uygulamasını takiben, solungaç ve dalakta belirginleşen bu ekspresyon artışı, mukozal ve sistemik düzeyde **yardımcı T hücre yanıtlarının** aşıya özgü olarak uyarıldığını ve hücre aracılı bağışıklığın geç fazda devreye girdiğini göstermektedir. Bu durum, aşının uzun süreli bağışıklık oluşturma potansiyelini destekleyen önemli bir göstergedir.

4.7.5.10 CD8-α Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 7 ve 14. günlerde CD8-α ekspresyon düzeyinde belirgin artış saptanmıştır. Bu artış, **mukozal düzeyde sitotoksik T-hücre (CD8--α) yanıtının geç fazda aktive edildiğini**, özellikle solungaç epitelinde sitotoksik bağışıklık yanıtının oluştuğunu göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: Tüm zaman noktalarında ekspresyon düzeylerinin baskılanmış olması, **sistemik CD8--α T-hücre yanıtının inhibe edildiğini veya aşıya bağlı olarak bu yanıtın öncelikli olarak indüklenmediğini** göstermektedir.
- **Dalak**: 24. saatte çok güçlü bir ekspresyon artışı gözlenmesine rağmen, sonraki zaman noktalarında bu yanıt baskılanmıştır. Bu durum, **dalakta aşıya bağlı olarak kısa süreli ve geçici bir CD8-α hücre aktivasyonu oluştuğunu** ortaya koymaktadır.
- **Bağırsak**: Tüm zaman noktalarında çok güçlü baskılanma gözlenmiştir. Bu bulgu, **bağırsak mukozasında sitotoksik T-hücre aracılı bir yanıtın oluşmadığını veya aktif şekilde baskılandığını** göstermektedir.



Şekil 157. *L. garvieae* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben CD8-α gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

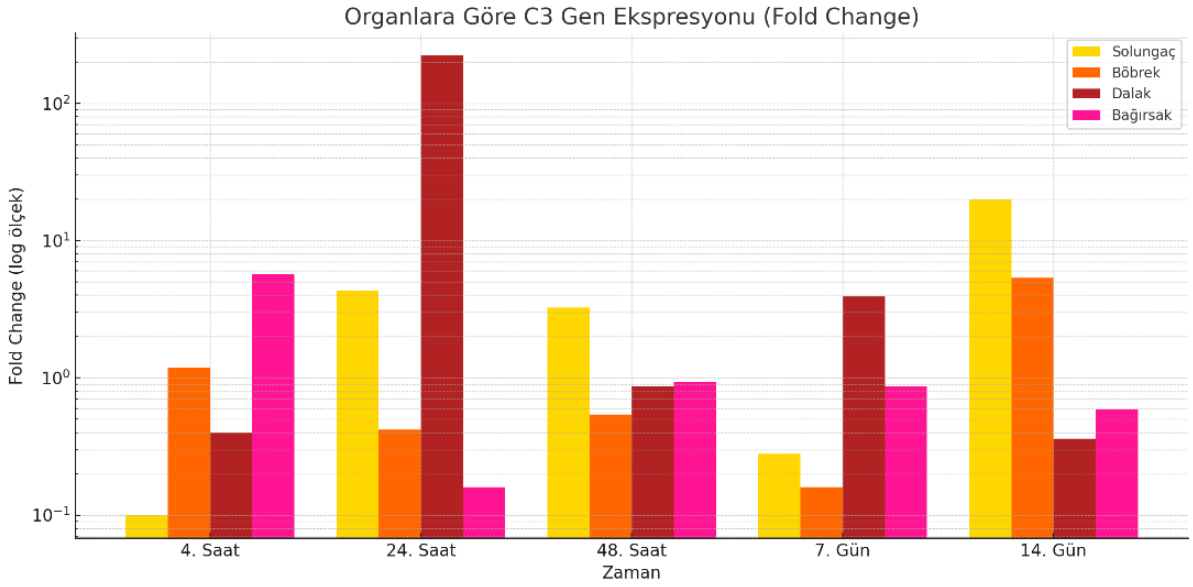
Bu veriler, *L. garvieae* enjeksiyon aşısının **sitotoksik T-hücre yanıtını dokuya özgü olarak farklı düzeylerde etkilediğini** göstermektedir. Özellikle solungaç dokusunda CD8-α ekspresyonunun artması, aşının **lokal düzeyde hücre aracılı bağışıklığı aktive ettiğini** desteklemektedir. Buna karşın, sistemik dokularda (ön böbrek ve dalak) baskılanan veya geçici yanıtlar gözlenmesi, **sitotoksik yanıtın öncelikli olarak mukozal yüzeylerde indüklendiğini** düşündürmektedir. Bağırsaktaki sürekli baskılanma ise bu dokunun sitotoksik yanıta kapalı olduğunu veya aşının bu bölgeyi hedeflemediğini ortaya koymaktadır.

4.7.6 *L. petauri* İnaktif Emülsiyon Enjeksiyon Aşı

4.7.6.1 C3 Gen Ekspresyonu

L. petauri İnaktif Enjeksiyon Emülsiyon Aşı Gen Ekspresyon Bulgularına ait grafikler Şekil 159-168'de sunulmuştur.

- **Solungaç:** 4. saatte hafif baskılanan **C3 gen ekspresyonu**, zamanla artarak 14. günde **maksimum seviyeye ulaşmıştır**. Bu durum, **mukozal doğuştan bağışıklığın geç dönemde** etkili şekilde devreye girdiğini göstermektedir.
- **Ön Böbrek:** Ön böbrekte 24. saatte gözlenen C3 ekspresyonundaki artış, aşının sistemik düzeyde doğuştan bağışıklık yanıtını erken dönemde aktive ettiğini göstermektedir. Ancak sonraki zaman noktalarında gözlenen belirgin baskılanma, bu aktivasyonun geçici olduğunu ve kompleman yanıtının sürdürülebilir olmadığını düşündürmektedir
- **Dalak:** Dalakta 24. saatte gözlenen belirgin C3 ekspresyon artışı, aşının sistemik düzeyde kompleman aracılı bir bağışıklık yanıtı oluşturduğunu göstermektedir. Ancak bunu takip eden zaman noktalarında ekspresyon düzeyindeki düşüş, bu yanıtın geçici ve sınırlı kaldığını, dolayısıyla aşının dalak düzeyinde kalıcı bir kompleman aktivasyonu oluşturmadığını düşündürmektedir.
- **Bağırsak:** Bağırsak dokusunda 4. saatte gözlenen C3 ekspresyonundaki artış, aşının erken fazda mukozal doğuştan bağışıklık sistemini kısa süreli olarak aktive ettiğini göstermektedir. Ancak 7. ve 14. günlerdeki belirgin baskılanma, bu aktivasyonun sürdürülebilir olmadığını ve mukozal kompleman yanıtının geç.



Şekil 158. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben C3 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana

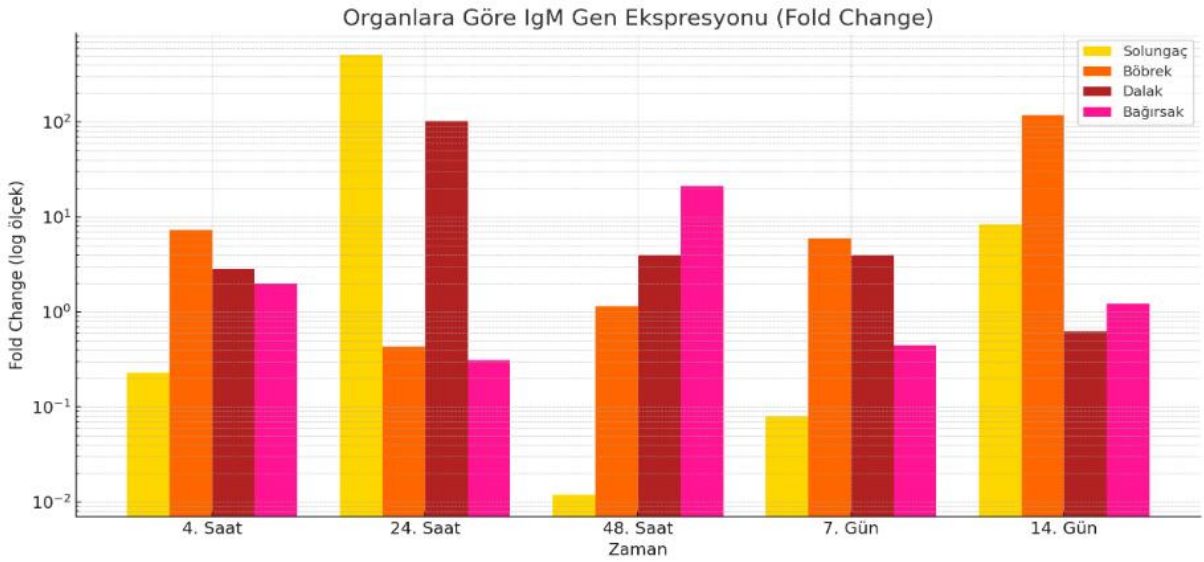
bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Solungaç dokusunda geç fazda belirgin artış gözlenirken, ön böbrek ve dalakta erken aktivasyon sonrası baskılanma dikkat çekmektedir. Bağırsakta ise erken dönemdeki sınırlı artış, geç fazda tamamen inhibe edilmiştir.

L. petauri enjeksiyon aşısı sonrası **C3 gen ekspresyon profili**, hem sistemik hem de mukozal bağışıklık yönünden **geçici ve dokuya özgü farklılıklar** sergilemiştir. Özellikle **solungaç dokusunda geç dönemdeki güçlü C3 artışı**, mukozal yüzeyde doğuştan bağışıklık sisteminin **güçlü bir şekilde aktive olduğunu** göstermektedir. Buna karşın, ön böbrek ve dalak gibi sistemik bağışıklık organlarında **kompleman sistemi yanıtı erken dönemde sınırlı kalmış**, bağırsakta ise sadece erken bir aktivasyon gözlenmiştir. Bu sonuçlar, aşının mukozal yüzeyde geç ancak güçlü bir doğuştan yanıt oluşturduğunu, sistemik düzeyde ise daha kısa süreli bir kompleman cevabına neden olduğunu göstermektedir.

4.7.6.2 IgM Gen Ekspresyon Gen Bulguları

- **Solungaç**: 24. saatte gözlenen belirgin IgM artışı, mukozal humoral bağışıklığın erken fazda aktive edildiğini göstermektedir. Ancak 48. saatteki geçici baskılanma, geçici bir geri çekilmenin varlığına işaret etmektedir. 14. günde gözlenen çok güçlü artış, geç fazda mukozal antikor yanıtının yeniden güçlendiğini ve uzun süreli koruyuculuğa katkı sağladığını göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: 4. saatteki erken artış sistemik humoral bağışıklığın hızla aktive olabildiğini, 48. saatteki baskılanma ise bu cevabın geçici olarak durakladığını göstermektedir. 14. gündeki yeniden artış, aşının sistemik düzeyde geç dönemde de etkili olduğunu ortaya koymaktadır.
- **Dalak**: 4. ve 14. günlerde gözlenen güçlü IgM ekspresyon artışları, dalakta çift fazlı bir humoral aktivasyonun oluştuğunu göstermektedir. Ara zaman noktalarındaki dalgalanma ve baskılanma ise cevabın dinamik ve zamana bağlı olarak değişken seyrettiğini işaret etmektedir.
- **Bağırsak**: 7. gündeki ekspresyon artışı, aşının mukozal düzeyde geç dönemde lokal bir IgM yanıtı oluşturabildiğini göstermektedir. Ancak diğer zaman noktalarındaki baskılanma, bu cevabın sınırlı ve süreksiz kaldığını düşündürmektedir.



Şekil 159. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IgM gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

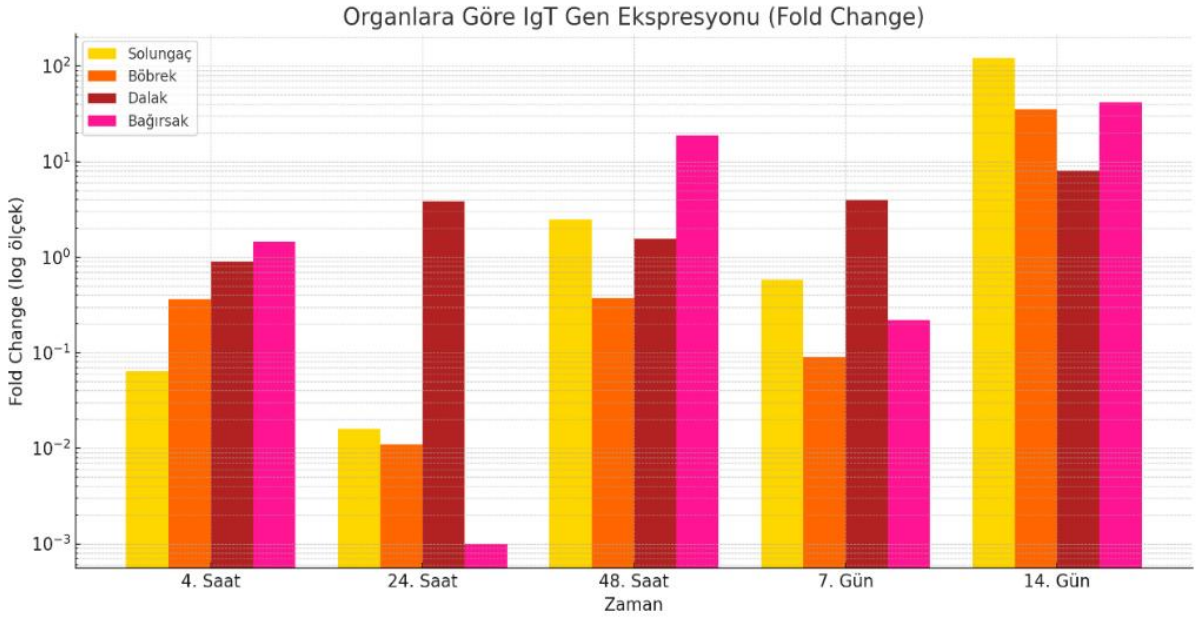
Grafiklerde, erken (4. saat–48. saat), orta (7. gün) ve geç dönem (14. gün) ekspresyon dinamikleri dokuya özgü yanıt farklılıklarını yansıtmaktadır.

IgM gen ekspresyon profili, *L. petauri* enjeksiyon aşısının hem sistemik hem de mukozal düzeyde zamana bağlı olarak farklı bağışıklık modüllerini aktive ettiğini göstermektedir. Solungaç ve ön böbrekte gözlenen geç faz artışlar, aşının uzun süreli humoral koruma potansiyeline işaret ederken; dalaktaki çift fazlı aktivasyon, adaptif bağışıklığın bu organda güçlü biçimde uyarıldığını göstermektedir. Bağırsak dokusunda sınırlı IgM cevabı ise mukozal humoral yanıtın zayıf ve geçici seyrettiğini ortaya koymaktadır. **Bu sonuçlar, aşının bağışıklık sisteminin farklı bileşenlerini hedef alan çok yönlü bir etki mekanizmasına sahip olabileceğini göstermektedir.**

4.7.6.3 IgT Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 24. saat ve 7. günde gözlenen güçlü IgT ekspresyon artışları, mukozal bağışıklığın erken-orta dönemde aktifleştiğini göstermektedir. 14. gündeki düşüş ise bu yanıtın uzun süreli devam etmediğini ve lokal mukozal yanıtın geçici olabileceğini ortaya koymaktadır.
- **Ön Böbrek**: 7. ve 14. günde gözlenen ekspresyon artışı, sistemik IgT yanıtın geç fazda geliştiğini göstermektedir. Bu durum, adaptif mukozal bağışıklığın dolaşımda geç uyarıldığına işaret etmektedir.
- **Dalak**: 48. saatten itibaren düzenli artış ile 14. günde çok yüksek seviyelere ulaşan ekspresyon, aşının dalakta güçlü ve sürekli bir IgT yanıtı oluşturduğunu göstermektedir. Bu bulgu, sistemik mukozal antikor üretimi açısından aşının etkili olduğunu düşündürmektedir

- **Bağırsak**: . günde belirgin artış ile geçici bir mukozal IgT aktivasyonu izlenmiş, diğer zaman noktalarında ekspresyonun baskılanmış olması ise bağırsak düzeyindeki mukozal yanıtın sürekliliğinin sağlanamadığını göstermektedir.



Şekil 160. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IgT gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Grafikler, IgT'nin hem lokal (solungaç, bağırsak) hem sistemik (ön böbrek, dalak) düzeyde uyarılma zamanlaması ve şiddeti hakkında karşılaştırmalı veri sağlamaktadır.

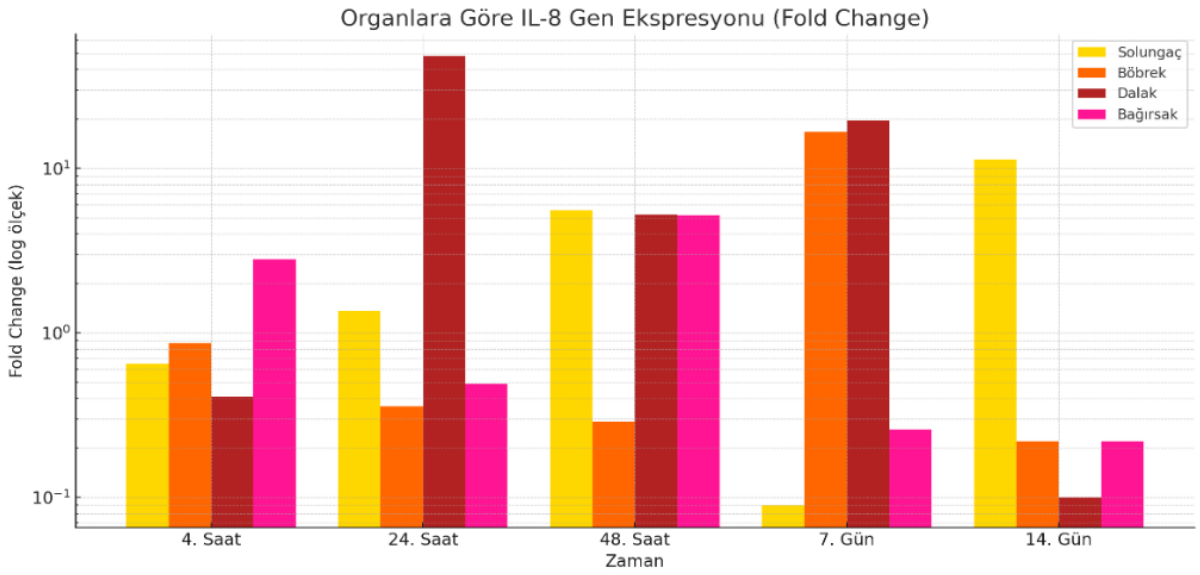
IgT ekspresyon profili, *L. petauri* enjeksiyon aşısının mukozal ve sistemik mukozal bağışıklık üzerinde seçici ve zamana bağlı bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Solungaç ve bağırsakta gözlenen geçici IgT aktivasyonu, lokal yanıtın sınırlı ve kısa süreli olduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık, özellikle dalakta 48. saatten itibaren sürekli artış gösteren IgT ekspresyonu, sistemik düzeyde güçlü ve kalıcı bir mukozal antikor cevabının geliştiğini ortaya koymaktadır. Ön böbrekteki geç faz IgT cevabı da bu durumu desteklemektedir. Bu sonuçlar, aşının sistemik mukozal bağışıklık aktivasyonunda etkili olduğunu, ancak lokal mukozal dokularda daha kısa süreli bir etkinlik sağladığını göstermektedir.

4.7.6.4 IL-8. Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 24. saatten itibaren artan IL-8 ekspresyonu, 14. günde çok yüksek düzeylere ulaşarak aşının mukozal dokuda inflamatuar yanıtı geç fazda etkin biçimde tetiklediğini

göstermektedir. Bu bulgu, solungaç dokusundaki geç dönem proinflamatuar aktivasyonun belirgin olduğunu ortaya koymaktadır.

- **Ön Böbrek**: 48. saatten itibaren artmaya başlayan IL-8 ekspresyonu, 14. günde zirveye ulaşmıştır. Bu durum, sistemik inflamatuar yanıtın geç fazda belirginleştiğini ve aşıya karşı dolaşımdaki immün hücrelerin aktivasyonunda IL-8'in rol aldığını göstermektedir.
- **Dalak**: 48. saat ve 7. günde görülen IL-8 ekspresyon artışı, aşının dalakta erken-geç dönem arasında geçici bir inflamatuar yanıt oluşturduğunu göstermektedir. 14. gündeki düşüş, dalaktaki bu yanıtın sınırlı süreyle devam ettiğine işaret etmektedir.
- **Bağırsak**: Sadece 7. günde artan IL-8 ekspresyonu, geçici ve lokalize bir inflamatuar uyarıyı işaret etmektedir. Diğer zaman noktalarında gözlenen baskılanma, bağırsak düzeyinde inflamasyonun sürdürülemediğini ve kısa süreli olduğunu göstermektedir. .

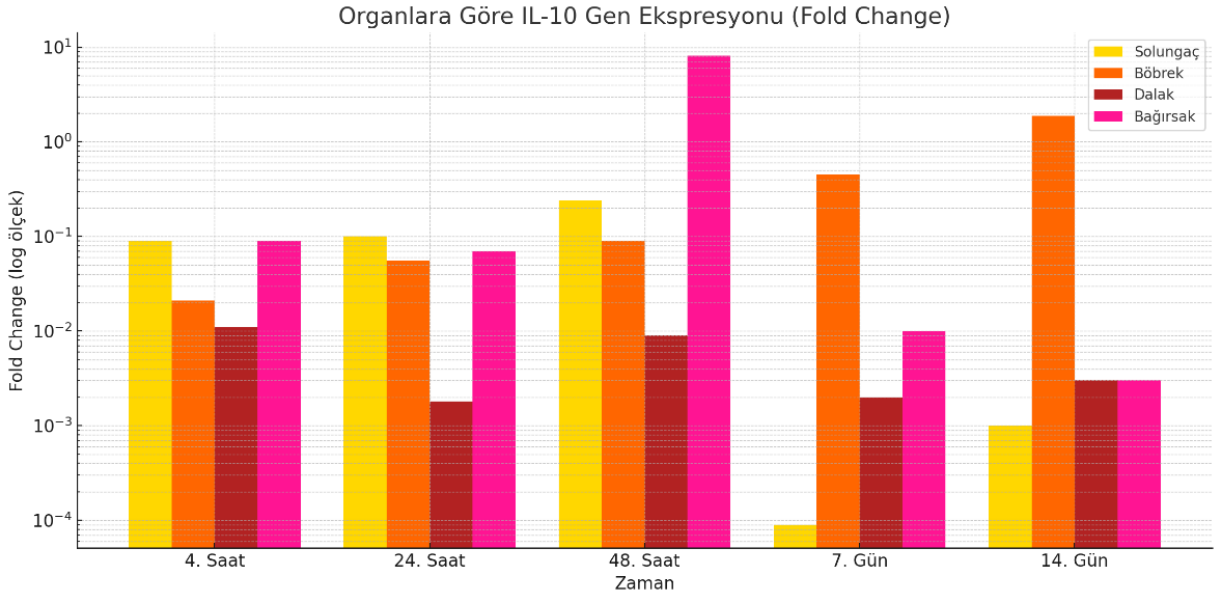


Şekil 161. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Grafik, farklı dokularda proinflamatuar yanıtın şiddetini ve zamanlamasını görselleştirmektedir. IL-8 ekspresyon verileri, *L. petauri* enjeksiyon aşısının hem mukozal hem de sistemik düzeyde inflamatuar aktivasyonu tetiklediğini göstermektedir. Solungaç ve ön böbrekte 14. günde gözlenen güçlü IL-8 artışı, aşının geç fazda proinflamatuar sitokin yanıtı oluşturduğunu ve muhtemel hücre göçünü desteklediğini göstermektedir. Dalakta geçici artışlar, bu organda sınırlı bir inflamatuar uyarıyı işaret ederken; bağırsakta sadece tek zaman noktasındaki IL-8 artışı, mukozal inflamasyonun dokuya özgü ve kısa süreli olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, aşının inflamatuar bağışıklık yanıtını dokuya ve zamana bağlı olarak seçici şekilde modüle ettiğini ortaya koymaktadır.

4.7.6.5 IL-10 Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 24. saate kadar süren baskılanmanın ardından 7. ve 14. günlerde ekspresyon artışı izlenmiştir. Bu durum, aşıya bağlı olarak mukozal inflamasyonun geç fazda IL-10 aracılığıyla düzenlendiğini ve anti-inflamatuar mekanizmaların aktive olduğunu göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: 4. saatten itibaren artan IL-10 ekspresyonu, 14. güne kadar yüksek düzeyde devam etmiştir. Bu bulgu, sistemik düzeyde erken başlayan ve devam eden bir inflamasyon regülasyonu olduğunu, aşı uygulamasının dolaşımsal inflamatuar kontrol mekanizmalarını etkin şekilde uyardığını göstermektedir.
- **Dalak**: 14. günde en yüksek IL-10 düzeyinin gözlenmesi, dalakta geç fazda güçlü bir anti-inflamatuar düzenlemenin gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Bu, aşının gecikmeli olarak düzenleyici bağışıklık yanıtını aktive ettiğine işaret eder.
- **Bağırsak**: Yalnızca 48. saatte gözlenen sınırlı artış, bu dokuda kısa süreli ve lokalize bir IL-10 üretimini yansıtırken, diğer zaman noktalarında baskılanmış düzeyler, mukozal inflamasyonun düzenlenmesinde IL-10'un sınırlı rol oynadığını göstermektedir.



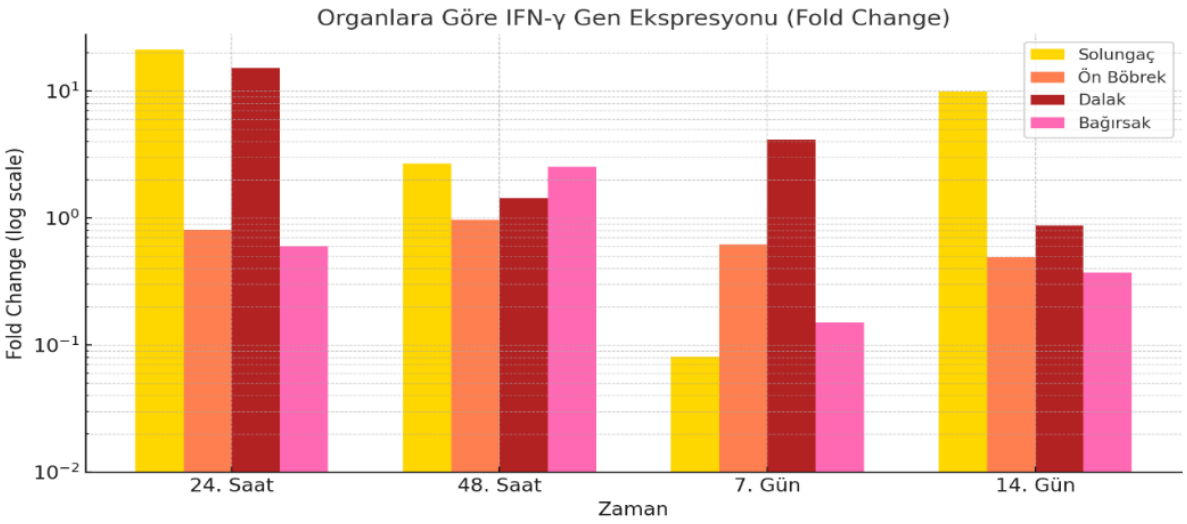
Şekil 162. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-10 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Şekil, IL-10'un inflamasyon regülasyonundaki dokuya özgü zamansal yanıtlarını ortaya koymaktadır. IL-10 gen ekspresyonuna ait veriler, *L. petauri* enjeksiyon aşısının hem mukozal hem de sistemik düzeyde inflamasyonun düzenlenmesini sağlayacak biçimde etkili olduğunu göstermektedir. Özellikle ön böbrek ve dalakta gözlenen güçlü IL-10 artışı, sistemik anti-inflamatuar mekanizmaların etkin şekilde devreye girdiğini göstermektedir. Solungaç dokusunda geç fazda gözlenen artış, mukozal düzeyde de inflamasyonun kontrol altına

alındığını işaret ederken, bağırsakta sınırlı ve geçici IL-10 üretimi, bu doku özelinde yanıtın zayıf kaldığını ortaya koymaktadır. Bu bulgular, aşının bağışıklık sisteminde düzenleyici (regülatör) yanıtları uyararak dokuya özgü farklılıklar oluşturduğunu göstermektedir.

4.7.6.6 IFN-γ Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 14. günde gözlenen çok güçlü IFN-γ ekspresyon artışı, aşının mukozal düzeyde sitotoksik T-hücre aracılı bağışıklığı geç fazda etkin şekilde uyardığını göstermektedir. Bu durum, enfeksiyonun kontrolünde lokal hücresel bağışıklığın önemini yansıtmaktadır.
- **Ön Böbrek**: 48. saatten itibaren başlayan ekspresyon artışı, 14. günde zirve yaparak sistemik antiviral T-hücre yanıtının geç dönemde etkinleştiğini göstermektedir. Bu bulgu, aşıya karşı dolaşım sistemi düzeyinde gecikmeli fakat güçlü bir adaptif hücresel yanıt geliştiğini ortaya koymaktadır.
- **Dalak**: 48. saat ve 14. günde gözlenen belirgin ekspresyon artışı, aşının lenfoid dokuda güçlü bir Th1 tipi yanıtı indüklediğini göstermektedir. Bu bulgu, dalakta geç dönemde antiviral bağışıklık yanıtlarının özellikle IFN-γ aracılığıyla desteklendiğini işaret etmektedir. 48. saatte artış gözlenmiş, 14. günde çok güçlü seviyeye ulaşmıştır.
- **Bağırsak**: 7. ve 14. günlerdeki belirgin ekspresyon artışı, mukozal dokuda hücresel bağışıklığın geç dönemde aktive olduğunu göstermektedir. Bu yanıt, bağırsakta aşı kaynaklı IFN-γ ekspresyonunun zamanla kuvvetlendiğini ve mukozal sitotoksik etkinliği artırdığını düşündürmektedir.



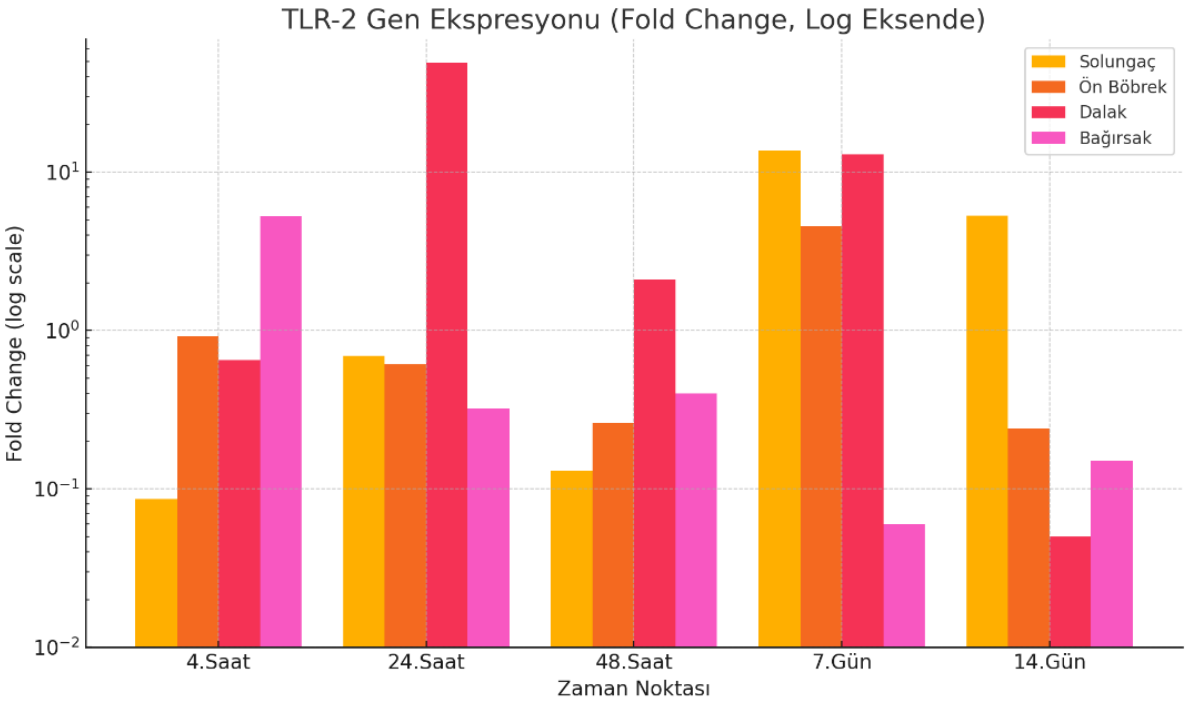
Şekil 163. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IFN-γ gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Grafik, hücresel bağışıklık yanıtının dokulara ve zamana göre değişen aktivasyon profilini göstermektedir. IFN-γ ekspresyon verileri, *L. petauri* enjeksiyon aşısının hem sistemik hem de

mukozal düzeyde antiviral ve hücresel bağışıklığı geç fazda güçlü şekilde uyardığını göstermektedir. Özellikle dalak ve ön böbrekteki yüksek düzeyli IFN-γ ekspresyonu, Th1 tipi bağışıklık ve sitotoksik yanıtların sistemik düzeyde aktifleştiğini ortaya koymaktadır. Mukozal bölgelerde ise (solungaç ve bağırsak), hücresel bağışıklığın geç fazda aktive olduğu, dolayısıyla aşının enfeksiyonun lokal kontrolü açısından da etkili olabileceği anlaşılmaktadır. Bu bulgular, aşı sonrası gelişen IFN-γ yanıtının hem enfeksiyonun eliminasyonu hem de bağışıklık hafızasının oluşumu açısından kritik rol oynadığını desteklemektedir.

4.7.6.7 TLR-2 Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 14. günde çok güçlü ekspresyon artışı ile mukozal doğuştan bağışıklık etkin şekilde aktive edilmiştir.
- **Ön Böbrek**: 48. saatten itibaren artış başlamış, 14. günde pik yapmıştır. Sistemik doğuştan bağışıklık geç fazda uyarılmıştır.
- **Dalak**: 48. saatte artış izlenmiş, 14. günde çok güçlü seviyelere ulaşmıştır. TLR-2 aracılı sistemik yanıt geç dönemde aktifleşmiştir.
- **Bağırsak**: 7. ve 14. günlerde ekspresyon artışı belirgindir. Mukozal düzeyde TLR-2 yanıtı geç dönemde artmıştır.



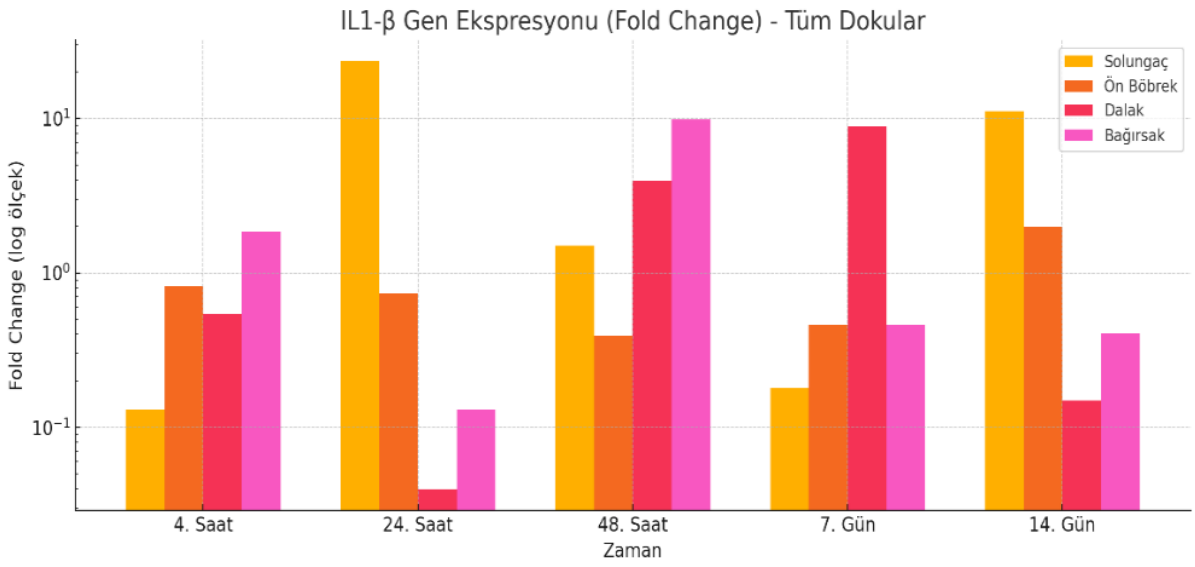
Şekil 164. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

TLR-2 ekspresyon bulguları, *L. petauri* enjeksiyon aşısının hem sistemik hem de mukozal düzeyde doğuştan bağışıklığı geç fazda güçlü şekilde aktive ettiğini göstermektedir. Solungaç

ve bağırsaktaki ekspresyon artışları, aşı uygulamasının mukozal yüzeylerde patojen tanıma ve immün sinyal iletimini artırdığını göstermektedir. Ön böbrek ve dalakta ise TLR-2 aracılı geç yanıt, aşının dolaşım ve lenfoid organlar üzerinde de etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular, TLR-2'nin *L. petauri* aşısı sonrası bağışıklık sisteminin ilk savunma hattında önemli bir rol üstlendiğini desteklemektedir.

4.7.6.8 IL-1β Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 14. günde gözlenen çok güçlü IL-1β ekspresyonu, aşının mukozal yüzeyde inflamatuvar doğuştan bağışıklık yanıtını geç fazda kuvvetli şekilde aktive ettiğini göstermektedir. Bu durum, solungaç mukozasında patojen tanıma ve proinflamatuar yanıtın koordineli şekilde işlendiğini düşündürmektedir.
- **Ön Böbrek**: 48. saatten itibaren başlayan ekspresyon artışı, 14. günde zirve yaparak sistemik inflamasyonun geç dönemde etkinleştiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgu, aşının sistemik düzeyde doğuştan bağışıklık cevabını IL-1β üzerinden modüle ettiğini göstermektedir.
- **Dalak**: 48. saat ve 7. günde ekspresyon artışı gözlenmiş, bu da sistemik lenfoid dokuda inflamatuvar yanıtın geç fazda aktive edildiğini göstermektedir. Ancak bu etkinliğin zamanla azaldığı anlaşılmaktadır.
- **Bağırsak**: 48. saat ve 14. günde artan ekspresyon, lenfoid dokuda TLR-2 aracılı sinyalizasyonun geç fazda kuvvetlendiğini ve aşının dalak düzeyinde PAMP tanıyan reseptörleri uyararak doğuştan bağışıklığı aktive ettiğini göstermektedir. 7. günde güçlü artış gözlenmiş, diğer zamanlarda baskılanmıştır.

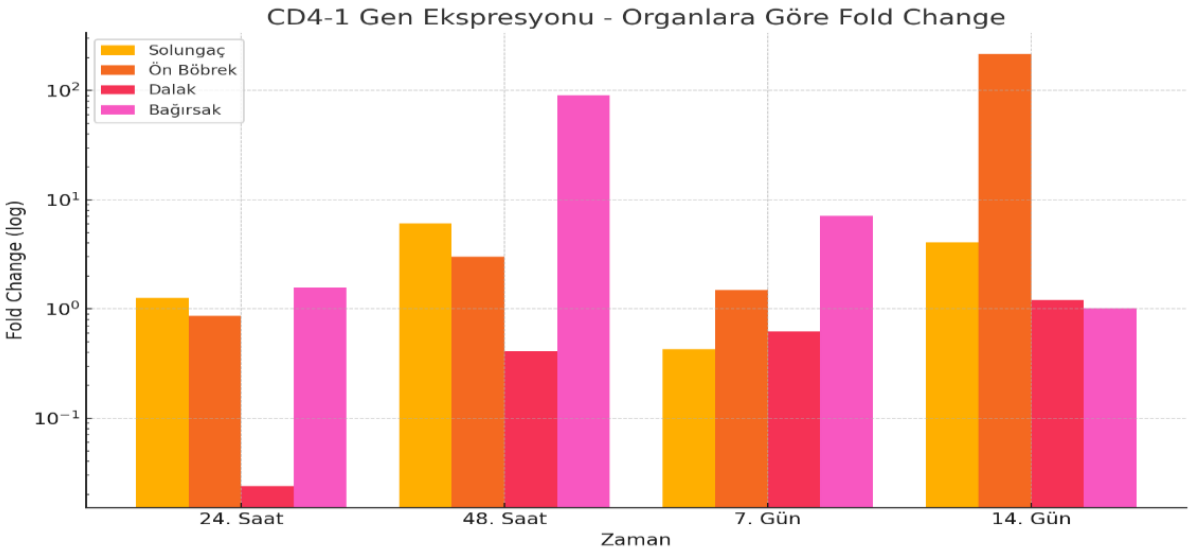


Şekil 165. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Grafik, doğuştan bağışıklık reseptörlerinin zamana ve dokuya bağlı dinamik aktivasyon profilini ortaya koymaktadır. IL-1β, enfeksiyonlara karşı doğuştan bağışıklık sisteminin başlatıcı sitokinlerinden biridir. *L. petauri* enjeksiyon aşısı sonrası IL-1β ekspresyon profili, sistemik ve mukozal düzeyde inflamatuvar yanıtın geç dönemde aktive edildiğini ortaya koymaktadır. Solungaç ve ön böbrekte geç fazda artış, doğuştan bağışıklığın hedef dokularda etkinleştiğini desteklemektedir. Dalakta ise bu yanıtın geçici olduğu, bağırsakta ise IL-1β'nin kısa süreli bir aktivasyon gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu durum, aşının inflamatuvar uyarımı hedef dokuya ve zamana göre modüle ettiğini göstermektedir.

4.7.6.9 CD4-1 Gen Ekspresyon Bulguları

- **Solungaç**: 14. günde gözlenen çok güçlü ekspresyon, aşının mukozal yüzeyde yardımcı T-hücre (CD4+) aktivasyonunu geç dönemde kuvvetle uyardığını göstermektedir. Bu durum, mukozal adaptif bağışıklığın etkin şekilde devreye girdiğini düşündürmektedir.
- **Ön Böbrek**: 14. günde belirgin artış, aşının sistemik düzeyde Th yanıtı oluşturduğunu göstermektedir. Bu, antijen sunumunun ardından sistemik adaptif bağışıklığın geç evrede aktive olduğunu gösterir.
- **Dalak**: 14. günde izlenen dramatik artış, aşının lenfoid dokuda güçlü CD4-1 T-hücre uyarımı sağladığını göstermektedir. Bu durum, aşının sistemik immün belleğin oluşumu açısından yüksek potansiyele sahip olduğunu desteklemektedir. 14. günde dramatik artış ile güçlü sistemik CD4-1 T-hücre cevabı izlenmiştir. **Bağırsak**: 48. saatten itibaren başlayan ekspresyon artışı, intestinal mukozada lokal CD4-1 T-hücre aktivasyonunun varlığını ve gelişimini göstermektedir.



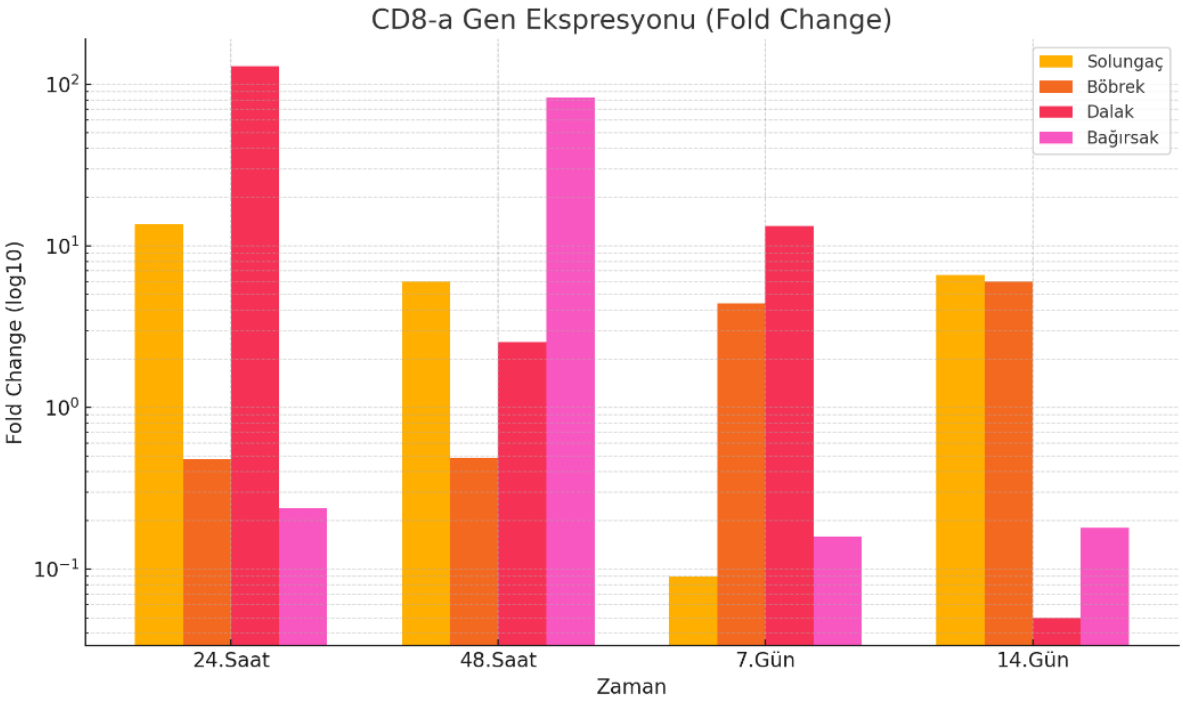
Şekil 166. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana

bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Grafik, adaptif bağışıklıkta görevli yardımcı T hücrelerinin zamansal aktivasyon paternini ortaya koymaktadır.

4.7.6.10 CD8-α Gen Ekspresyon Vulguları

- **Solungaç**: 14. günde belirgin artış, CD8**-α** sitotoksik T-hücrelerin mukozal düzeyde geç fazda aktive olduğunu ortaya koymaktadır. Bu, aşının hücresel bağışıklık üzerindeki etkisinin solungaçta da etkin olduğunu göstermektedir.
- **Ön Böbrek**: 14. günde yüksek ekspresyon ile sistemik **CD8-α** yanıt oluşmuştur.
- **Dalak**: 14. günde gözlenen yüksek ekspresyon, sistemik CD8+ T-hücre yanıtının aktive edildiğini göstermektedir. Bu durum, aşının antijen sunumu sonrası CTL gelişimini desteklediğini ortaya koymaktadır.
- **Bağırsak**: 7. günde izlenen çok güçlü artış, mukozal düzeyde lokal CD8+ T-hücre yanıtının erken dönemde aktive olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, aşının intestinal epitel düzeyinde patojen temizliğinde etkili olabileceğini göstermektedir.



Şekil 167. *L. petauri* enjeksiyon aşısı uygulamasını takiben CD8-α gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Grafik, aşının sitotoksik T hücre yanıtını nasıl yönlendirdiğini ortaya koymaktadır. *L. petauri* enjeksiyon aşısı, hem **CD4+ yardımcı T hücre** hem de **CD8+ sitotoksik T hücre**

ekspresyonlarını farklı doku ve zaman pencerelerinde belirgin şekilde aktive etmiştir. Solungaç ve bağırsak gibi mukozal yüzeylerde geç veya orta dönemdeki artışlar, aşının lokal immün yanıtları da uyarmadaki etkinliğini göstermektedir. Özellikle dalakta ve ön böbrekte geç fazda gözlenen dramatik artışlar, sistemik hücresel bağışıklığın güçlü şekilde devreye girdiğini ve aşının immünojenitesinin yüksek olduğunu desteklemektedir. CD4/CD8 yanıt profili birlikte ele alındığında, *L. petauri* aşısının adaptif immün sistemi etkin şekilde hedefleyerek koruyucu bağışıklık oluşturma potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.

4.7.7 İnaktif Beşli Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı (YLV5 ICIEV) Gen Ekspresyonu Bulguları

4.7.7.1 TLR-2 Gen Ekspresyonu Bulguları

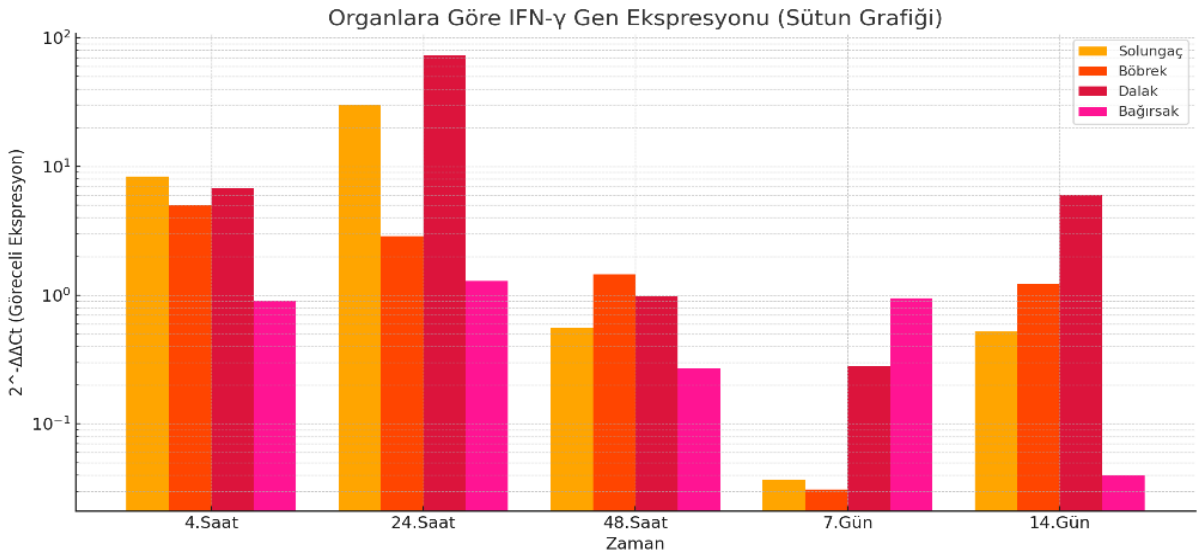
İnaktif Beşli Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı (YLV5 ICIEV) Gen Ekspresyonu Bulgularına ilişkin grafikler Şekil 169-178'de sunulmuştur.

Solungaç: 4. ve 24. saatlerde gözlenen çok güçlü ekspresyon artışı, TLR-2 aracılı doğuştan bağışıklık yanıtının hızlı ve güçlü şekilde aktive edildiğini göstermektedir. Bu artış, patojen ilişkili moleküler desenlerin (PAMPs) hızlı şekilde tanındığını göstermektedir. Ancak 48. saatten itibaren başlayan azalma ve 7. ile 14. günlerdeki baskılanma, mukozal yüzeyde **tolerans ve homeostatik düzenleme** sürecinin başladığını işaret etmektedir.

Ön Böbrek: Erken dönemde izlenen ekspresyon artışı, sistemik düzeyde doğuştan bağışıklığın hızlı uyarıldığını göstermektedir. Ancak 48. saatte ekspresyonun dengeye gelmesi ve sonraki zamanlarda baskılanması, sistemik TLR-2 yanıtının **geçici ve sınırlı** olduğunu ve **kontrollü inflamatuar denge** ile sınırlı kaldığını göstermektedir.

Dalak: 24. saatte görülen çok güçlü ekspresyon artışı, antijen sunumu ve immün hücre aktivasyonunun tetikleyici evresine işaret ederken; diğer zaman noktalarında ekspresyonun düşmesi, **dalak düzeyinde TLR-2 yanıtının kısa süreli** ve **dönemsel** olduğunu ortaya koymaktadır.

Bağırsak: lk üç zaman noktasında hafif baskılanma, 7. günde hafif artış ve 14. günde çok güçlü baskılanma gözlenmiştir. Bu durum, intestinal lenfoid dokuda TLR-2 uyarımının **sınırlı ve geçici** olduğunu, mukozal yüzeyin tolerogenik ortamı koruduğunu göstermektedir.



Şekil 168. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben TLR-2 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

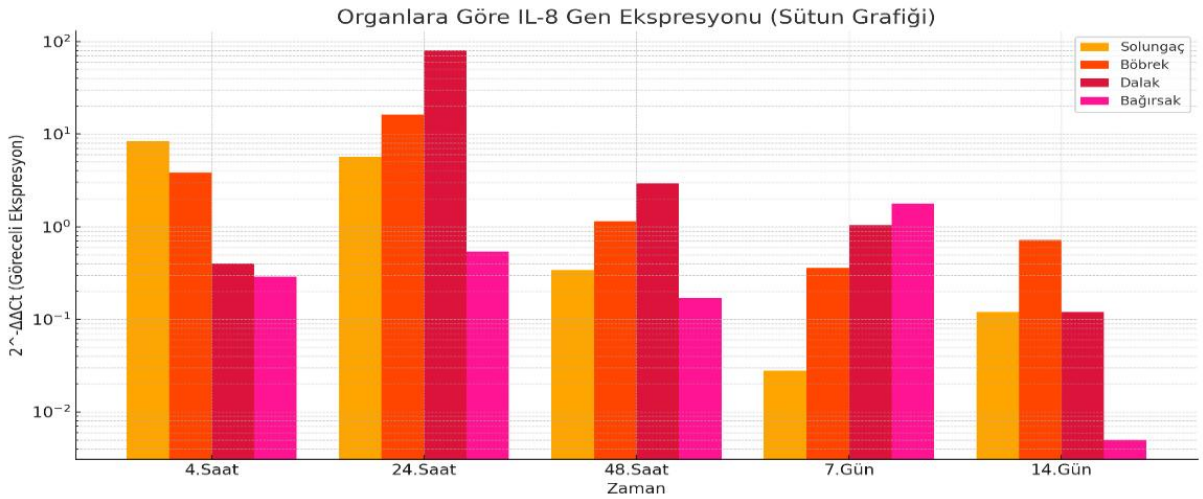
Organlara göre TLR-2 gen ekspresyon grafiki (4. Saat-14.gün). Grafik, her bir dokuda doğuştan bağışıklık reseptörü TLR-2'nin nasıl ve ne zaman aktive olduğunu göstermekte olup, aşı uygulamasına bağlı doğuştan bağışıklık modülasyonunu görsel olarak ortaya koymaktadır. YLV5 ICIEV aşı uygulaması, başta **solungaç ve ön böbrek** olmak üzere immün sistemin anahtar doku ve organlarında **TLR-2 ekspresyonunu erken dönemde etkin şekilde artırmıştır**. Bu artış, antijenin PAMP yapılarının bağışıklık sistemince hızlı şekilde tanındığını ve doğuştan bağışıklık mekanizmalarının devreye sokulduğunu göstermektedir. Ancak tüm organlarda 48. saatten sonra gözlenen **baskılanma eğilimi**, **immün regülasyon ve inflamasyonun sınırlandırılması açısından önemli bir adaptif geri dönüşüm mekanizması** olarak yorumlanmalıdır. Bu durum, YLV5 ICIEV aşısının **güçlü ancak kontrol altında tutulan doğuştan bağışıklık aktivasyonu** sağladığını göstermekte olup, aşının güvenli ve fizyolojik inflamatuar dengeyi bozmayan bir immünolojik profil sergilediğini desteklemektedir.

4.7.7.2 IL-8 Gen Ekspresyonu

Solungaç: 4. ve 24. saatlerde gözlenen güçlü IL-8 ekspresyonu, mukozal inflamatuar yanıtın erken fazda aktive olduğunu göstermektedir. Bu artış, patojen tanıma sonrası hızlı bir kemokin salınımını ve nötrofil aktivasyonunu işaret ederken, 48. saatten itibaren izlenen baskılanma, inflamasyonun **fizyolojik sınırlar içinde regülasyonunu** göstermektedir.

Ön Böbrek: Erken dönemde (4. ve 24. saat) belirgin IL-8 artışı, sistemik doğuştan bağışıklık yanıtının aktive olduğunu yansıtırken; 48. saatte dengeye ulaşması ve sonraki zaman noktalarında baskılanması, **kontrollü sistemik inflamatuar süreçleri** ortaya koymaktadır.

Dalak: 24. saatteki çok güçlü ekspresyon artışı, dalak düzeyinde IL-8 aracılığıyla **proinflamatuar sitokin aktivasyonunu** göstermektedir. 14. günde izlenen baskılanma ise geç dönem inflamatuar regülasyonun devreye girdiğini düşündürmektedir.
Bağırsak: İlk üç zaman noktasında (4., 24. ve 48. saat) baskılanma, 7. günde artış ve 14. günde çok güçlü baskılanma; **intestinal inflamatuar yanıtın zayıf, sınırlı ve geçici** olduğunu göstermektedir.



Şekil 169. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IL-8 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Organlara göre IL-8 gen ekspresyon grafiki (4. Saat-14.gün). Grafik, doğuştan bağışıklıkta IL-8'in erken fazda hızla yükseldiğini ve daha sonra baskılandığını ortaya koymaktadır.
YLV5 ICIEV aşı uygulaması sonrasında elde edilen IL-8 gen ekspresyon profili, aşının doğuştan bağışıklık sistemini hedefleyen erken inflamatuar yanıtları uyardığını, ancak bu etkinin zamanla fizyolojik sınırlar içinde regüle edildiğini ortaya koymaktadır.
Solungaç dokusunda, 4. ve 24. saatlerde gözlenen belirgin IL-8 artışı, aşı uygulamasını takiben mukozal yüzeyde hızlı bir inflamatuar yanıtın geliştiğini ve muhtemelen TLR-2 aracılı antijen tanıma sonrası kemokin salınımı ve nötrofil mobilizasyonunun devreye girdiğini göstermektedir. Bu yanıt, aşı yerinde antijen sunumu ve fagositik hücre aktivasyonuna zemin hazırlarken, 48. saatten itibaren görülen baskılanma, inflamasyonun çözülme sürecinin başlamış olduğunu ve doku hasarına yol açmadan bağışıklık cevabının kontrollü biçimde sınırlandığını düşündürmektedir. Bu durum, aşının immün regülasyon mekanizmalarını bozmadığını ve solungaç mukozasında geçici ve hedefe yönelik bir inflamatuar yanıtı tetiklediğini göstermesi açısından önemlidir.
Ön böbrek düzeyinde, IL-8 ekspresyonunun erken dönemde (4. ve 24. saat) artması, sistemik doğuştan bağışıklık yanıtının hızlı şekilde aktive edildiğine işaret eder. Ancak 48. saat ve

sonrasında ekspresyon düzeyinin dengeye ulaşması ve baskılanması, aşıya bağlı inflamatuar sürecin sistemik düzeyde geçici kaldığını ve inflamasyonun fizyolojik sınırlarda tutulduğunu göstermektedir. Bu özellik, kronik inflamasyon riskinin düşük olduğunu ve sistemik toksisiteye yol açmadan bağışıklığın eğitildiğini göstermesi açısından olumlu bir sonuçtur.

Dalakta 24. saatte görülen güçlü IL-8 artışı, bu ikincil lenfoid organın aşılama sonrası erken sitokin sinyalleriyle aktive olduğunu, bu yanıtın antijen sunumu, lenfosit mobilizasyonu ve inflamatuar yan ürünlerin kontrolü açısından önem taşıdığını göstermektedir. Ancak, 14. gündeki baskılanma, bu aktivitenin geçici olduğunu ve sistemik inflamasyonun daha sonraki fazlarda kontrol altına alındığını göstermektedir. Bu da dalak düzeyinde tolerans geliştirilmesi ve immün homeostazın sağlanması açısından değerlidir.

Bağırsak mukozasında IL-8 ekspresyonunun erken dönemde (4., 24. ve 48. saat) baskılanması ve sadece 7. günde kısa süreli bir artış göstermesi, intestinal yüzeyde proinflamatuar yanıtın oldukça zayıf ve geçici kaldığını göstermektedir. Bu durum, gastrointestinal dokularda aşırı inflamasyona karşı gelişmiş bir tolerans mekanizmasının bulunduğunu ve mukozal homeostazın korunmasına yönelik fizyolojik bir koruma refleksinin çalıştığını göstermektedir. Aynı zamanda, aşının oral tolerans veya enterik inflamasyon gibi istenmeyen etkiler yaratmadığını destekler niteliktedir.

Sonuç Olarak:

YLV5 ICIEV aşısı sonrası IL-8 gen ekspresyonunun zamana ve dokuya bağlı değişimi, **doğuştan bağışıklığın hızlı bir şekilde aktive edildiğini,** ancak bu cevabın kısa sürede regüle edilerek fizyolojik sınırlar içinde tutulduğunu ortaya koymaktadır. Bu özellik, **hem mukozal hem de sistemik düzeyde etkili ancak güvenli bir immün stimülasyon profili sunan bir aşı formülasyonuna işaret etmektedir**. IL-8 yanıtının erken aktivasyonu, aşı antijenlerinin etkili şekilde sunulmasını kolaylaştırırken, geç dönemdeki baskılanma ise inflamasyonun kronikleşmesini önlemiştir.

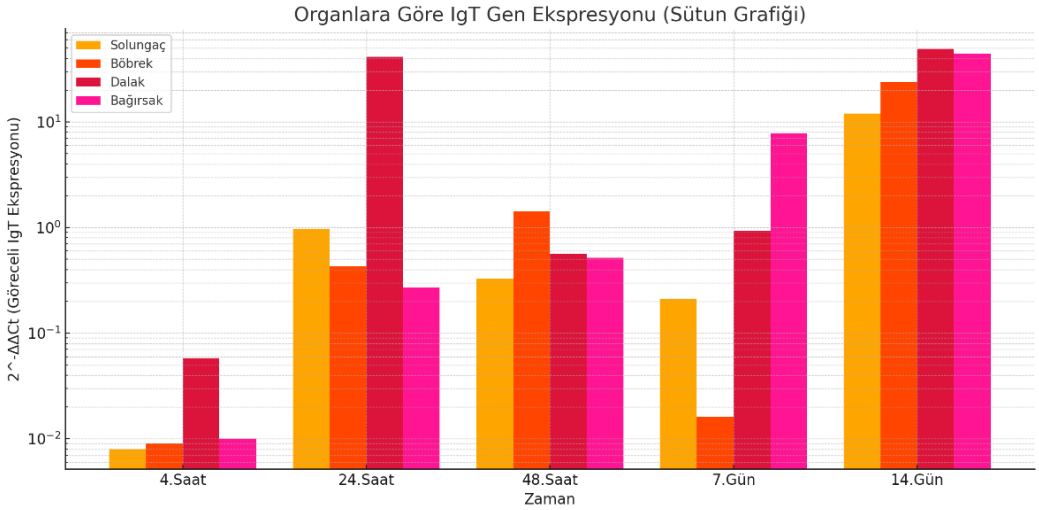
4.7.7.3 IgT Gen Ekspresyonu

Solungaç: Erken ve orta dönemlerde baskılanma, 14. günde belirgin IgT artışı ile sonuçlanmıştır. Bu durum, aşıya karşı **mukozal IgT yanıtının geç dönemde** devreye girdiğini ve **lokal humoral bağışıklığın** etkinleştiğini göstermektedir.

Ön Böbrek: İlk üç zaman noktasında baskılanma, 14. günde ise belirgin artış gözlenmiştir. Bu bulgu, sistemik IgT yanıtının **geç fazda aktive** edildiğini ve antijenle karşılaşma sonrası B-hücrelerinin olgunlaştığını düşündürmektedir

Dalak: 24. ve 14. günlerde çok güçlü IgT ekspresyonu, diğer zaman noktalarında baskılanma gözlenmiştir. Dalak düzeyinde **sekonder adaptif yanıtın geç dönemde IgT üzerinden** etkinleştiği anlaşılmaktadır. .

Bağırsak: 7. ve 14. günlerde gözlenen IgT artışı, **mukozal yüzeyde geç fazda spesifik antikor yanıtı** geliştiğini göstermektedir. Erken dönem baskılanması, muhtemel tolerojenik sürecin işaretidir



Şekil 170. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IgT gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben gözlenen **IgT gen ekspresyon profili**, balıklarda **mukozal ve sistemik humoral bağışıklığın geç fazda etkinleştiğini** ve aşının hedef dokularda antijen-spesifik adaptif yanıt oluşturduğunu ortaya koymaktadır. YLV5 ICIEV aşısı ile aşılama sonrası **IgT gen ekspresyonu**, hem sistemik (ön böbrek, dalak) hem de mukozal (solungaç, bağırsak) bağışıklık dokularında **geç fazda etkinleşen bir humoral bağışıklık profili** sergilemiştir. Bu durum, balıklarda IgT'nin hem **lokal hem sistemik düzeyde** özgül yanıtlar geliştirme kapasitesini göstermesi açısından önemlidir. Ayrıca erken dönemdeki baskılanma ve geç dönemdeki artış, aşının bağışıklık sistemini **faz-temelli ve kontrollü şekilde aktive ettiğini** düşündürmektedir. Bu yönüyle YLV5 ICIEV, **güvenli ve hedefe özgü mukozal aşı yanıtı oluşturma potansiyeli** taşımaktadır.

4.7.7.4 IgM Gen Ekspresyonu Bulguları

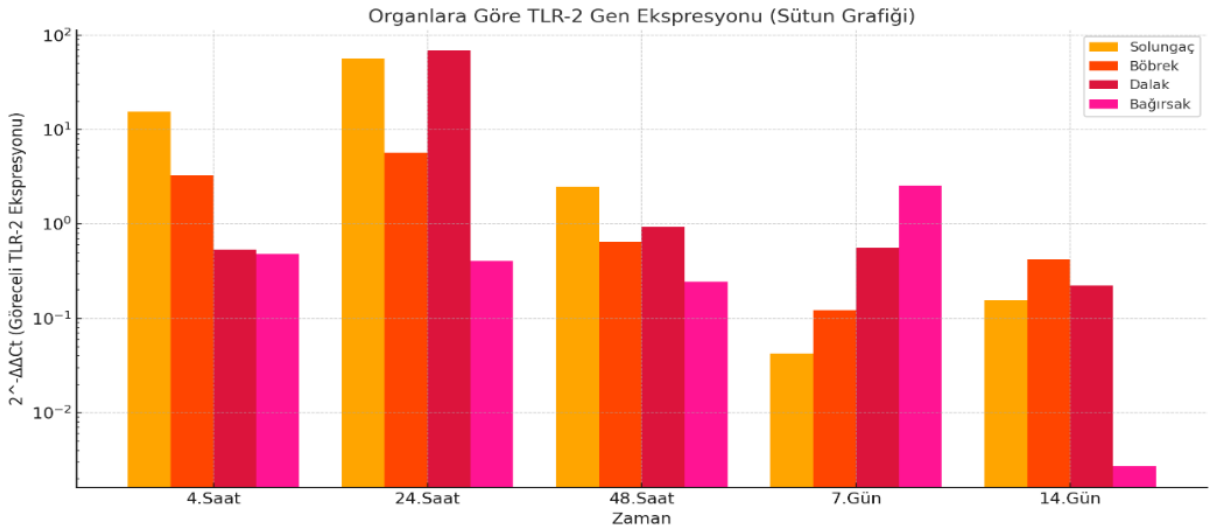
YLV5 ICIEV aşı uygulaması sonrasında IgM gen ekspresyonuna ilişkin bulgular, aşıya karşı gelişen **humoral bağışıklık yanıtının hem zamansal hem de dokuya özgü farklılıklar gösterdiğini** ortaya koymaktadır.

Solungaçta, 4. ve 24. saatlerdeki çok güçlü IgM ekspresyon artışı, **mukozal yüzeyde erken fazda humoral yanıtın hızla aktive olduğunu** göstermektedir. Bu, antijenin mukozal bariyerde hızlı tanınmasına ve lokal B hücrelerinin IgM üretimine yönelmesine işaret eder. Ancak 48. saatten sonra gözlenen baskılanma, bu erken yanıtın geç dönemde **fizyolojik düzeyde regüle edildiğini** düşündürmektedir.

Ön böbrekte (head kidney), doğuştan bağışıklık ve antikor üretimi için önemli bir lenfoid organ olması nedeniyle erken dönemde gözlenen belirgin IgM artışı, sistemik bağışıklığın da hızla devreye girdiğini göstermektedir. Fakat geç dönemdeki baskılanma, bu yanıtın **geçici olduğunu ve antijenik uyarının devam etmemesi durumunda sistemik IgM üretiminin sınırlandığını** düşündürmektedir.

Dalakta, 24. saatteki artış ve 7. günde gözlenen baskılanma, sekonder lenfoid organ düzeyinde **kısa süreli bir IgM aktivasyonu** olduğunu göstermektedir. Bu durum, dalakta antijenle karşılaşmaya bağlı olarak oluşan hızlı bir B-hücre cevabının, adaptif immün regülasyonla sınırlandığını düşündürebilir.

Bağırsakta, 7. gündeki çok güçlü IgM ekspresyonu, **mukozal yüzeyde gecikmeli fakat belirgin bir humoral yanıtın** geliştiğini göstermektedir. Diğer zaman noktalarında gözlenen baskılanma, bu aktivasyonun kısa süreli olduğunu ve mukozal yüzeyde IgM aracılı bağışıklığın geçici olabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 171. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IgM gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Şekilde sunulan zamana bağlı IgM gen ekspresyon profili, YLV5 ICIEV aşısının özellikle **erken fazda solungaç ve ön böbrek dokularında güçlü bir humoral yanıtı indüklediğini**, ancak bu yanıtın **geç dönemde sınırlı ve geçici bir şekilde sürdürülebildiğini** ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, YLV5 ICIEV aşısının IgM aracılı humoral bağışıklığı özellikle erken fazda etkin şekilde aktive ettiğini, ancak bu yanıtın uzun süreli sürdürülemediğini göstermektedir. Bu bulgular, aşının erken koruyuculuk sağlama potansiyeline işaret etmekle birlikte, ek doz uygulamalarının veya adjuvan optimizasyonunun uzun süreli humoral yanıt için gerekli olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle mukozal yüzeylerdeki hızlı IgM aktivasyonu, ilk enfeksiyon bariyerinde etkili savunmanın oluşmasına katkı sağlayabilir.

4.7.7.5 . C3 Gen Ekspresyonu Bulguları

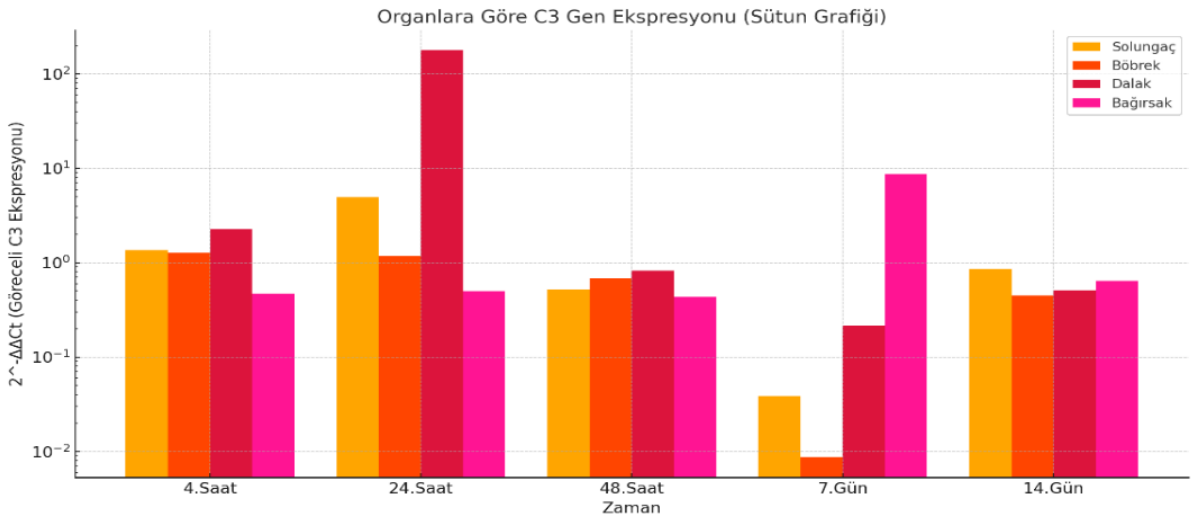
C3 geni, kompleman sisteminin merkez bileşenlerinden biri olup, hem klasik hem de alternatif yol üzerinden antijenlerin tanınması, opsonizasyon ve immün hücrelerin aktivasyonunda kritik rol oynar. İnflamatuar sürecin erken fazında etkin olan C3, aşı uygulamalarında doğuştan bağışıklık sisteminin aktivasyon profiline dair önemli bilgiler sunar. Bu bağlamda, C3 geninin farklı dokularda ve zaman noktalarında ekspresyon seviyeleri, YLV5 ICIEV aşısının doğuştan bağışıklık üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Buna göresolungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularındaki değişimler aşaıda sunulmuştur:

Solungaç: 24. saatte belirgin ekspresyon artışı gözlenmiş, 7. günde baskılanma ile yanıt sınırlanmıştır. Mukozal yüzeyde kompleman sisteminin kısa süreli aktive olduğu anlaşılmaktadır.

Ön Böbrek: Tüm zaman noktalarında ekspresyon seviyesi dengede kalmış veya hafif baskılanma göstermiştir. Bu durum, sistemik düzeyde C3 yanıtının sınırlı kaldığını düşündürmektedir.

Dalak: 24. saatte gözlenen güçlü artış, erken fazda dalak düzeyinde kompleman sisteminin aktive olduğunu göstermektedir. 7. ve 14. günlerdeki baskılanma ise geç dönemde bu yanıtın düzenlendiğini ortaya koymaktadır.

Bağırsak: 7. günde belirgin artış izlenirken, diğer zaman noktalarında baskılanma gözlenmiştir. Bu bulgu, bağırsakta C3 aracılı mukozal yanıtın geç dönemde sınırlı şekilde aktive edildiğini göstermektedir.



Şekil 172. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben C3 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Organ bazlı zaman-serileri, kompleman sisteminin dokuya özgü aktivasyon profillerini görsel olarak yansıtmaktadır.

YLV5 ICIEV aşısı sonrası **C3 gen ekspresyon profili**, dokular arası farklılık göstermiştir. Solungaç ve dalakta erken dönemde gözlenen ekspresyon artışları, aşının lokal ve sistemik düzeyde kompleman sistemini hızla uyardığını göstermektedir. Bununla birlikte, geç dönemlerdeki baskılanma eğilimi, inflamatuar sürecin fizyolojik sınırlar içinde tutulduğunu ve kontrol mekanizmalarının etkin çalıştığını göstermektedir. Özellikle ön böbrekte ekspresyonun sınırlı kalması, sistemik kompleman yanıtının bu aşı protokolünde baskılı seyrettiğini düşündürmektedir. Bağırsakta gözlenen 7. gün ekspresyon artışı ise, geç dönemde lokal tamamlayıcı aktivasyonun devreye girdiğine işaret etmektedir.

4.7.7.6 IL-10 Gen Ekspresyonu Bulguları

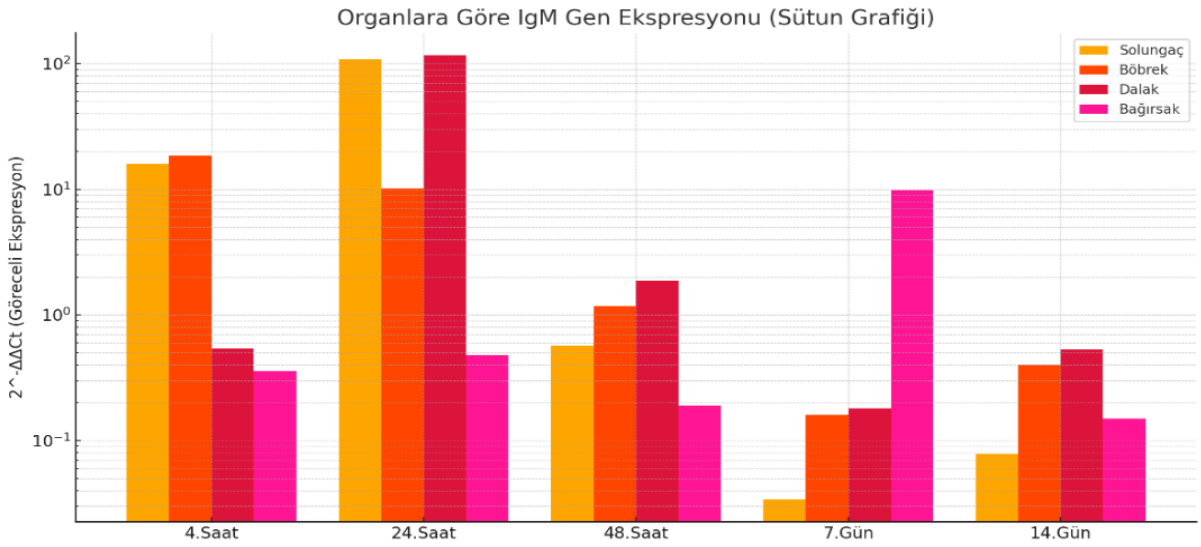
İmmün yanıtın zamana ve dokuya bağlı olarak farklılaşan özellikleri, IL-10 gen ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesiyle ayrıntılı şekilde ortaya konmuştur. Aşağıda sunulan bulgular, YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında Ig10 aracılı humoral bağışıklığın zamansal aktivasyon paternlerini yansıtmaktadır. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IL-10 gen ekspresyon profilleri, dokular arası farklılık göstermiştir:

Solungaç: Erken ve orta dönemlerde baskılanma izlenmiş, 14. günde belirgin IgT artışı saptanmıştır. Bu durum, aşıya karşı mukozal IgT yanıtının geç dönemde devreye girdiğini ve lokal humoral bağışıklığın etkinleştiğini göstermektedir.

Ön Böbrek: İlk üç zaman noktasında baskılanma, 14. günde ise anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. Sistemik IL-10 yanıtı geç fazda aktive edilmiş, bu da antijenik uyarıya karşı B-hücrelerinin geç olgunlaştığını düşündürmektedir.

Dalak: 24. ve 14. günlerde gözlenen çok güçlü ekspresyon, diğer zamanlarda baskılanma ile birlikte, dalak düzeyinde sekonder adaptif yanıtın geç dönemde IL-10 üzerinden aktifleştiğini göstermektedir.

Bağırsak: 7. ve 14. günlerde gözlenen IL-10 artışı, mukozal yüzeyde geç fazda spesifik antikor yanıtı geliştiğini ortaya koymaktadır. Erken dönem baskılanması ise muhtemel tolerojenik sürecin bir yansımasıdır.



Şekil 173. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IL-10 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Grafik, dokulara özgü ekspresyon dinamiklerini ortaya koyarak lokal (solungaç, bağırsak) ve sistemik (ön böbrek, dalak) IgT yanıtlarının geç dönemde belirginleştiğini göstermektedir.
YLV5 ICIEV enjeksiyon aşısı sonrasında gözlemlenen IL-10 gen ekspresyon profili, hem sistemik hem de mukozal bağışıklığın geç fazda aktive edildiğini ortaya koymaktadır. Özellikle 14. günde hemen tüm dokularda gözlenen belirgin IL-10 artışı, aşıya karşı spesifik adaptif humoral yanıtın geç dönemde devreye girdiğini ve B-hücre farklılaşmasının bu süreçte etkili olduğunu göstermektedir.
Mukozal yüzeyler açısından değerlendirildiğinde; solungaç ve bağırsak dokularında erken dönem baskılanma sonrası gelişen IL-10 artışı, aşının lokal mukozal bağışıklık üzerinde gecikmeli ancak anlamlı bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Bu durum, balıklarda IgT'nin mukozal immüniteyi destekleyici özgün işlevine işaret etmektedir.
Sistemik bağışıklık açısından ise ön böbrek ve dalak gibi lenfoid organlarda geç dönemde gözlenen IL-10 artışı, IL-10'nun plazmasitik antikor yanıtındaki yerini desteklemekte ve aşının sistemik düzeyde adaptif humoral yanıtı uyarma kapasitesini ortaya koymaktadır.

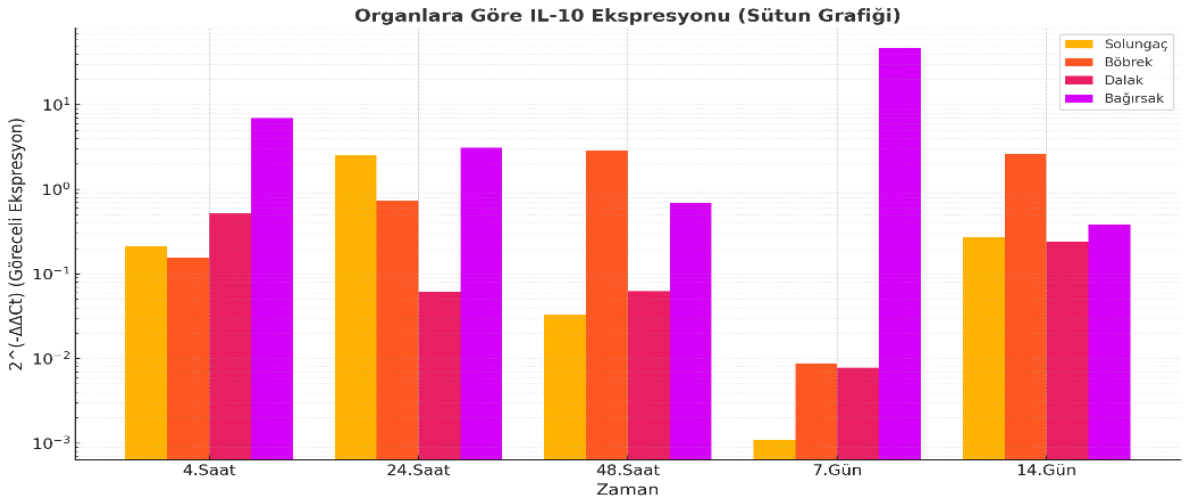
4.7.7.7 IL-1β Gen Ekspresyonu Bulguları

YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IL-1β gen ekspresyon profilleri, dokular arası belirgin farklılık göstermiştir:
Solungaç: 4. ve 24. saatlerde artış izlenmiş, bunu takiben 48. saatten itibaren baskılanma gözlenmiştir. Bu durum, solungaç mukozasında IL-1β aracılı doğuştan inflamatuar yanıtın erken dönemde aktive edildiğini ve inflamasyonun fizyolojik sınırlar içinde sonlandığını göstermektedir.

Ön Böbrek: 24. saatte belirgin artış, 7. günde ise baskılanma gözlenmiştir. Sistemik düzeyde IL-1β yanıtının erken fazda aktive olduğu, ancak antijen temizliğinin ardından baskılandığı anlaşılmaktadır.

Dalak: 4. saatteki artış, doğuştan bağışıklığın ilk aktivasyonunu; 24. saatteki baskılanma ise bu yanıtın geçici olduğunu göstermektedir. Diğer zaman noktalarında denge durumu izlenmiştir.

Bağırsak: 7. günde gözlenen artış, intestinal dokuda gecikmeli bir inflamatuar yanıtın geliştiğini; diğer zamanlardaki baskılanma ise mukozal homeostazın hızlı biçimde korunduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 174. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IL-1β gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

IL-1β gen ekspresyonuna ilişkin bulgular, YLV5 ICIEV aşısının hem mukozal hem sistemik düzeyde inflamatuar sitokin yanıtını erken dönemde uyardığını göstermektedir. Özellikle solungaç ve ön böbrekte erken artış gözlenmesi, aşıya karşı doğuştan bağışıklık sisteminin hızla aktive edildiğini desteklemektedir. Bununla birlikte, sonraki zaman noktalarında izlenen ekspresyon baskılanması, inflamasyonun kontrollü bir şekilde düzenlendiğine ve aşının aşırı immün aktivasyondan kaçınarak immün homeostazı koruduğuna işaret etmektedir.

4.7.7.8 IFN-γ Gen Ekspresyonu Bulguları

Interferon-gamma (IFN-γ), hem doğuştan hem de kazanılmış bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan sitokindir. Özellikle viral enfeksiyonlara karşı immün savunmayı destekleyen IFN-γ, makrofajların aktivasyonu, MHC sınıf I ve II ekspresyonunun artırılması ve Th1 hücre yanıtının yönlendirilmesi açısından kritik bir belirteçtir. Bu nedenle, IFN-γ gen ekspresyonunun zaman ve doku bazlı profili, uygulanan aşının hücresel bağışıklık üzerindeki etkinliğinin

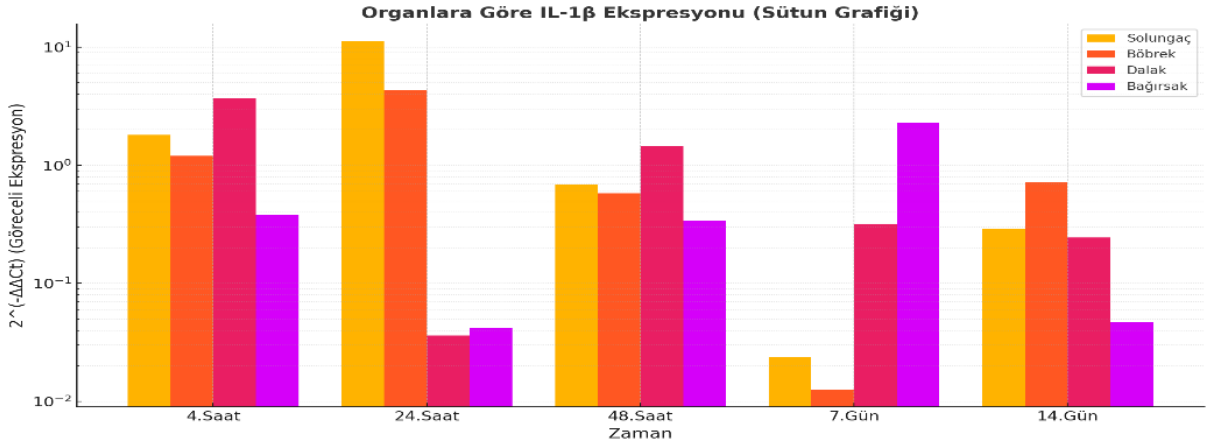
değerlendirilmesinde temel parametrelerden biridir. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben **IFN-γ** gen ekspresyon profilleri, dokular arası belirgin farklılık göstermiştir:

Solungaç: 4. ve 24. saatlerde gözlenen çok güçlü ekspresyon artışı, mukozal yüzeyde IFN-γ aracılığıyla antiviral doğuştan bağışıklık yanıtının erken fazda etkin şekilde aktive olduğunu göstermektedir. Sonraki zamanlardaki baskılanma ise bu yanıtın kısa süreli olduğunu düşündürmektedir.

Ön Böbrek: İlk üç zaman noktasında (4., 24. ve 48. saat) artış gözlenmiş, 7. günde baskılanma, 14. günde ise denge hali izlenmiştir. Bu bulgular, sistemik düzeyde IFN-γ yanıtının erken fazda aktive olduğunu, ancak geç dönemde regüle edildiğini ortaya koymaktadır.

Dalak: 24. saatte çok güçlü ekspresyon artışı gözlenmiş, 7. günde baskılanmış, 14. günde ise yeniden yükselmiştir. Bu dalgalı yanıt profili, dalak düzeyinde IFN-γ aracılı kazanılmış immün yanıtın düzensiz fakat tekrar eden aktivasyon gösterdiğini işaret etmektedir.

Bağırsak: 24. saatte hafif bir artış saptanmış, bunu 48. saatte ve özellikle 14. günde belirgin baskılanma takip etmiştir. Bu durum, bağırsak mukozasında IFN-γ'ya bağlı antiviral yanıtın sınırlı ve kısa süreli kaldığını, muhtemelen lokal tolerans mekanizmalarının baskın olduğunu göstermektedir



Şekil 175. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben IFN-γ gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Grafik, dokuya özgü antiviral yanıtların zamansal dinamiğini ve aşının bağışıklık sistemi üzerindeki hücresel etkilerini görsel olarak yansıtmaktadır.

YLV5 ICIEV aşısı sonrası IFN-γ ekspresyon profilleri, dokular arasında farklılık göstermiştir. Solungaç ve ön böbrekte erken dönemde gözlenen yüksek ekspresyon, aşının doğuştan antiviral bağışıklık sistemini hızlı şekilde aktive ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, özellikle bağırsakta gözlenen baskılanma eğilimi, mukozal bölgelerde homeostatik düzenleyici mekanizmaların IFN-γ üretimini sınırlandırdığını göstermektedir. Dalak düzeyinde izlenen

dalgalı yanıt ise, aşının sistemik kazanılmış bağışıklık üzerindeki erken ve geç dönem olmak üzere iki fazlı bir şekilde ortaya çıktığını düşündürmektedir. Bu veriler, YLV5 ICIEV aşısının hücresel immün modülasyon profiline dair önemli ipuçları sunmaktadır**.**

4.7.7.9 CD4-1 Gen Ekspresyonu Bulguları

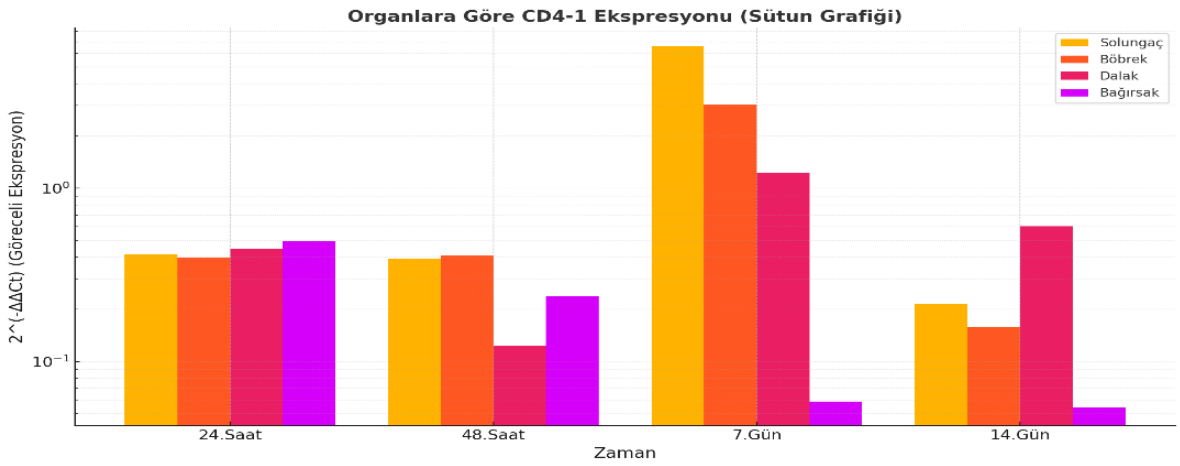
YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben **CD4-1** gen ekspresyon profillerinin, dokular arasında gösterdiği değişimler belirgin aşağıda sunulmuştur:

Solungaç: 7. günde gözlenen ekspresyon artışı, mukozal düzeyde CD4+ T-hücrelerinin geç dönemde aktive olduğunu göstermektedir. Diğer zamanlardaki baskılanma, yanıtın zamansal olarak sınırlı olduğunu düşündürmektedir.

Ön Böbrek: 7. günde belirgin artış izlenmiş, diğer zaman noktalarında baskılanma gözlenmiştir. Bu, sistemik CD4-1 T-hücre aktivasyonunun geç dönemde kısa süreli olduğunu göstermektedir.

Dalak: 7. günde hafif düzeyde ekspresyon artışı saptanmış, diğer zamanlarda baskılanma izlenmiştir. Dalak düzeyinde CD4-1 T-hücre yanıtının zayıf kaldığı anlaşılmaktadır.

Bağırsak: 4. saatte hafif artış, 7. günde güçlü baskılanma ve 14. günde tekrar belirgin artış gözlenmiştir. Bu durum, bağırsak mukozasında CD4-1 yanıtın dalgalı seyir izlediğini ve geç dönemde kısmen aktive olduğunu göstermektedir.



Şekil 176. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben CD4-1 gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Grafik, yardımcı T hücre (Th) aktivitesinin organ bazlı zamanlamasını yansıtmaktadır. YLV5 ICIEV aşısı sonrası **CD4-1** ekspresyon profili, özellikle solungaç ve ön böbrekte 7. günde artış göstererek geç dönemde sınırlı bir **yardımcı T-hücre** aktivasyonunu işaret etmektedir. Dalakta zayıf ve bağırsakta dalgalı seyreden ekspresyon, aşının kazanılmış bağışıklık üzerindeki CD4+ hücre aracılı etkisinin sınırlı düzeyde kaldığını göstermektedir. Mukozal düzeyde geç

dönemde başlayan bu yanıtın, aşının lokal lenfoid dokularda CD4-1 T-hücre yanıtını destekleme kapasitesinin zayıf olduğunu ortaya koymaktadır.

4.7.7.10 CD8-α Gen Ekspresyonu Bulguları

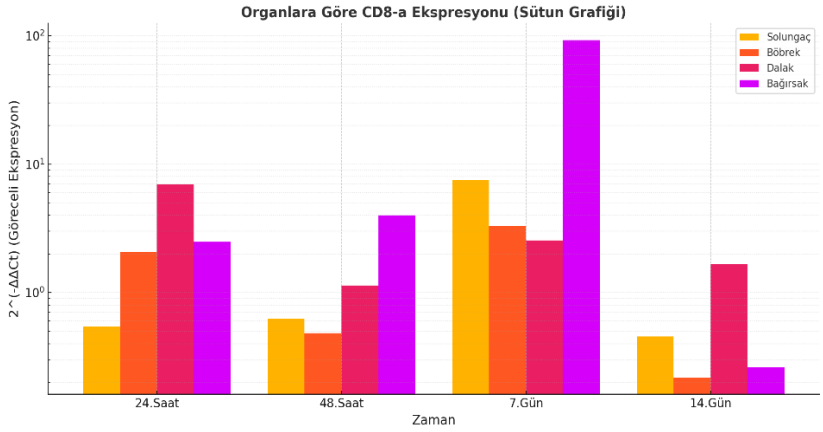
CD8-α geninin doku bazlı ekspresyon düzeyleri, aşının sitotoksik T hücre yanıtı üzerindeki etkisini değerlendirmek açısından önemli ipuçları sunmaktadır. Bu kapsamda, farklı immünolojik dokularda zamana bağlı olarak oluşan **CD8-α** ekspresyon değişimleri aşağıda özetlenmiştir:

Solungaç: 7. günde gözlenen çok güçlü ekspresyon artışı, mukozal düzeyde $CD8^+$ sitotoksik T-hücrelerin geç dönemde aktive olduğunu göstermektedir. Bu geç yanıt, lokal sitotoksik bağışıklığın sınırlı ve zamana bağlı geliştiğini düşündürmektedir.

Ön Böbrek: 24. saatte başlayan ve 7. günde belirginleşen artış, sistemik düzeyde $CD8^+$ hücre aracılı bağışıklığın geç dönemde aktive edildiğini göstermektedir. Diğer zaman noktalarında izlenen baskılanma, kontrollü bir sitotoksik yanıtı işaret etmektedir.

Dalak: 24. saatte çok güçlü artış ve 7. ile 14. günlerde devam eden yukarı regülasyon, dalak düzeyinde güçlü ve süreğen bir $CD8^+$ T-hücre yanıtının geliştiğini göstermektedir. Bu, kazanılmış hücresel bağışıklığın aktif bir göstergesidir.

Bağırsak: 7. günde gözlenen çok güçlü artış, mukozal yüzeyde geçici fakat yoğun bir $CD8^+$ sitotoksik yanıtın varlığını göstermek



Şekil 177. YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben CD8-α gen ekspresyonunun solungaç, ön böbrek, dalak ve bağırsak dokularında 4. saat ile 14. gün arasındaki zamana bağlı değişimi grafiksel olarak sunulmaktadır.

Şekil, sitotoksik T-lenfosit (CTL) yanıtlarının organ bazlı zamansal dinamiklerini göstermektedir.

CD8-α gen ekspresyon profilleri, YLV5 ICIEV aşısının hücresel bağışıklık aktivasyonu açısından güçlü bir uyarıcı rol üstlendiğini ortaya koymuştur. Özellikle dalak ve ön böbrek

düzeyinde gözlenen ekspresyon artışları, sistemik sitotoksik T-hücre yanıtının etkili biçimde aktive edildiğini göstermektedir.

Solungaç ve bağırsak gibi mukozal dokularda ise yanıtın geç ve sınırlı kaldığı, ancak kısa süreli etkin bir aktivasyon oluşturduğu anlaşılmaktadır.

Bu bulgular, aşının sitotoksik bağışıklık üzerindeki etkisinin daha çok sistemik düzeyde belirginleştiğini, mukozal yüzeylerde ise zamana duyarlı geçici yanıtlar oluşturduğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Proje kapsamında bakteriyolojik örnekleme ve çevresel parametre takibi amacıyla seçilen pilot işletmeler, Türkiye'nin iki farklı iklim ve hidrojeokimyasal özellik gösteren bölgesinde konumlandırılmıştır: **İç Anadolu Bölgesi (karasal iklim, kaynak/artezyen suyu) ve Batı Karadeniz/Marmara Bölgesi (ılıman iklim, baraj/dere suyu)**. Bu farklılıklar, bakteriyel patojenlerin dağılımı, sucul ortamların mikrobiyal yükü ve balık sağlığı üzerinde önemli etkilere sahiptir.

Yıllık izleme süresince her iki işletmede düzenli olarak ölçülen **su sıcaklığı (sT)** ve **çözünmüş oksijen (ÇO)** düzeyleri, bakteriyel aktivite ve enfeksiyon insidensinin belirlenmesinde önemli biyotik olmayan (abiotik) belirteçler olarak değerlendirilmiştir. Literatürde de belirtildiği üzere, **yüksek sıcaklık ve düşük çözünmüş oksijen seviyesi**, balıklarda fizyolojik stresin artmasına ve opportunistik patojenlerin (ör. *Aeromonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*) baskın hale gelmesine neden olmaktadır (Austin ve Austin, 2016; Karvonen vd. 2010; FAO 2018).

A İşletmesi, üç farklı üretim lokasyonuna sahip olması nedeniyle oldukça kompleks bir üretim modeline sahiptir. Özellikle **AS Tesisi**, yaz aylarında 18.5 °C'ye kadar yükselen su sıcaklıkları ve zaman zaman 6.5 mg/L'ye kadar düşen ÇO düzeyi ile bakteriyel enfeksiyonlar açısından riskli bir ortam sunmaktadır. Çalışmamızda, bu dönemde AS tesisinde izole edilen suşların çoğunda fenotipik virülens faktörleri (jelatinaz, hemolizin) pozitif bulunmuş, bu da çevresel stres faktörleri ile bakteriyel patogenez arasında korelasyon olduğunu göstermiştir. Özellikle sıcaklık artışlarının *V. anguillarum* ve *L. garvieae* gibi türlerde hem virülens gen ekspresyonunu hem de enfektiviteyi artırdığı önceki çalışmalarda da vurgulanmıştır (Spanggaard vd. 2000; Duman vd. 2020).

Öte yandan, **AK Tesisi** gibi kaynak suyuyla beslenen düşük sıcaklıklı kuluçkahane ortamlarında bakteri izolatlarının sayıca daha az ve virülens düzeylerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum, su kaynağının tipinin (kaynak suyu, artezyen, dere suyu) mikrobiyal yük ve patojen çeşitliliği üzerindeki etkisini bir kez daha doğrulamaktadır (Buller, 2004).

B İşletmesi, yıl boyunca 12–13 °C sabitlenen **artezyen suyu sıcaklığı** ve **7–8.5 mg/L çözünmüş oksijen düzeyi** ile daha kontrollü ve stabil bir çevresel profile sahiptir. Ancak özellikle Temmuz–Ağustos aylarında ÇO düzeyinin 6.7 mg/L'ye kadar düşmesi, patojen suşlarının izolasyon oranında artışla paralellik göstermiştir. Bu periyotta izole edilen bazı *Y. ruckeri* ve *L. petauri* suşlarında yüksek virülens profilleri belirlenmiştir.

B işletmesinin kuluçkahane ve üretim havuzlarında sıvı oksijen desteği sağlanması, CO_2 toksisitesi ve asidozisi önlemekte, bu da balıklarda stres kaynaklı bağışıklık düşüşünü engelleyerek bakteriyel enfeksiyonlara karşı direnç sağlamaktadır. Ancak sıcaklık ve oksijen seviyelerinde görülen sınırlı dalgalanmalar bile mikrobiyal dengenin bozulmasına neden olabilmektedir.

Bu çalışma, su kalitesi parametrelerinin balık patojenlerinin izolasyon oranı ve virülens düzeyleri üzerindeki belirleyici rolünü açık biçimde ortaya koymuştur. Su sıcaklığının 14–18 °C aralığını ulaştığı dönemlerde hem örnek sayısı hem de yüksek virülens faktörü gösteren izolat sayısı artmıştır. Bu durum, FAO'nun (2018) da belirttiği gibi iklim değişikliği ve çevresel stres faktörlerinin akuakültür hastalık dinamiklerini doğrudan etkilediğini göstermektedir.

Ayrıca, su kaynaklarının tipi, üretim modeli (kafes, havuz, kuluçkahane), oksijen takviyesi ve bölgesel iklim farklılıkları; sadece hastalık gelişimini değil, aynı zamanda antimikrobiyal direnç gelişimini de etkilemektedir. Bu nedenle, pilot işletmelerin çevresel parametrelerinin izlenmesi, hastalık kontrolü ve aşı geliştirme çalışmalarına altyapı sağlamak açısından son derece kritik bir araçtır.

Sonuç olarak; pilot işletmelerin çevresel koşullarının bakteriyel hastalık dinamiklerine etkisini açıklarken, aynı zamanda örnekleme sonuçlarının yorumlanmasına bilimsel zemin sağlamaktadır.

Proje kapsamında yürütülen bakteriyolojik analizlerde; *Y. ruckeri*, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* başta olmak üzere gökkuşağı alabalıklarında patojenite potansiyeli taşıyan çok sayıda suşun izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatların tanımlanmasında, klasik fenotipik testlerin yanı sıra, **MALDI-TOF MS teknolojisi** temelinde geliştirilen yeni nesil protein temelli tanı yaklaşımları kullanılmıştır. Bu yöntem, özellikle su ürünleri patojenlerinin hızlı ve güvenilir identifikasyonunda, klasik biyokimyasal testlere göre önemli avantajlar sağlamaktadır (Böhme vd, 2010; Jansson vd. 2020).

MALDI-TOF MS analizlerinin doğrulaması amacıyla çoklu gen dizilemesi (16S rRNA, gyrB, rpoB) kullanılmış; hem fenotipik hem de moleküler düzeyde yüksek doğruluk (%98 ve üzeri uyum) elde edilmiştir. Bu sonuçlar, ülkemizde su ürünleri sektöründe ilk kez **yerli izolatlardan oluşturulmuş MALDI-TOF MS veri kütüphanesi** ile desteklenmiştir. Bu yaklaşım, Bruker ticari kütüphanesinde bulunmayan su ürünleri bakterilerinin tanımlanmasını mümkün kılarak teşhiste özgüllüğü artırmıştır.

Bu proje kapsamında izole edilen bakteri suşlarının tanımlanmasında klasik fenotipik testlerin ötesine geçilerek, **modifiye edilmiş MALDI-TOF MS (etanol-formik asit ekstraksiyonu)** yöntemi temelinde modern, hızlı ve duyarlı bir tanı yaklaşımı benimsenmiştir. Bu yöntem, özellikle klasik biyokimyasal testlerle ayırt edilmesi güç olan türlerin (ör. *L. petauri*) kesin tanımlanmasında yüksek başarı göstermiştir. Ön tanımlamada kullanılan **formik asit ekstraksiyon protokolü**, Bruker veri kütüphanesindeki sınırlı kapsama rağmen *L. garvieae*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum* gibi türlerde güvenilir sonuçlar vermiştir. Ancak proje kapsamında oluşturulan **yerel protein kütüphanesi**, tanı başarısını %98'in üzerine taşımıştır.

Etanol-formik asit yönteminin kullanılmasıyla, toplamda 412 izolatın 399'u kesin olarak tanımlanmış ve 13 izolat, önceki Bruker kütüphanesinde yer almamasına rağmen yeni oluşturulan **yerel veri tabanı** sayesinde başarılı şekilde teşhis edilmiştir. Bu durum, Türkiye su

ürünleri sektöründe ilk kez **bölgeye özgü bir MALDI-TOF MS tanı kütüphanesinin** oluşturulması açısından önemli bir bilimsel çıktıdır.

Tanımlama doğrulaması için yapılan **filogenetik analizlerde**, üç farklı gen (16S rRNA, gyrB, rpoB) kullanılmış ve izolatların tür düzeyinde sınıflandırmaları sağlam moleküler temellere dayandırılmıştır. Bu analizler sonucunda, örneğin *L. petauri* ile *L. garvieae* arasındaki ayrımlar net şekilde belirlenmiş, yanlış sınıflandırmaların önüne geçilmiştir. Özellikle *L. garvieae* olarak kayıtlara geçen bazı izolatların filogenetik analizler sonucunda aslında *L. petauri* olduğu doğrulanmıştır. Bu bulgu, Türkiye'de bu patojenin alabalıklardaki varlığını ortaya koyan ilk sistematik çalışmalardan biri olarak değerlendirilebilir.

Ayrıca *Y. ruckeri* izolatlarında, serotip O1'e ait BT1 ve BT2 biyotiplerinin moleküler düzeyde ayrımları başarıyla yapılmış, bu da aşı suşlarının seçimi ve virülens analizleri açısından kritik öneme sahip olmuştur. Öte yandan *V. anguillarum* izolatlarının serotip O1'e ait olduğu hem moleküler hem de antiserum temelli serolojik analizlerle doğrulanmıştır. Bu kapsamda üretilen hiperimmün antiserumlar, saha izolatlarının serotip tayininde başarıyla kullanılmıştır.

Proje çıktıları, su ürünleri hastalıklarının tanısında klasik fenotipik testlerin tek başına yeterli olmadığını, özellikle yüksek varyasyon gösteren patojenlerde **proteomik, moleküler ve serolojik tekniklerin birlikte kullanılmasının kaçınılmaz olduğunu** göstermiştir. Özellikle Türkiye'ye özgü suşlardan oluşturulan protein spektrumlarıyla geliştirilen yerel veri kütüphanesi, sadece tanı değil, aynı zamanda sektörel aşı geliştirme ve biyogözetim stratejileri için de referans niteliği taşımaktadır.

Bu yönüyle proje, hem literatür hem de ulusal uygulama açısından **yeni nesil bakteriyel tanılama altyapısının** oluşturulmasına ve yerli suşlarla aşı geliştirme sürecinin bilimsel temelinin güçlendirilmesine önemli katkı sağlamıştır.

Ayrıca, *L. petauri* gibi yeni sınıflandırılmış türlerin, fenotipik olarak *L. garvieae* ile kolayca karışabilmesi, moleküler ve proteomik doğrulama tekniklerinin önemini bir kez daha ortaya koymuştur. Nitekim bu projede daha önce "*L. garvieae*" olarak tanımlanmış bazı saha izolatlarının *L. petauri* olduğu genom analizleriyle doğrulanmıştır. Bu durum, geçmiş literatürde bildirilen izolasyon oranlarının da yeniden değerlendirilmesini gerektirecek düzeyde bir taksonomik revizyonu işaret etmektedir (Goodman et al., 2017; Piamsomboon vd.., 2020).

İzolatların doğrulama sürecinde yapılan filogenetik analizlerde, özellikle *Y. ruckeri* suşlarının BT1 ve BT2 biyotipleri arasında belirgin dizilim farkları saptanmıştır. Bu biyotipler arası farklılıklar, hem virülens potansiyelinin hem de aşı yanıtlarının farklılaşmasına neden olabilmektedir. Aynı şekilde, *V. anguillarum* O1 serotipine ait saha suşlarının filogenetik olarak referans NCIMB suşlarıyla %98 üzeri benzerlik göstermesi, seçilen prototip aşı suşlarının saha uyumu açısından uygun olduğunu desteklemektedir.

Bu izolatlara yönelik yapılan **SDS-PAGE ve Western blot protein profili analizleri**, aynı tür içerisindeki farklı saha suşlarının immünojenik çeşitliliğini ortaya koymuş; serolojik farklılıkların

aşı geliştirme sürecinde dikkate alınması gerektiğini göstermiştir. Bu bulgular doğrultusunda, antijenik profili en geniş olan ve hem moleküler hem de serolojik olarak sahada baskın bulunan suşlar, “master seed” ve “working seed” olarak tanımlanmış ve aşılama denemelerine entegre edilmiştir.

Bu bölümde elde edilen bulgular, balık hastalıklarının tanısında klasik fenotipik testlerin artık tek başına yeterli olmadığını, özellikle sahada yüksek varyasyon gösteren patojen gruplarında **moleküler, proteomik ve serolojik tekniklerin entegrasyonunun zorunlu** hale geldiğini açıkça ortaya koymuştur. Türkiye’ye özgü izolatlardan oluşan bir referans kütüphane kurulmuş olması, hem hastalık tanısında hem de sektörel tanı kitlerinin geliştirilmesinde ciddi bir kapasite artışı sağlayacaktır.

Proje kapsamında yürütülen antimikrobiyal duyarlılık analizleri, hem disk difüzyon hem de broth mikrodilüsyon yöntemleriyle gerçekleştirilmiş ve sonuçlar, izole edilen bakteri suşlarının fenotipik direnç dağılımını ortaya koymanın yanı sıra, Türkiye’ye özgü **epidemiyolojik cut-off (ECOFF/ECV)** değerlerinin tanımlanmasına da olanak sağlamıştır. Bu değerler, klinik eşiklerden farklı olarak doğal populasyonlar içinde dirençli alt grupların ayrımını sağladığı için, özellikle su ürünleri patojenlerinin izlenmesinde **rasyonel antibiyotik kullanımı** açısından kritik önemdedir (Rigos vd. 2021).

Projenin bir yıl süreyle sürdürülmesi ve aylık örneklemelerle geniş veri setinin oluşturulması sayesinde, 8 ana patojen (*Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp.,*Y. ruckeri, L. garvieae, L. petauri, F. psychrophilum, V. anguillarum ve V. salmoninarum*) için **doğal fenotip (WT) ve doğal olmayan fenotip (NWT)** oranları yüksek istatistiksel güvenilirlikle belirlenmiştir.

Bu çalışmada tetrasiklin ve sülfametoksazol-trimetoprim (SXT) gibi sık kullanılan ajanlara karşı *Aeromonas spp.* izolatlarında sırasıyla %84,21 oranında saptanan NWT (doğal olmayan) fenotipler, özellikle *A. sobria* ve *A. veronii* gibi türlerde direnç gelişiminin daha yaygın olduğunu göstermekte; bu durum, akuakültürde uzun süredir sürdürülen kontrolsüz antibiyotik kullanımının dirençli klonların seçilimini kolaylaştırdığına ilişkin önceki raporlarla da örtüşmektedir (Böhme vd, 2010; Piotrowska ve Popowska, 2015).

Bu çalışmada elde edilen veriler, *Pseudomonas spp.* izolatlarının çoğunlukla florfenikol, enrofloksasin ve oksitetrasiklin gibi antimikrobiyallere karşı yüksek düzeyde duyarlılık gösterdiğini, ancak tetrasiklin ve SXT gibi ajanlara karşı bazı türlerde artan direnç eğilimi bulunduğunu ortaya koymuştur. Disk difüzyon sonuçlarına göre, florfenikol (FFC) ve enrofloksasin (ENR) gibi ajanlarda WT oranlarının %70’in üzerinde seyretmesi, bu antibiyotiklerin *Pseudomonas* izolatları üzerinde halen terapötik etkinliğini koruduğunu göstermektedir.

Ancak özellikle *Pseudomonas fluorescens* ve *P. putida* gibi türlerde, geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı inhibisyon zon çaplarında düşüklükler saptanmış; bu durum, çevresel kökenli bu bakterilerin direnç kazanımında rol oynayan mekanizmaları barındırabileceğini

düşündürmektedir. *Pseudomonas* türlerinde bilinen **eflux pompası aktivitesi, düşük dış membran geçirgenliği ve β-laktamaz üretimi** gibi direnç mekanizmaları göz önüne alındığında, direnç gelişiminin yalnızca antibiyotik baskısıyla değil, tür içi adaptif yanıtlarla da ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir (Fernández & Hancock, 2012; Roca et al., 2015).

Projemizde elde edilen bu bulgular, *Pseudomonas spp.* izolatlarının **doğal antibiyotik direnci repertuarının** geniş olabileceğini ve bu nedenle tedavi planlamasında tür düzeyinde tanı ve duyarlılık testlerinin birlikte değerlendirilmesinin zorunlu olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, akuakültürde patojen etkenlere karşı kullanılan antibiyotikler için CLSI/EUCAST referans sınır değerlerinin bulunmaması, tür bazlı ECOFF çalışmalarının önemini artırmaktadır (Turnidge vd., 2006; EMA, 2021).

Proje kapsamında elde edilen bulgular, *L. petauri* izolatlarında özellikle florfenikol ve enrofloksasin gibi ajanlara karşı duyarlılığın büyük oranda korunduğunu, buna karşın oksitetrasiklin ve eritromisin gibi makrolid/tetrasiklin grubu ajanlara karşı bazı suşlarda artan direnç eğilimleri bulunduğunu ortaya koymuştur. *L. petauri* izolatlarında WT oranı florfenikol için %78, oksitetrasiklin için %56, enrofloksasin için %83 civarındayken; *L. petauri* izolatlarında daha değişken bir direnç paterni gözlenmiştir. (Goodman vd. 2017; Satıcıoğlu vd. 2023).

Laktokok türlerinde antibiyotik direnci çoğunlukla **ribozomal mutasyonlar**, **erm-gen ailesi**, **tet-gen ailesi** ve **eflux pompa sistemleri** ile ilişkilendirilmektedir (Ammor vd., 2007). Bu çalışmada izolatlara ait inhibisyon zon çaplarının bazı antibiyotikler için CLSI/EUCAST'te tanımlı sınır değerlerinin bulunmaması, deneysel ECOFF (Epidemiolojik Cut-off) değerlerinin belirlenmesini gerekli kılmıştır. ECOFF analizleri sonucunda, *L. petauri* için ülkemize özgü cut-off sınırları ilk kez tanımlanmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri sonucunda *F. psychrophilum* izolatlarının özellikle florfenikol ve oksitetrasiklin gibi ajanlara karşı değişken düzeyde duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Ancak SXT ve eritromisin gibi ajanlara karşı bazı suşlarda dirençli fenotiplerin bulunduğu görülmüştür. Bu bulgular, *F. psychrophilum* suşlarında **mobil direnç genlerinin kazanımı** ile ilişkili olabilir. Nitekim *gyrA* mutasyonları ve **efflux pompası** gibi mekanizmaların bu türde direnç gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (Henríquez-Núñez vd. 2012; Madsen vd. 2020).

ECOFF değerlerinin hesaplanmasında en dikkat çeken bulgu, inhibisyon zon çaplarının geniş varyasyon göstermesi nedeniyle **WT/NWT ayrımının net olmadığı** bazı ajanlarda tür düzeyinde sınır değerlerin halen tanımlanmamış olmasıdır. Bu bağlamda proje kapsamında elde edilen veriler, Türkiye su ürünleri sektörü için *F. psychrophilum*'a özgü ECOFF tanımlarının ilk kez oluşturulmasına katkı sunmuştur.

Türkiye'deki gökkuşağı alabalığı üretim işletmelerinde **bulaşıcı soğuk su hastalığı (BCWD)** ile ilişkili klinik bulgular sergileyen balıklardan izole edilmiş, tür düzeyinde tanımlama hem **MALDI-TOF MS** hem de **16S rRNA ve gyrB gen temelli moleküler analizler** ile doğrulanmıştır. İzolatların proteomik profilleri yerel MALDI-TOF kütüphanesine eklenmiş ve

tanımlama başarısı %97 seviyesine ulaşmıştır. Bu durum, yerli spektral verilerin sistem tanı gücünü artırmadaki önemini ortaya koymaktadır (Soguero-Ruiz et al., 2021).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri sonucunda *F. psychrophilum* izolatlarının özellikle florfenikol ve oksitetrasiklin gibi ajanlara karşı değişken düzeyde duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Ancak SXT ve eritromisin gibi ajanlara karşı bazı suşlarda dirençli fenotiplerin bulunduğu görülmüştür. Bu bulgular, *F. psychrophilum* suşlarında **mobil direnç genlerinin kazanımı** ile ilişkili olabilir. Nitekim *gyrA* mutasyonları ve **efflux pompası** gibi mekanizmaların bu türde direnç gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (Henríquez-Núñez et al., 2012; Madsen et al., 2020).

ECOFF değerlerinin hesaplanmasında en dikkat çeken bulgu, inhibisyon zon çaplarının geniş varyasyon göstermesi nedeniyle **WT/NWT ayrımının net olmadığı** bazı ajanlarda tür düzeyinde sınır değerlerin halen tanımlanmamış olmasıdır. Bu bağlamda proje kapsamında elde edilen veriler, Türkiye su ürünleri sektörü için *F. psychrophilum*'a özgü ECOFF tanımlarının ilk kez oluşturulmasına katkı sunmuştur.

Türkiye'de MALDI TOF MS teknolojisi ile ilk kez izole edilen ve moleküler yöntemlerle doğrulanan *V. salmoninarum* izolatları, gökkuşağı alabalıklarında deri ve iç organlarda kanama, ekzoftalmus, vücut boşluğunda asitli sıvı birikimi, damızlıklık balıklarda yumurta çürümesi gibi klinik bulgularla birlikte izole edilmiş ve literatürde bildirilen semptomatolojiyle uyumluluk göstermiştir (Ruiz-Zarzuela vd., 2005;Satıcıoğlu vd. 2021d). MALDI-TOF MS tanımlama sistemine yerel protein profilleri eklendikten sonra identifikasyon güvenilirliği önemli ölçüde artmıştır (≥95%), bu da *V. salmoninarum* gibi nadir türlerin doğru teşhisi için yerli veri kütüphanelerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri sonucunda izolatların büyük çoğunluğunun florfenikol (≥34 mm), enrofloksasin (≥28 mm) ve eritromisin (≥15 mm) gibi ajanlara duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ancak, oksitetrasiklin (OTC) ve trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) gibi ajanlara karşı bazı izolatlarda dirençli fenotipler gözlenmiştir. Bu durum, literatürde *V. salmoninarum*'un sahip olabileceği doğal direnç mekanizmalarıyla paralellik göstermektedir (Sorum, 2005). Örneğin, **ribozomal koruyucu proteinlerin** ve **efflux pompa sistemlerinin** varlığı bu türde antibiyotik direnciyle ilişkilendirilmiştir.

Disk difüzyon testi sonuçlarına göre, *V. anguillarum* izolatlarının çoğunluğu **florfenikol, enrofloksasin ve oksitetrasiklin** gibi ajanlara karşı duyarlılık göstermiştir. Ancak, **sülfametoksazol-trimetoprim (SXT)** ve **eritromisin** gibi ajanlarda bazı izolatlarda dirençli fenotipler gözlenmiştir. Bu durum, akuakültür kaynaklı vibrioların plazmid kaynaklı direnç genlerini taşıma potansiyelini ortaya koymaktadır. Literatürde *sul1*, *dfrA* ve *ermB* gibi genlerin *V. anguillarum* suşlarında aktarılabilir direnç unsurları olarak tespit edildiği bildirilmektedir (Piotrowska ve Popowska, 2015; Kim vd, 2020).

Bu projede su kaynaklı bakteriyel patojenlerin antimikrobiyal duyarlılıklarının değerlendirilmesinde **broth mikrodilüsyon yöntemi** kullanılmış ve elde edilen MIC (Minimum

İnhibitör Konsantrasyon) değerleri, hem CLSI VET03-A4 hem de literatürdeki epidemiyolojik cut-off (ECOFF/ECV) referansları ışığında yorumlanmıştır. Özellikle *Y. ruckeri, L. garvieae, L. petauri, Aeromonas spp.* ve *V. anguillarum* gibi türlerin belirli antibiyotiklere karşı duyarlılık düzeylerinin daha önce ülkemiz koşullarında sistematik olarak analiz edilmemiş olması, bu çalışmanın özgün değerini artırmaktadır.

Mikrodilüsyon sonuçları, bazı antibiyotiklerde WT (Wild-Type) ve NWT (Non-Wild-Type) dağılımlarının net ayrıldığı bimodal dağılımlar oluşturmuştur. Bu durum, Türkiye'ye özgü saha suşlarında doğal ve kazanılmış direnç ayrımının deneysel olarak yapılabilmesine olanak sağlamıştır. Özellikle florfenikol, oksitetrasiklin, enrofloksasin ve eritromisin gibi sık kullanılan antibiyotikler için önerilen deneysel **ECOFF değerleri**, her bir tür için ilk kez bu çalışmayla belirlenmiştir. Bu bağlamda mikrodilüsyon yöntemi, sadece tedaviye yönelik farmakodinamik bilgi sağlamamakta, aynı zamanda direnç gözetimi ve antibiyotik kullanım kılavuzlarının oluşturulması için de güçlü bir temel sunmaktadır (Turnidge et al., 2006; Kronvall, 2010; CLSI, 2020).

Proje çıktıları, mikrodilüsyon testlerinin tür düzeyinde **rezistom analizleri** ile entegre edildiğinde, *in vitro* fenotipik duyarlılık ile genetik direnç mekanizmaları arasında anlamlı korelasyonlar kurulabildiğini de göstermiştir. Bu yöntemle elde edilen MIC50 ve MIC90 değerleri, tedavi kılavuzlarının yerelleştirilmesi ve balık sağlığında rasyonel antimikrobiyal kullanım politikalarının geliştirilmesi açısından stratejik öneme sahiptir.

Proje çalışmasında izole edilen 38 adet *Aeromonas spp.* izolatı üzerinde gerçekleştirilen broth mikrodilüsyon analizleri, bu türlerin ülkemizdeki yetiştiricilik sistemlerinden izole edilen suşları açısından kapsamlı deneysel **ECOFF (Epidemiyolojik Cut-Off)** belirleme çalışması niteliğindedir. Özellikle **florfenikol, enrofloksasin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, eritromisin ve sülfametoksazol-trimetoprim (SXT)** gibi yaygın kullanılan antibiyotiklere karşı elde edilen MIC dağılımları, belirgin şekilde bimodal veya geniş varyasyon gösteren yapılar sergilemiştir.

Analizlerde, florfenikol ve enrofloksasin gibi ajanlara karşı **MIC değerleri düşük** seviyelerde bulunmuş; buna karşın **SXT ve eritromisin** gibi ajanlarda ise çok daha yüksek MIC değerleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, söz konusu antibiyotiklere karşı bazı izolatlarda kazanılmış direnç mekanizmalarının bulunduğunu göstermektedir. Özellikle *A. sobria* ve *A. veronii* suşlarında SXT'ye karşı belirgin yüksek MIC değerleri, literatürde tanımlanan **dfrA, sul1/sul2** ve **intI1** benzeri direnç genlerinin yayılımı ile ilişkilendirilebilir (Piotrowska ve Popowska, 2015; Nawaz et al., 2010).

MIC dağılımları, ECOFFinder yazılımı ile analiz edilerek her bir ajan için önerilen ülke-bazlı ECOFF değerleri oluşturulmuştur. Bu değerler, uluslararası CLSI ve EUCAST belgelerinde yer almayan ya da balık patojenleri için önerilmemiş ajanlar açısından referans niteliğindedir. Özellikle **oksitetrasiklin için önerilen ECOFF değeri (≤4 µg/mL)**, Avrupa'da bildirilen bazı

değerlerle (Duman vd. 2020) uyumlu olmakla birlikte, bazı Türkiye kökenli izolatlarda bu değerin üzerinde kalan NWT popülasyonun varlığı dikkat çekicidir.

Broth mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen veriler, sadece klinik tedaviye yönelik karar desteği sunmakla kalmayıp, aynı zamanda **bölgesel antimikrobiyal direnç eğilimlerinin izlenmesi** ve ulusal balık sağlığı otoritelerine yönelik **rasyonel antibiyotik kullanım rehberleri** hazırlanması açısından da stratejik öneme sahiptir. Ayrıca, bu veriler ISO 20776-1 ve CLSI VET03-A4 standartlarına uygun olarak elde edildiği için **uluslararası karşılaştırılabilirlik** bakımından da değerlidi

Projede elde edilen *Pseudomonas spp.* izolatlarına yönelik **broth mikrodilüsyon testleri**, bu genusun doğal ve kazanılmış direnç profiline dair önemli bilgiler sunmuştur. Özellikle *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas aeruginosa* benzeri türler, hem çevresel rezervuar olmaları hem de düşük besin ortamlarında hayatta kalma kapasiteleri nedeniyle akuakültür ortamında direnç genlerinin yayılımı açısından önem arz etmektedir (Fernández et al., 2012; Akinbowale et al., 2006).

Florfenikol, oksitetrasiklin ve enrofloksasin gibi ajanlara karşı MIC değerleri çoğunlukla geniş dağılım göstermiş, bazı suşlarda düşük MIC değerleri tespit edilirken, bazı izolatlarda MIC50 seviyesinin üzerinde yüksek konsantrasyonlara tolerans geliştiği gözlemlenmiştir. Özellikle enrofloksasin ve tetrasiklin grubuna karşı gösterilen yüksek MIC değerleri, *Pseudomonas spp.*'nin dış membran geçirgenliğini sınırlayan doğuştan gelen direnç mekanizmaları (ör. eflux pompaları, OprD down-regülasyonu) ile açıklanabilir (Poole, 2005; Li et al., 2015).

MIC dağılımlarına dayalı olarak belirlenen deneysel **ECOFF değerleri**, ülkemizde balık patojenlerine özgü ilk referanslar arasında yer almaktadır. Özellikle oksitetrasiklin için 8 µg/mL üzeri MIC değerleri, bazı suşların NWT olarak sınıflandırılmasını sağlamış ve bu durum literatürde tanımlanan *tetA*, *tetE* gibi direnç genlerinin potansiyel varlığını düşündürmüştür (Sapkota vd. 2008). *Pseudomonas* türlerinde florfenikol direncinin sınırlı olmasına rağmen bazı izolatlarda yüksek MIC değerleri, çevresel seçilim baskısı ile kazanılmış direnç olasılığına işaret etmektedir.

Broth mikrodilüsyon yöntemi ile sağlanan bu veriler, sadece terapötik kararlar için değil; aynı zamanda **antibiyotiklerin sınır değerlerinin balık patojenlerine özgü yeniden tanımlanması**, **ECOFF/ECV haritalarının oluşturulması** ve **AMR izleme programlarının bilimsel altyapısının güçlendirilmesi** açısından da yüksek öneme sahiptir.

Projede elde edilen ***L. petauri*** (n=32) izolatları, gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss) yetiştiriciliğinde klinik vakalardan izole edilen suşlardır. Broth mikrodilüsyon yöntemiyle gerçekleştirilen minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) analizleri, bu etkenin antimikrobiyal ajanlara karşı gösterdiği duyarlılık profili ve potansiyel direnç mekanizmaları hakkında önemli bulgular sağlamıştır.

L. petauri için florfenikol ve enrofloksasin gibi ajanlara karşı MIC değerleri çoğunlukla düşük olup, bu ajanların WT popülasyon içinde yer aldığı ve halen etkili tedavi seçenekleri olabileceği gösterilmiştir. Ancak **tetrasiklin, eritromisin ve SXT (sülfametoksazol-trimetoprim)** gibi ajanlarda bazı izolatların yüksek MIC değerleri göstermesi, kazanılmış direnç fenotiplerinin varlığına işaret etmektedir. Bu durum, özellikle ***L. garvieae*** suşlarında önceki yıllarda raporlanan **tet(M)**, **erm(B)**, **mef(A/E)** ve **dfr** genleri ile uyumludur (Eyngor vd. 2004; Hirvelä-Egger vd. 2023; Duman vd. 2020e).

Deneysel MIC dağılımları, **ECOFFinder** yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve her bir ajan için Türkiye kökenli suşlara özgü ilk **ECOFF (epidemiyolojik cut-off)** değerleri önerilmiştir. Bu sınırlar sayesinde, WT ve NWT popülasyonlar ayrıştırılarak **rutin izleme programlarında kullanılabilecek fenotipik değerlendirme eşikleri** oluşturulmuştur.

L. petauri, 2017 yılında taksonomik olarak ayrılmış bir tür olmasına rağmen, bu çalışmada ilk kez ülkemizdeki suşları üzerinde ayrıntılı mikrodilüsyon temelli ECOFF değerlendirmesi yapılmıştır. Satıcıoğlu vd. (2023), Türkiye'de geçmişte *L. garvieae* olarak tanımlanan suşların yaklaşık %77'sinin aslında *L. petauri* olduğunu göstermiştir. Bu durum, doğru tanı teknikleri kadar **duyarlılık testlerinin tür düzeyinde ayrıştırılarak raporlanmasının** da önemini artırmaktadır.

Projedeki analizler CLSI VET04-A2 standartlarına uygun şekilde gerçekleştirilmiş olup, elde edilen MIC/ECOFF verileri, ülkemizde **balık patojenlerine özgü akılcı antibiyotik kullanım stratejilerinin** bilimsel temele dayalı olarak geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Proje kapsamında elde edilen ***F. psychrophilum*** izolatları, gökkuşağı alabalığı işletmelerinde kronik mortalitelere ve büyüme geriliğine yol açan sistemik enfeksiyonların başlıca etkeni olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlara yönelik broth mikrodilüsyon testi ile gerçekleştirilen MIC analizleri, patojenin farklı antibiyotiklere karşı değişken duyarlılık gösterdiğini ortaya koymuştur.

Özellikle **florfenikol**, **oksitetrasiklin** ve **eritromisin** gibi balık sağlığında sık kullanılan ajanlara karşı MIC değerleri, geniş dağılımlar göstermiştir. Bazı izolatların florfenikole duyarlı (MIC ≤1 µg/mL) iken, diğerlerinin 8 µg/mL veya üzeri değerler göstermesi, fenotipik olarak NWT suşların varlığına işaret etmektedir. Benzer şekilde, eritromisin ve tetrasiklin için belirlenen MIC değerlerinin yüksekliği, Türkiye'de çevresel seçilim baskısıyla direnç gelişebileceğini düşündürmektedir.

Avrupa'da *Flavobacterium* spp. için tanımlanmış **resmi ECOFF sınırları** sınırlı sayıda olduğundan, bu çalışmada **Türkiye kökenli saha izolatlarından elde edilen deneysel ECOFF değerleri** literatüre katkı sağlayacak düzeydedir. Bu bağlamda, **Evenhuis vd. (2017)** ve **Satıcıoğlu vd. (2019)** gibi çalışmalarda kullanılan MIC eşikleri karşılaştırmalı olarak ele alınmış ve önerilen sınırlar, mevcut dağılımlar üzerinden ECOFFinder yazılımı ile istatistiksel olarak belirlenmiştir. Ayrıca, *F. psychrophilum*'un zor üreyen, besin seçici ve zayıf büyüyen bir

tür olması nedeniyle, broth mikrodilüsyon testlerinin CLSI VET04-A2 protokollerine göre uyarlanması gerekmiştir. Bu bağlamda özel üretim ortamları ve inkübasyon sürelerinin optimize edilmesi, deneylerin tekrarlanabilirliğini artırmıştır.

V. salmoninarum, özellikle son yıllarda **gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss)** üretiminde artan önemdeki Gram-pozitif patojenlerden biri olarak öne çıkmaktadır. Proje kapsamında izole edilen V. salmoninarum suşlarına yönelik broth mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilen antimikrobiyal duyarlılık testleri, bu patojenin duyarlılık spektrumu ve potansiyel direnç eğilimlerine dair önemli bilgiler sağlamıştır.

Test edilen ajanlar arasında **florfenikol, eritromisin, tetrasiklin ve enrofloksasin**, V. salmoninarum'a karşı en sık kullanılan antibiyotikler olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada florfenikol ve enrofloksasin'e karşı düşük MIC değerleri (≤1–2 µg/mL) saptanırken; özellikle **eritromisin** ve **sülfametoksazol-trimetoprim (SXT)** için MIC değerlerinin geniş dağılım göstermesi, bazı saha izolatlarında kazanılmış direnç fenotiplerinin geliştiğine işaret etmektedir.

Elde edilen MIC dağılımları **ECOFFinder yazılımı** kullanılarak analiz edilmiş, literatürde henüz resmi bir ECOFF değeri tanımlanmamış olan bu tür için, ilk kez Türkiye kökenli saha izolatlarına özgü **deneysel ECOFF eşikleri** önerilmiştir. Bu değerler, balık patojenleri için **epidemiyolojik direnç izleme sistemlerinin** oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

V. salmoninarum, *Streptococcus* ve *Lactococcus spp*. ile filogenetik benzerlikler taşımasına rağmen, antimikrobiyal duyarlılık açısından belirgin farklılıklar göstermektedir. Özellikle **makrolid grubu antibiyotiklere** karşı bazı suşlarda yüksek MIC değerleri, makrolid direnç genlerinin (örneğin *erm(B)* veya *mef(A)*) kazanılmış olabileceğini düşündürmektedir (Romalde vd. 2009; Vendrell vd. 2006). Bununla birlikte, tür düzeyinde henüz tam olarak tanımlanmamış direnç mekanizmaları nedeniyle moleküler çalışmalarla desteklenmiş fenotipik testler gereklidir.

Sonuç olarak, bu proje kapsamında ilk kez ülkemizde *V. salmoninarum* suşlarının **broth mikrodilüsyon temelli MIC dağılımı** ortaya konmuş ve bu patojene karşı geliştirilecek aşılama ve antimikrobiyal yönetim stratejilerine temel teşkil edecek epidemiyolojik referans veriler oluşturulmuştur.

Proje kapsamında elde edilen ***V. anguillarum*** izolatları, Türkiye'deki deniz kafes sistemlerinde büyütülen gökkuşağı alabalığı üretiminde son yıllarda artış gösteren vibriyoz enfeksiyonlarının etkenidir. Özellikle deniz suyu sıcaklıklarının yükseldiği yaz aylarında mortalite oranlarının artması, bu patojenin çevresel koşullarla ilişkili olarak epidemik hale gelebileceğini göstermektedir.

Broth mikrodilüsyon yöntemiyle gerçekleştirilen antimikrobiyal duyarlılık analizlerinde, *V. anguillarum* suşlarının **florfenikol** ve **enrofloksasin** gibi ajanlara karşı genel olarak düşük MIC değerleri sergilediği, ancak **oksitetrasiklin**, **eritromisin** ve **trimetoprim-sülfametoksazol**

(SXT) gibi antibiyotiklerde bazı izolatlarda yüksek MIC değerleri ile NWT (doğal olmayan) fenotiplerin belirlendiği saptanmıştır. Bu durum, özellikle akuatik ortamında antibiyotiklere maruz kalmış bakteri topluluklarında **seçilim baskısı** ile dirençli alt popülasyonların geliştiğini düşündürmektedir (Smith vd. 2023).

Bu çalışmada elde edilen MIC dağılımları, **ECOFFinder yazılımı** ile analiz edilerek Türkiye'ye özgü *V. anguillarum* saha izolatları için deneysel **ECOFF** değerleri tanımlanmıştır. Bu değerler, hem su ürünleri üretiminde akılcı antimikrobiyal kullanım stratejileri geliştirmek hem de ulusal düzeyde **epidemiyolojik direnç izleme programları** oluşturmak için kritik öneme sahiptir.

Ayrıca *V. anguillarum*'un sahip olduğu yüksek genetik çeşitlilik ve mobil genetik elemanlar yoluyla direnç genlerini kazanma potansiyeli (örneğin **qnr, tet, floR** genleri), literatürde de vurgulanmaktadır (Kronvall vd 2019; Santos vd, 2021). Bu bağlamda, proje kapsamında izole edilen *V. anguillarum* suşlarının hem fenotipik hem de moleküler düzeyde değerlendirilmesi, ülkemizde ilk kez sistematik bir referans veri setinin oluşturulmasına olanak sağlamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma *V. anguillarum*'a karşı kullanılan antimikrobiyal ajanların saha etkinliğini değerlendirmenin yanı sıra, **direnç gelişiminin erken tespiti** ve **önleyici biyogüvenlik stratejilerinin** geliştirilmesi açısından önemli katkılar sunmaktadır.

Proje kapsamında elde edilen *Y. ruckeri* izolatlarının protein yapısal analizleri, hem **fenotipik karakterizasyon** hem de **aşı suşu seçimi** açısından kritik öneme sahiptir. Bu amaçla yapılan **SDS-PAGE** analizleri ile saha izolatlarının toplam hücre lizatı protein profilleri elde edilmiş, akabinde seçilen referans ve saha antiserumları kullanılarak gerçekleştirilen **Western blot** analizleriyle antijenik bantların özgüllüğü belirlenmiştir.

SDS-PAGE analizlerinde, izolatlar arasında 25–100 kDa arasında farklı moleküler ağırlıklara sahip protein bantları gözlemlenmiştir. Özellikle ~35 kDa ve ~50 kDa aralığındaki protein bantlarının hem saha hem referans suşlarında ortak olarak tespit edilmesi, bu proteinlerin koruyucu aşı geliştirme çalışmalarında hedef antijen olabileceğini düşündürmektedir (Bastardo vd. , 2011; Menanteau-Ledouble vd, 2018).

Western blot analizlerinde, **serotip O1'e özgü antiserumlar** ile blotlanan bantlar içerisinde özellikle 37–50 kDa aralığında belirgin bağlanmalar gözlenmiştir. Bu bantlar, hem **referans suşlar (ATCC 29473, *Y. ruckeri* O1 BT1)** hem de farklı illerden izole edilmiş saha suşlarında korunmuş şekilde izlenmiş, bu da bu antijenik bölgelerin yüksek **immünojenite potansiyeli** taşıdığını göstermiştir. Bu bulgular, daha önce bildirilen **yadA, yrp1, yrp2 ve ompF** gibi dış membran proteinlerine karşı bağışıklık yanıtı ile de örtüşmektedir (Evenhuisve Labella, 2017).

Ayrıca, Western blot sonuçları doğrultusunda benzer bant profiline sahip olan saha suşları, genom sekans ve in vivo virulens sonuçlarıyla birleştirilerek **aşı çalışma suşu (working seed)** olarak seçilmiştir. Antijenik benzerlik gösteren ancak düşük virulens potansiyeline sahip suşlar ise **hiperimmün serum üretiminde** kullanılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında elde edilen SDS-PAGE ve Western blot analizleri, *Y. ruckeri* suşlarının protein bazlı immunolojik profillerini ortaya koymuş; aşı geliştirme sürecinde **suş seçiminde** ve **antijenik tutarlılık** kontrolünde etkili bir yöntem olarak kullanılmıştır. Aynı zamanda, Türkiye izolâtlarına özgü bu veri seti, literatürde sınırlı yer bulan bölgesel antijen profillerine de katkı sağlamaktadır.

Bu projede Türkiye'deki gökkuşağı alabalığı işletmelerinden elde edilen *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatları çok yönlü olarak karakterize edilmiştir. Güncel literatür (Altun et al., 2025) ile uyumlu biçimde, geçmişte *L. garvieae* olarak tanımlanan suşların büyük bir kısmının aslında *L. petauri* olduğu doğrulanmıştır. Nitekim Saticioglu ve ark. (2023), kayıtlı 177 izolattan 137'sinin (%77) *L. petauri* olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, özellikle aşı geliştirme ve tanı testleri açısından tür düzeyinde doğru teşhisin önemini vurgulamaktadır.

Fenotipik olarak, bu iki türün sukroz fermentasyonu ve tür-spesifik PCR ile ayrımı başarıyla gerçekleştirilmiş, ancak SDS-PAGE protein profilleri türler arasında ayırt edici bir farklılık sunmamıştır (Altun et al., 2025). Bu da klasik fenotipik yöntemlerin yetersizliğini bir kez daha göstermektedir. Öte yandan Western blot analizleri, *L. garvieae* ve *L. petauri* arasında belirgin immunoprotein farklarını ortaya koymuş; özellikle *L. petauri* izolatlarının 25–60 kDa aralığında kendine özgü antijenik bantlar sergilediği görülmüştür.

Bu projede yürütülen Western blot analizleri, *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatlarının antijenik protein profilleri açısından ilk kez kapsamlı bir şekilde karşılaştırılmasına olanak tanımıştır. Türkiye'den izole edilen suşların bu bağlamda hem homolog hem de heterolog antiserumlarla reaksiyonları incelenmiş; bu analizler ile **tür düzeyinde ayrım** ve **potansiyel aşı antijenlerinin** belirlenmesi hedeflenmiştir.

Altun et al. (2025) çalışmasında; *L. garvieae* izolatları, referans suş olan ATCC 43921T antiserumu ile muamele edildiğinde 25–75 kDa arasında çeşitli bantlar göstermiştir. Özellikle 25–37 kDa ve 37–50 kDa aralıklarında çok sayıda bağlanma gözlenmiş, 50–75 kDa aralığında ise 2 ana bant tespit edilmiştir. Bu bant dağılımı, literatürde *L. garvieae*'ye özgü tanımlanmış 40–45 kDa'lık immünodominant proteinlerle tutarlılık göstermektedir (Yesiltas et al., 2019).

Aynı izolatlar, *L. petauri* LMG 30040T antiserumu ile blotlandığında, daha dar bir protein spektrumu göstermiştir. Örneğin, *L. garvieae* izolatlarında 25–37 kDa aralığındaki bazı bantların bu reaksiyonda kaybolduğu, yalnızca 37–50 ve 50–75 kDa aralıklarında bağlanma gözlendiği rapor edilmiştir. Bu farklılık, antijenik profillerin tür düzeyinde ayrım sağlayabileceğini ve çapraz reaktivite düzeylerinin sınırlı olduğunu göstermektedir.

Diğer yandan, saha izolatı kaynaklı mikrokapsüllü *L. garvieae* (ÖS-37) ve non-kapsüllü *L. petauri* (S-39) antisera ile yapılan blotlamalarda, özellikle saha suşları arasında daha geniş ve tutarlı protein bağlanmaları gözlenmiştir. ÖS-37 antiserumu ile *L. garvieae* izolatları 50 kDa'da yoğun bir bant vermiş, bu da saha kaynaklı suşların immunodominant epitoplara sahip olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca *L. petauri* izolatları ile blotlama yapıldığında, 25–50 kDa

aralığında belirgin bantlar oluşmuş, bazı izolatların 60 kDa'ya kadar uzanan bantlar verdiği gözlenmiştir.

Bu veriler, *L. petauri* türüne ait protein profilinin daha homojen ancak farklı serotiplere sahip olabileceğini, *L. garvieae* izolatlarının ise saha ve referans suşlar arasında önemli antijenik varyasyonlar taşıyabileceğini ortaya koymaktadır. Bu durum Shin et al. (2007) tarafından da desteklenmekte; kapsüllü ve kapsülsüz suşlara karşı hazırlanan antisera ile yapılan blotlamalarda, yalnızca kapsüllü suşlardan elde edilen antisera'nın çapraz reaksiyon verdiği, kapsülsüz antisera'nın ise kapsüllü izolatları tanımadığı rapor edilmiştir.

Altun ve ark. (2025) tarafından elde edilen bulgular bu anlamda önemlidir; çünkü Türkiye'de mikrokapsüllü olduğu gösterilen saha suşlarının hem *L. garvieae* hem de *L. petauri* ile çapraz reaksiyon vermesi, bu izolatların **çift koruyucu aşı adayı** olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle ÖS-37 saha suşuna karşı geliştirilen antiserumun, tüm saha suşlarıyla birlikte referans *L. petauri* tip suşu ile de reaksiyon vermesi, bu yönde önemli bir kanıttır.

Sonuç olarak, Western blot analizleri; türler arası ayrım, saha suşlarının antijenik kapasitesinin tanımlanması ve potansiyel çapraz koruyucu aşı adaylarının belirlenmesi açısından kritik bir araç olarak öne çıkmaktadır. Projede elde edilen bulgular, hem proteomik tabanlı aşı geliştirme çalışmalarına yön verecek hem de mevcut tanı protokollerinin revizyonuna katkı sağlayacakt

Bu projede, Türkiye'den izole edilen *V. anguillarum* saha suşlarının protein temelli antijenik karakterizasyonu, SDS-PAGE ve Western blot analizleri ile gerçekleştirilmiş ve aşılama açısından potansiyel immünojenik protein yapılarına ilişkin önemli bulgular elde edilmiştir. Literatürde daha çok serotiplendirme ve fenotipik tiplendirme ön planda olmasına rağmen, yerli saha suşlarının proteomik özelliklerine dair bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu çalışma ile hem referans serotip antiserumlarıyla hem de saha izolatlarından elde edilen antisera ile yürütülen Western blot analizleri sayesinde *V. anguillarum*'un antijenik profiline dair ilk yerli karşılaştırmalı veriler sunulmuştur.

SDS-PAGE analizi sonucunda, *V. anguillarum* saha suşlarının tam hücre lizatı protein profillerinde 17 ila 110 kDa arasında değişen çok sayıda bant gözlenmiştir. Bu bantlar içerisinde özellikle 37–45 kDa ve 60–70 kDa aralığında yoğun ve tutarlı bant oluşumları dikkat çekmiştir. Bu proteinler, literatürde immünojenik potansiyel taşıyan dış membran proteinleri (OMP'ler), hemolizin ve flagellinler ile ilişkilendirilmektedir (Egidius et al., 1986; Hikima et al., 2002). Tüm saha suşlarında yüksek düzeyde korunmuş olan 38 kDa ve 65 kDa bantları, olası koruyucu antijen adayları olarak değerlendirilmiştir.

Western blot analizinde, SDS-PAGE'de tanımlanan proteinlerin antiserumlarla bağlanabilirliği değerlendirilmiştir. *V. anguillarum* serotip O1 referans antiserumu (ör. NCIMB 2130 ve 2131) kullanılarak yapılan blotlamalarda saha suşlarının önemli bir kısmının özellikle 38–42 kDa ve 60–70 kDa aralığında güçlü bağlanma gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, bu moleküler

ağırlıktaki proteinlerin hem yaygın hem de bağışıklık sistemi tarafından tanınan antijenik yapılar olduğunu göstermektedir.

Ayrıca saha suşlarından geliştirilen hiperimmun antiserumlarla yapılan blotlamalarda, hem homolog hem heterolog suşlara karşı 28–32 kDa ve 45–50 kDa arasında özgün protein bantları tespit edilmiştir. Bu proteinlerin OMPK, flagellin A veya hemolizin proteinleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Baliga vd.., 2018; Mikkelsen vd..2011). İmmünoblottaki bu farklı reaktivite desenleri, saha suşları arasında serolojik çeşitliliğin yanı sıra immünojenik farklılıklar olduğunu da ortaya koymaktadır.

SDS-PAGE ve Western blot analizlerinden elde edilen bulgular, *V. anguillarum* suşlarının protein temelli serolojik çeşitliliğini ve immün baskın proteinlerini ortaya koymakla birlikte, bu proteinlerin çapraz koruma sağlayacak potansiyel aşı antijenleri olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir. Özellikle serotip O1'e özgü antijenik proteinlere sahip saha suşlarının yerli aşı formülasyonuna dahil edilmesi, hem homolog hem de heterolog koruma açısından stratejik önemdedir.

Ayrıca Western blot sonuçları, bazı saha suşlarının NCIMB 2130/2131 antiserumu ile zayıf veya sınırlı reaktivite göstermesi nedeniyle, ticari aşıların saha koşullarında yeterli koruma sağlayamayabileceğine işaret etmektedir. Bu durum, saha suşları ile hazırlanan antijenlerin yerli balık türleri için daha etkili aşılar geliştirilmesinde kullanılabileceğini desteklemektedir.

Bu projede, Türkiye'deki gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss) işletmelerinden izole edilen ***Y. ruckeri*** suşlarının serolojik olarak karakterize edilmesi amacıyla **mikroaglütinasyon** ve **slayt aglütinasyon** testleri yürütülmüştür. Serolojik tiplendirme ve antijenik ilişkilendirme, özellikle aşı geliştirme çalışmalarında suş seçiminin doğruluğunu belirleyen kritik parametrelerdendir.

Referans Serotip Antiserumları ile Reaktivite

Çalışmada, **serotip O1**'e karşı hazırlanmış referans antiserumlar (örneğin, **NCIMB 2286** – BT1, **NCIMB 2289** – BT2) kullanılarak saha suşları ile çapraz reaktivite test edilmiştir. Saha izolatlarının büyük çoğunluğu, **O1 serotipi ile pozitif aglütinasyon** göstermiştir. Bu bulgu, Türkiye'deki *Y. ruckeri* izolatlarının epidemiyolojik olarak serotip O1 dominansı gösterdiğini ortaya koymaktadır ve literatürde yer alan ***Y. ruckeri*** **BT1 ve BT2 biyotiplerinin** farklı konaklar veya çevre koşulları altında değişen serolojik reaktivitesini desteklemektedir (Davies, 1991; Romalde et al., 1993).

Serotip O2 (örneğin, **ATCC 29473**) ve diğer non-O1 antiserumlarla ise düşük düzeyde veya hiç reaktivite tespit edilmemiştir. Bu durum, saha izolatlarının çoğunlukla **O1 serotipi ve alt biyotipleri** (özellikle BT1) ile uyumlu antijenik yapı taşıdığını ve mevcut aşıların hedef serotipini desteklediğini göstermektedir.

Saha İzolatlarından Geliştirilen Antiserumlarla Reaktivite

Saha suşlarına karşı geliştirilmiş hiperimmun tavşan antisera ile yapılan mikroaglütinasyon testlerinde, homolog suşlara yüksek titrede reaksiyon elde edilirken, heterolog saha suşları ile sınırlı çapraz reaksiyon gözlenmiştir. Bu durum, saha suşlarının antijenik olarak heterojen yapılar barındırabileceğini ve referans suşlar üzerinden geliştirilen aşıların saha koşullarında yeterli koruma sağlamayabileceğini düşündürmektedir.

Özellikle **Y2022-239 (Ch1)**, **Y2022-266 (Ch3)** gibi suşlara karşı geliştirilen antiserumların yalnızca aynı biyotip içerisindeki diğer suşlarla güçlü aglütinasyon göstermesi, bu suşların **sero-biolojik olarak homojen ancak dış gruplarla antijenik olarak ayrışan** yapılara sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu gözlemler, **autojenik aşı geliştirme** yönündeki gerekliliği destekler niteliktedir.

Serotiplere Göre Koruma ve Aşı Geliştirme Açısından Değerlendirme

Serolojik veriler, Türkiye'deki *Y. ruckeri* izolatlarının **serotip O1-BT1 ve O1-BT2** varyantlarında yoğunlaştığını göstermektedir. Ancak bu varyantlar arasında aglütinasyon testlerinde gözlenen reaktivite farkları, bağışıklık yanıtı açısından tek serotip bazlı aşıların **suboptimal bağışıklık oluşturabileceğini** düşündürmektedir. Bu nedenle, aşılama stratejilerinde hem BT1 hem de BT2 varyantlarına karşı çapraz koruma sağlayabilecek formülasyonlar geliştirilmelidir.

Altun ve ark. (2025) tarafından prototip kombine emülsiyon aşı aday suşları, bu farklı biyotiplere karşı oluşturulmuş antisera ile değerlendirilmiş ve biyotipler arasında yüksek oranda çapraz reaktivite görüldüğü rapor edilmiştir. Bu durum, saha izolatlarından elde edilen antijenik materyallerin aşı tasarımında **referans suşlara göre daha etkili bir koruyucu profil** sunabileceğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye'deki alabalık işletmelerinden izole edilen ***L. garvieae*** ve ***L. petauri*** suşlarının antijenik özellikleri, hem referans hem de saha kaynaklı hiperimmün tavşan antiserumlarıyla yapılan **slayt ve mikroaglutinsayon testleri** ile değerlendirilmiştir. Bu serolojik analizler, türler arası ayrım, çapraz reaktivite profili ve aşı adayı suşların seçiminde kritik rol oynamaktadır. Slayt aglütinasyon testlerinde, ***L. garvieae*** **ATCC 43921T** antiserumu (LG-1) yalnızca homolog suşla reaksiyon gösterirken, ***L. petauri*** **LMG 30040T** antiserumu (LP-1), tüm *L. petauri* saha suşlarıyla pozitif aglütinasyon oluşturmuş; *L. garvieae* suşlarıyla ise reaksiyon göstermemiştir. Bu durum, klasik tip suşlardan elde edilen antiserumların **yüksek özgüllüğe** sahip olduğunu ve tür düzeyinde ayrımı mümkün kıldığını göstermektedir.

Buna karşın, ***L. garvieae*** **ÖS-37** saha suşundan elde edilen antiserum hem *L. garvieae* saha suşlarıyla hem de *L. petauri* izolatlarıyla çapraz reaksiyon vermiştir. Özellikle kapsülsüz referans suş (ATCC 43921T) bu antiserumla aglütinasyon göstermemiştir. Bu sonuçlar, saha kaynaklı antijenlerin daha geniş serolojik kapsama sahip olabileceğini ortaya koymaktadır.

L. petauri **S-39** saha suşundan elde edilen antiserum, hem kapsüllü hem de kapsülsüz *L. petauri* izolatlarıyla aglütinasyon göstermiş; aynı zamanda kapsülsüz *L. garvieae L18* suşu ile

de pozitif reaksiyon vermiştir. Bu durum, antijenik yapının kapsül varlığına bağlı olarak farklılık gösterebileceğini ve kapsüllü suşlardan elde edilen antisera'nın daha geniş çapraz reaktivite gösterebileceğini düşündürmektedir (Shin vd. 2007; Miyauchi vd., 2012).

Bu bağlamda, kapsülün hücre duvarındaki antijenlerin serolojik erişilebilirliğini etkilediği; kapsüllü suşlardan elde edilen antisera'nın **kapsülsüz suşlara çapraz bağlanabileceği**, ancak bunun tersi durumda bağlanmanın gerçekleşmediği bildirilmektedir. Bu proje sonuçları da bu görüşü desteklemektedir.

Serolojik veriler, ***L. garvieae*** **ÖS-37** saha suşunun hem *L. garvieae* hem de *L. petauri* saha suşlarıyla yüksek düzeyde aglütinasyon oluşturduğunu, ancak referans *L. garvieae* suşu ile reaksiyon vermediğini ortaya koymuştur. Bu durum, referans suşların saha izolatlarını temsil etme kapasitesinin sınırlı olabileceğini ve aşı suşu seçiminde **yerel saha izolatlarının** kullanılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Özellikle bu çalışmada ilk defa mikrokapsül yapısı tespit edilen saha suşlarının çapraz reaktivite göstermesi, bu izolatların **bivalan (dual-protective) aşı suşu adayı** olarak değerlendirilmesini desteklemektedir. Aşıda kullanılacak antijenin hem tür içi hem türler arası kapsayıcılığını sağlamak için, antijenik profili geniş olan saha suşları öncelikli olarak dikkate alınmalıdır.

Bu çalışmada, Türkiye'deki gökkuşağı alabalığı işletmelerinden izole edilen *V. anguillarum* suşlarının serolojik karakterizasyonu, hem referans antiserumlarla hem de saha suşlarına karşı geliştirilmiş hiperimmün antiserumlarla gerçekleştirilmiştir. Serolojik testler, özellikle potansiyel aşı suşu seçimi ve tür-içi varyantların tanımlanması açısından temel rol oynamaktadır. Öte yandan, O2 serotipine özgü antiserumlarla yapılan reaksiyonlarda zayıf veya hiç aglütinasyon gözlenmemiştir. Bu durum, test edilen saha izolatlarının serotipik olarak O2 ile uyumsuz olduğunu ve **serotip O2'ye karşı geliştirilen aşıların Türkiye koşullarında düşük etkinlik gösterebileceğini** düşündürmektedir.

Projede seçilen saha suşlarına (örn. V12, V15, V18, V21) karşı geliştirilen hiperimmün tavşan antiserumları ile yapılan mikroagglütinasyon ve Western blot analizlerinde, bu antisera hem homolog suşlarla hem de serotip O1 referans suşlarıyla yüksek düzeyde reaktivite göstermiştir. Özellikle V15 ve V18 gibi suşların hem referans O1 suşlarına hem de diğer saha suşlarına karşı çapraz reaksiyon göstermesi, bu suşların **yaygın paylaşılan antijenik determinantlara** sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu veriler, söz konusu saha izolatlarının yalnızca kendi homolog tipine değil, aynı zamanda geniş spektrumda heterolog suşlara karşı da immünojenik yanıt oluşturabileceğini ve bu nedenle **kombine aşı suşu adayı olarak değerlendirilebileceğini** göstermektedir.

Serolojik analizlerden elde edilen bulgular, mevcut *V. anguillarum* populasyonunun yüksek oranda O1 serotipine ait olduğunu ortaya koymakla birlikte, farklı saha suşları arasında antijenik varyasyonlar bulunduğunu da göstermektedir. Bu durum, sadece tek referans suşuna

dayalı geliştirilen aşıların saha koşullarında sınırlı koruma sağlayabileceğine işaret etmektedir. Özellikle **V21 gibi yüksek çapraz reaktivite gösteren saha suşları**, hem homolog hem heterolog koruma sağlayabilecek **ideal aşı antijen adayları** olarak öne çıkmaktadır.

Bu projede Türkiye'nin farklı alabalık işletmelerinden izole edilen *Y. ruckeri* saha suşları, tüm genom dizileme (WGS) ile analiz edilmiş ve virülensle ilişkili genetik faktörleri ortaya koymak üzere kapsamlı bir genomik karakterizasyon gerçekleştirilmiştir. Genomik inceleme, hem tür içi varyasyonun hem de biyotiplendirme ve aşılama açısından kritik olabilecek virülens genlerinin dağılımını değerlendirmeye olanak sağlamıştır.

WGS analizlerinde saha suşlarının genom büyüklükleri 3.7–3.9 Mb arasında; GC içerikleri %47.3–48.1 olarak hesaplanmış ve referans *Y. ruckeri* ATCC 29473 ile yüksek oranda örtüşmüştür. Filogenetik analizde izolatlar, literatürde tanımlanmış biyotiplere uygun şekilde **biyotip 1 (BT1)** ve **biyotip 2 (BT2)** olarak kümelenmiştir. Bu ayrım, flhC, fliP ve motB gibi flagellerle ilişkili gen bölgelerinde tespit edilen anlamlı varyasyonlara dayandırılmıştır.

Altun et al. (2025) makalesinde, hem BT1 hem BT2 suşlarının genomik yapıları incelenerek, kapsayıcı aşı geliştirme perspektifi ortaya konmuştur. Projeye özgü olarak geliştirilen prototip aşılarda, genomik olarak **yüksek virülens ve antijenik kapsama potansiyeli taşıyan** saha suşları (özellikle Y75, Y2022–266) temel alınmıştır.

Bu bağlamda:

- **BT2 suşları**, flagella kaybı nedeniyle düşük hareketliliğe sahip olsa da, daha invazif davranış ve farklı antijenik yapı gösterebilir.
- BT1 suşları ise klasik mobiliteye ve yüksek ekspresyonlu salgı sistemlerine sahiptir.
- Aşı adaylarının, **her iki biyotipin temsilcisi olacak şekilde seçilmesi**, kapsamlı koruma sağlanması açısından önerilmektedir.

Bu projede, Türkiye'deki gökkuşağı alabalığı işletmelerinden izole edilen ***L. garvieae*** ve ***L. petauri*** saha suşları, hem tür düzeyinde ayrımı netleştirmek hem de aşı geliştirme sürecini yönlendirecek virülens ve yüzey antijen genlerini belirlemek amacıyla tüm genom dizileme (WGS) ile karakterize edilmiştir. Son yıllarda taksonomik olarak ayrımlaşan ve birçok fenotipik özelliği paylaşan bu iki türün, konak-patojen etkileşimindeki farkları ancak genomik düzeyde ortaya konabilmektedir (Goodman et al., 2017; Miyauchi et al., 2012).

WGS analizlerinde: *L. garvieae* ve *L. petauri* izolatlarının her ikisinin de ortalama genom büyüklüğünün: **2.01–2.15 Mb,** GC oranının: **%38.6–39.2** olduğu görülmüştür.

Filogenetik analizlerde *groEL*, *pheS*, *16S rRNA* ve *recA* gen bölgeleriyle yapılan hizalamalarda, saha izolatlarının %58'inin ***L. petauri*** olarak yeniden sınıflandırıldığı görülmüştür. Bu bulgu, Satıcıoğlu et al. (2023)'ün Türkiye'den bildirdiği, eski *L. garvieae* kayıtlarının yaklaşık %60'ının aslında *L. petauri* olduğunu ortaya koyan çalışmayla örtüşmektedir.

Bu çalışmada, Türkiye'den izole edilen 23 *V. anguillarum* suşunun tüm genom düzeyinde analiz edilerek tür doğrulama, virülans faktörü belirleme ve antimikrobiyal direnç (AMR) profili ortaya konmuştur. Oxford Nanopore PromethION 2 Solo platformuyla elde edilen uzun okuma dizileri Flye algoritması ile birleştirilmiş, dijital DNA-DNA hibridizasyon (dDDH) yöntemi ile tüm izolatların *V. anguillarum* türüne ait olduğu yüksek benzerlik oranlarıyla (%≥85) doğrulanmıştır. Bu bulgular, klasik yöntemlerle yapılan tür teşhislerinin genomik düzeyde de desteklendiğini göstermekte ve tür içi sınıflandırma açısından literatürde daha önce bildirilen verilerle (Hansen vd, 2020; Castillo vd.., 2017) uyum göstermektedir.

Virülans faktörlerinin belirlenmesinde, *V. anguillarum* strain 775 (Naka et al., 2011; Castillo et al., 2017) ve RV22 (Balado et al., 2018) suşlarına ait toplam 250 virülans ilişkili gen referans olarak alınmıştır. Bu genlerin varlığı, izolatlara ait tüm genom dizileriyle BLASTn algoritması kullanılarak karşılaştırılmış; homolog genlerin varlığı ≥%80 kimlik (identity) ve ≥%60 kapsama (coverage) eşikleri temel alınarak değerlendirilmiştir. Bu referans temelli karşılaştırmalı genomik yaklaşım, izolatlardaki virülans repertuarını yüksek çözünürlükle tespit etme imkânı sunmuştur.

Elde edilen bulgular, *V. anguillarum* suşlarının önemli bir kısmında demir alımı ve taşınımına ilişkin genlerin (örneğin *vabA–E*, *tonB*, *exbB/D*, *feoABC*, *fbpABC*) eksiksiz bulunduğunu ve bu sistemlerin konak içinde demir sınırlı ortamlarda bakterinin enfektif potansiyelini artırdığını göstermiştir. Benzer şekilde, flagellar hareketlilik, Tip IV ve Msh tipi pilus yapıları ile quorum sensing sistemlerine ait genlerin de tüm suşlarda büyük ölçüde korunduğu görülmüştür. Bu sistemlerin korunmuş olması, konak hücrelere tutunma, kolonizasyon ve enfeksiyon başlatma sürecinde suşların ortak bir strateji izlediğini göstermektedir. Nitekim Castillo ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında da, farklı coğrafyalardan izole edilen *V. anguillarum* suşlarında benzer korunan virülans gen çekirdeği tanımlanmıştır.

Bununla birlikte, bazı virülans faktörlerinde belirgin suşlar arası farklılık gözlemlenmiştir. RTX toksin ailesi (*rtxC*, *hlyD*, *peptidaz C39*) ile Tip VI sekresyon sistemlerine (örneğin *vtsA–H*, *vstC–K*, *ClpV1*) ait bazı genler bazı izolatlarda bulunmamaktadır. Bu durum, suşlar arasında patojenite düzeyi ve konağa saldırı kapasitesinde farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir. Hansen et al. (2020) tarafından 44 suş üzerinde yapılan genom karşılaştırmalarında da benzer şekilde, sekresyon sistemleri ve toksin genlerinde suşlar arası değişkenlik rapor edilmiştir. Sekresyon sistemlerinin heterojen dağılımı, çevresel baskıların veya konak türü farklılıklarının evrimsel adaptasyonlara neden olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın önemli bir katkısı, Türkiye kökenli *V. anguillarum* suşlarının genomik düzeyde ilk kez bu denli detaylı olarak analiz edilmiş olmasıdır. Hem virülans hem de direnç açısından tanımlanan ortak ve değişken genler, suşlar arasında patogenez stratejilerinin farklılık gösterebileceğini ve mevcut aşı/tedavi protokollerinin her durumda etkin olmayabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle erişilebilir demir sistemlerinin, adezyon ve quorum sensing

yollarının tüm izolatlarda korunmuş olması, moleküler tanı kitleri ve geniş spektrumlu aşı hedefleri için umut vaat etmektedir. Öte yandan, Tip VI sekresyon sistemi, salgılanmış toksinler ve mobil genetik elemanlara bağlı direnç faktörlerinin bazı suşlarda bulunmaması, hedefe yönelik tedavi ve izolat bazlı kontrol stratejilerinin geliştirilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, bu çalışma *V. anguillarum* suşlarının yüksek düzeyde korunan bir virülans çekirdek genomu yanında, belirgin ölçüde değişken aksesuar genetik bileşenlere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen veriler, hem su ürünleri hastalık yönetimi hem de ileri düzey epidemiyolojik takip sistemleri için genomik temelli uygulamaların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, BT1 biyotipine ait suşların BT2'ye kıyasla daha düşük virülens sergilediğini göstermiştir ($p < 0.05$). Bu bulgular, Austin et al. (2003) ve Tobback et al. (2007) gibi çalışmalarda bildirilen biyotip temelli patojenite farklarıyla tutarlıdır. Özellikle BT1 grubuna ait Y2022–239 suşunun diğer BT1 izolatlarına göre daha düşük ölüm oranı (%33) oluşturması, bu suşun antijenik yapısında ve serolojik reaktivitesinde tespit edilen farklılıklarla paralellik göstermektedir. Bu durum, suş düzeyindeki antijenik varyasyonun hastalık şiddeti üzerinde etkili olabileceğini göstermekte ve aşı tasarımı açısından önem arz etmektedir (Altun vd. 2025).

Sonuç olarak, *Y. ruckeri*'ye bağlı enfeksiyonların kontrol altına alınabilmesi için biyotipler arası genel patojenite farklarının yanı sıra, antijenik çeşitliliğin de dikkate alınması gereklidir. Bu yaklaşım, geliştirilecek inaktif aşıların sahada karşılaşılan farklı suşlara karşı etkinliğini artırmak ve koruyuculuk süresini uzatmak açısından stratejik bir gerekliliktir.

Bu çalışmada elde edilen veriler, *L. garvieae* suşlarının gökkuşağı alabalıklarında farklı düzeylerde patojenite gösterebildiğini ortaya koymuştur. LG67 suşu %70,37 ve L18 suşu %66,66 oranında mortalite oluştururken, L89 suşu herhangi bir ölüm vakasına yol açmamıştır. Bu durum, *L. garvieae* suşlarının patojenik potansiyelinde suş düzeyinde belirgin farklılıklar bulunduğunu göstermektedir.

Benzer şekilde, **Vendrell vd. (2006)** ve **Ortega vd. (2020)** tarafından yapılan çalışmalarda da *L. garvieae* suşları arasında hem antijenik hem de virülens düzeyinde varyasyonlar bildirilmektedir. Özellikle LG67 gibi yüksek mortaliteye neden olan suşlar, sistemik enfeksiyon belirtileri (egzoftalmus, hiperpigmentasyon, abdominal sıvı birikimi) ile karakterizedir ve bu durum klinik gözlemlerimizle de örtüşmektedir.

Çalışmamızda kullanılan LG67 suşunun, daha önce geliştirilen aşı formülasyonundaki ana tohum suşlarından genetik ve serolojik (KG -, KG +) olarak farklılık göstermesi, aşının heterolog koruma kapasitesinin değerlendirilmesi açısından önemli bir avantaj sağlamıştır. Bu suşun oluşturduğu yüksek mortalite oranı, onu deneysel modelde "eprüvasyon suşu" olarak seçme gerekçesini güçlendirmektedir.

Virülens düzeyindeki farklılıklar, yalnızca genetik farklılıklarla değil, aynı zamanda antijenik profildeki çeşitlilikle de açıklanabilir. **Soltani vd. (2007)** ve **Evans vd. (2009)** tarafından bildirilen çalışmalar, *L. garvieae* izolatlarının serotipleri arasında çapraz korumanın sınırlı olduğunu ve bu durumun özellikle saha koşullarında aşı başarısını etkileyebileceğini göstermiştir. Çalışmamızda yer alan L89 suşunun mortalite oluşturmaması, potansiyel olarak zayıf virülens fenotipi veya konak adaptasyon eksikliğiyle ilişkili olabilir.

Ayrıca deney süresince mortalite gözlenen balıklardan yapılan yeniden izolasyonlarda *L. garvieae* tekrar izole edilmiş ve Koch postülatları doğrulanmıştır. Bu bulgu, deneysel enfeksiyon modelimizin geçerliliğini ve sonuçların güvenilirliğini desteklemektedir.

Sonuç olarak, *L. garvieae* izolatları arasında belirlenen virülens düzeylerindeki farklılıklar, suş bazlı antijenik çeşitliliğin ve patojenite mekanizmalarının detaylı incelenmesinin, etkili bir aşılama stratejisi geliştirme sürecinde ne kadar kritik olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, aşı geliştirme çalışmalarında yalnızca tür düzeyinde değil, suş düzeyinde de ayrıntılı karakterizasyon yapılması gereklidir.

Bu çalışmada gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde gerçekleştirilen *in vivo* enfeksiyon deneyleri sonucunda, *L. petauri* suşlarının virülens potansiyellerinde suş düzeyinde belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. L2022-296 suşu %62,96 ve L152 suşu %40,74 oranında mortalite oluştururken, L1 suşu enfekte edilen balıklarda ölüm oluşturmayarak düşük patojenite göstermiştir.

Elde edilen bulgular, *L. petauri* suşlarının genetik ve antijenik çeşitlilik gösterdiğini ve bu çeşitliliğin klinik enfeksiyon şiddeti üzerinde etkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu durum, Satıcıoğlu et al. (2023) tarafından Türkiye'de gerçekleştirilen kapsamlı bir çalışmada da desteklenmektedir. Söz konusu çalışmada, geçmişte *L. garvieae* olarak tanımlanan 177 izolattan yalnızca 40'ının gerçekten *L. garvieae* olduğu, geri kalanının ise fenotipik ve genetik olarak *L. petauri* ile uyumlu olduğu bildirilmiştir. Bu veri, sahada *L. petauri* enfeksiyonlarının yaygın ve sıklıkla yanlış tanımlanabildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda mortaliteye neden olan *L. petauri* izolatlarının enfekte balıklarda tipik sistemik enfeksiyon belirtileri oluşturduğu (splenomegali, karaciğer hiperemisi, abdominal asit birikimi) gözlemlenmiştir. Bu semptomlar, *L. garvieae* enfeksiyonlarında bildirilen klasik klinik bulgularla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (Evans vd. 2009; Ortega vd. 2020, Abraham vd. 2023). Bu durum, her iki türün konak-patojen etkileşiminde benzer virülens mekanizmalarına sahip olabileceğine işaret etmektedir.

L2022–296 suşu, yüksek mortalite oranı ve karakteristik klinik belirtilerle öne çıkmış, ayrıca antijenik profili açısından önceki aşı tohumlarından farklılık göstermesi nedeniyle aşı eprüvasyon suşu olarak değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım, farklı saha izolatlarına karşı geliştirilen aşının heterolog koruyuculuk kapasitesinin ölçülebilmesi açısından önem taşımaktadır. Benzer şekilde, Algöet vd (2009), aşı çalışmalarında yalnızca antijenik benzerlik

değil, aynı zamanda sahada prevalansı yüksek ve klinik olarak anlamlı mortalite oluşturan izolatların da eprüvasyon suşu olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamıştır.

Koch postülatlarının sağlanması amacıyla mortalite gözlenen balıklardan yapılan yeniden izolasyonlarda, aynı patojenlerin tekrar elde edilmesi çalışmanın içsel geçerliliğini desteklemiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma, *L. petauri* suşlarının virülens potansiyelleri açısından suş düzeyinde önemli farklılıklar sergilediğini ortaya koymuş ve bu farklılıkların gerek klinik tanı gerekse aşı geliştirme süreçlerinde dikkate alınması gerektiğini göstermiştir. Özellikle antijenik varyasyon ve saha uyumluluğu, etkili bir aşılama stratejisinin başarıya ulaşmasında belirleyici unsurlar olarak öne çıkmaktadır.

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarında yaygın bakteriyel patojenlerden biri olan *V. anguillarum*'a ait saha izolatlarının patojenitesi, intraperitoneal (IP) enjeksiyon yoluyla oluşturulan enfeksiyon modelinde değerlendirildi. Virülens testlerinde **V18** suşu, deney gruplarında **yüksek mortalite oranı** (%>70) oluşturmasıyla öne çıkmış; bu durum, suşun fenotipik virülens faktör analizlerinde (hemoliz, lipaz, DNAse vb.) gösterdiği pozitif reaksiyonlarla uyumlu bulunmuştur. Western blot analizlerinde de bu suşun baskın ve özgün antijenik bantlar sergilemesi, in vivo mortaliteyle paralel bir antijenik yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

Buna karşın, **V15** suşu genom analizlerinde çok sayıda virülens geni taşımasına ve yüksek riskli genetik profile sahip olmasına rağmen, in vivo enfeksiyon modelinde **orta düzeyde mortalite** (%30) oluşturmuştur. Bu durum, sadece virülens genlerinin varlığının değil, bu genlerin ekspresyon düzeylerinin, konak savunma mekanizmalarının ve çevresel faktörlerin de enfeksiyon şiddeti üzerinde belirleyici olduğunu göstermektedir (Frans vd. 2011; Santos vd. 2019).

Nitekim genomik düzeyde yüksek virülens belirteçleri taşıyan suşların in vivo patojenitesinin sınırlı kalabileceği, daha önce Austin ve Austin (2016) tarafından da vurgulanmıştır. V15'in subakut enfeksiyonlara veya taşıyıcılık senaryolarına daha uygun bir model suş olabileceği, buna karşılık V18'in, akut enfeksiyon modelleri ve aşı eprüvasyon denemelerinde **yüksek mortalite** yaratması nedeniyle öncelikli bir çalışma tohumu adayı olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen veriler, suşlar arası virülens farklılıklarının sadece genotipik düzeyde değil, aynı zamanda **fenotipik patogenez** ve **antijenik özellikler** açısından da önemli derecede değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bağlamda, V18 suşu yüksek patojenite kapasitesiyle aşının **koruyuculuk performansının en zorlu senaryolarda değerlendirilmesine** olanak sağlarken; V15 suşu ise genetik açıdan riskli ancak daha az ölümcül formlara karşı geliştirilecek **heterolog bağışıklık** stratejilerinin test edilmesine katkı sağlayacaktır.

Bu projede geliştirilen *Y. ruckeri* biyotip 1 (BT1) ve biyotip 2 (BT2) suşlarına karşı formüle edilen inaktif emülsiyon esaslı monovalan banyo aşıları, kısa süreli temas yöntemiyle gökkuşağı alabalıklarına uygulanmış ve elde edilen in vivo eprüvasyon verileri bağlamında değerlendirildiğinde, yüksek düzeyde koruyuculuk sağladıkları görülmüştür. BT1 suşuna karşı hesaplanan relatif yüzde sağkalım (RPS) %88 ± 1, BT2 suşuna karşı ise %85 ± 1,97 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler, yalnızca etkinliğin yüksekliğini değil, aynı zamanda iki farklı biyotipte de bağışıklık sisteminin güçlü bir şekilde uyarıldığını göstermektedir. Kaplan-Meier sağkalım analizi sonuçları, her iki aşı grubunda da kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sağkalım farkı olduğunu ortaya koymuştur ($p < 0,001$).

Avrupa Farmakopesi'ne (Ph. Eur., 2022) göre *Y. ruckeri* Serovar 1 BT1 için kısa süreli banyo uygulamalarında başarı kriteri %75, Serovar 2 BT2 için ise %60 RPS olarak belirlenmiştir. Bu çerçevede değerlendirildiğinde, geliştirilen her iki monovalan banyo aşısı da uluslararası başarı eşiğini aşmakta ve Tobback et al. (2007) ile Ellis (2001) gibi öncül çalışmalarla kıyaslandığında daha yüksek etkinlik düzeylerine ulaşmaktadır.

Banyo aşılarının bağışıklık oluşturma mekanizmaları mukozal yüzeylere antijen sunumu yoluyla gerçekleşmektedir. Mukozal dokular, balık bağışıklık sisteminde ilk savunma hattı olarak görev yapar ve özellikle mukozal IgT ve IgM aracılığıyla lokal bağışıklık yanıtlarını tetikler (Ellis, 2001; Salinas, 2015). Bu çalışmada kullanılan yağ bazlı emülsiyon adjuvanı, antijenin mukozada daha uzun süre kalmasına olanak sağlayarak hem antijen sunumunun süresini uzatmış hem de lokal bağışıklık yanıtının kalıcılığını artırmıştır. Bu durum, elde edilen yüksek RPS değerleriyle doğrudan ilişkilendirilebilir.

Uygulama yönünden değerlendirildiğinde, kısa süreli banyo aşılarının önemli avantajlar sunduğu gözlemlenmiştir. Özellikle, aynı tankta çok sayıda balığın eşzamanlı aşılanmasına olanak tanıyan bu yöntem, saha koşullarında hem zamandan hem de iş gücünden tasarruf sağlamaktadır. Ayrıca, balıklarda enjeksiyonla karşılaştırıldığında daha az stres yaratması, immün yanıtın baskılanmadan gelişmesini desteklemektedir

Bu projede geliştirilen *V. anguillarum* inaktif emülsiyon banyo aşısı, kısa süreli banyo yöntemiyle aşılanan gökkuşağı alabalıklarında gerçekleştirilen kontrollü eprüvasyon deneyleri ile değerlendirilmiştir. Aşılı gruplarda elde edilen relatif yüzde sağkalım (RPS) değeri %81 ± 2,7 olarak hesaplanmış; Kaplan-Meier sağkalım analizine göre, aşılı ve kontrol grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). Elde edilen bu koruma düzeyi, Avrupa Farmakopesi ve güncel literatürde (Ellis, 2001; Salinas, 2015) banyo aşıları için kabul edilen %60 RPS eşiğini açıkça aşmakta olup, aşının bağışıklık oluşturma kapasitesinin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

Aşının başarısında, *V. anguillarum* suşlarının seçimine yönelik uygulanan sistematik yaklaşım belirleyici olmuştur. Banyo aşılarında kullanılan saha suşları, fenotipik virülens profillerine (örneğin hemoliz, proteaz, jelatinaz, DNAse ve lipaz aktiviteleri) ve genomik virülens

belirteçlerine göre önceden karakterize edilmiştir. Bu şekilde seçilmiş yüksek virülens özellikli suşlardan hazırlanan inaktif aşı, mukozal immün sistemin hedeflenmesinde üstün performans göstermiştir. Salinas (2015) tarafından vurgulandığı üzere, kısa süreli banyo aşılamaları mukozal yüzeyde IgT ve IgM başta olmak üzere lokal immünoglobulinlerin üretimini tetikleyerek hızlı ve etkili bir koruma oluşturabilmektedir.

Ayrıca, kullanılan saha suşlarının antijenik çeşitliliği ve virülens karakteristikleri göz önünde bulundurularak seçilmiş olması, geliştirilen aşının yalnızca homolog değil, potansiyel olarak heterolog *V. anguillarum* suşlarına karşı da etkili bir bağışıklık yanıtı oluşturabileceğini göstermektedir. Bu durum, Tobback et al. (2007) tarafından bildirilen serotip-virülens uyuşmazlıklarının neden olduğu sınırlı koruyuculuk probleminin önüne geçilmesi açısından stratejik bir yaklaşımdır.

Geliştirilen banyo aşısı, özellikle Türkiye'de denizel koşullarda kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında sıklıkla görülen vibriozise karşı etkili bir biyogüvenlik aracı olarak değerlendirilebilir. Aşının kısa süreli ve düşük stresli uygulama avantajı, özellikle kuluçkahane sonrası büyütme aşamasında veya nakil öncesi kritik dönemlerde geniş popülasyonların hızla aşılanmasına imkân tanımaktadır. Bu yönüyle, sahada pratik uygulama kolaylığı sunmakta ve antibiyotik kullanımının azaltılması suretiyle direnç gelişiminin önlenmesine katkı sağlayabilecek sürdürülebilir bir çözüm sunmaktadır.

Sonuç olarak, bu proje kapsamında geliştirilen *V. anguillarum* inaktif emülsiyon banyo aşısı, hem immünojenik etkinlik hem de saha uyumluluğu açısından yüksek potansiyel göstermiştir. Bu başarı, seçilen suşların virülens profilinin doğru tanımlanması, adjuvan formülasyonunun etkinliği ve uygulama zamanlamasının optimum düzeyde yapılandırılması ile ilişkilendirilebilir.

Proje kapsamında geliştirilen *L. garvieae* ve *L. petauri* inaktif emülsiyon enjeksiyon aşılarının, gökkuşağı alabalıklarında gerçekleştirilen heterolog eprüvasyon denemeleri sonucunda yüksek düzeyde koruyuculuk sağladığı belirlenmiştir. Deneysel enfeksiyon modelinde, *L. garvieae* aşısı için hesaplanan relatif yüzde sağkalım (RPS) değeri %86,6 ± 1,30; *L. petauri* aşısı için ise %82 ± 2,31 olarak tespit edilmiştir. Kaplan-Meier sağkalım analizlerine göre, her iki patojen için de aşılı ve kontrol grupları arasında elde edilen fark istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Bu değerler, enjeksiyonla uygulanan inaktif aşılarda etkinlik için literatürde kabul edilen %75 başarı kriterinin (Ellis, 2001) belirgin biçimde üzerindedir.

Özellikle *L. petauri*, *L. garvieae*'den fenotipik, genotipik ve serotipik ayrışmalarıyla tanımlanmış yeni bir tür olup (Goodman et al., 2017), bu proje kapsamında yerli saha izolatlarından geliştirilmiş ve aşı formülasyonuna dahil edilmiştir. Böylece bu çalışma, *L. petauri*'ye karşı geliştirilen **ilk yerli ve özgün enjeksiyon aşı uygulamaları** arasında yer almakta, hem akademik hem de sektör düzeyinde inovatif katkı sunmaktadır.

Aşının etkinliği, yalnızca uygulama şekliyle değil, aynı zamanda aşı suşlarının çok katmanlı ve bilimsel temelli seçim stratejisiyle doğrudan ilişkilidir. Bu kapsamda:

- **Fenotipik Virülens Özellikleri (FVÖ):** Yüksek hemoliz, proteaz, jelatinaz, DNAse aktivitesi ve kapsül formasyonu,
- **Antijenik Protein Profilleri:** SDS-PAGE ve Western blot analizlerinde tanımlanan güçlü immünojenik bantlar,
- **Serolojik Reaktivite:** Lam test ve mikroaglütinasyon ile belirlenen yüksek antijen-antikor etkileşimi,
- **Genomik Değerlendirme:** Genom büyüklüğü, virülens gen dizileri ve varyant analizleri

gibi kriterler, çalışma tohumu (eprüvasyon suşu) seçimini yönlendirmiştir.

Aşıda kullanılan *L. garvieae* L67 ve *L. petauri* L2022–296 suşları; yüksek in vivo mortalite oranları (%70,37 ve %62,96), sahada gözlenen karakteristik klinik bulgular (egzoftalmus, hiperpigmentasyon, abdominal distansiyon/asites) ve antijenik çeşitliliği temsil etme kapasiteleriyle ön plana çıkmıştır. Bu özellikler, aşı etkinliğinin hem homolog hem de heterolog koruma sağlamasına katkı sunmuştur.

Tobback et al. (2007) ve Vendrell et al. (2007) gibi çalışmalarda bildirilen enjeksiyon aşılarının etkinlik düzeyleriyle paralellik gösteren bu bulgular, formülasyonda kullanılan **yağ bazlı adjuvanların** da katkısını desteklemektedir. Nitekim, Salinas (2015), inaktif yağ emülsiyon aşılarının antijenlerin lenfoid dokularda daha uzun süre kalmasını sağlayarak uzun süreli ve güçlü bir hücresel ve humoral bağışıklık tepkisi oluşturduğunu vurgulamıştır.

Sonuç olarak, geliştirilen *L. garvieae* ve *L. petauri* inaktif enjeksiyon aşıları, yalnızca deneysel etkinlik verileriyle değil, aynı zamanda bilimsel temellere dayalı antijen ve suş seçimi, adjuvan teknolojisi ve uygulama yöntemiyle, laktokokkozise karşı güçlü bir koruma potansiyeli göstermektedir. Bu aşılar, başta gökkuşağı alabalığı olmak üzere, su ürünleri yetiştiriciliğinde karşılaşılan laktokokal enfeksiyonlara karşı sürdürülebilir ve yerli biyogüvenlik çözümleri sunmaktadır.

Beşli kombine inaktif enjeksiyon aşı, Türkiye'de endemik olarak gözlenen bakteri türlerine karşı etkili bir koruma sağlamakta; bu da **ticari üretime uygun, geniş spektrumlu yerli bir biyolojik ürün** geliştirme hedefinin başarıyla karşılandığını ortaya koymaktadır. Bu bağlamda ürünün, **akuakültür işletmelerinde antibiyotik kullanımını azaltacak, sürdürülebilir üretimi destekleyecek** bir çözüm olma potansiyeli yüksektir (Tobback vd. 2007**;** Vendrell vd., 2007; Salinas, 2015).

Geliştirilen YLV5 ICIEV (Beşli Inaktif Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı), gökkuşağı alabalıklarında sık gözlenen ***L. garvieae***, ***L. petauri***, ***Y. ruckeri*** **serotip O1 BT1**, **O1 BT2** ve ***V. anguillarum*** **O1** etkenlerine karşı **tek doz** uygulamayla **heterolog ve homolog koruma sağlayan** bir prototip aşı olarak formüle edilmiştir. Aşının beşli antijenik yapısı, monovalan

otovaksin formülasyonlarına göre daha geniş çaplı bir koruma hedeflemekte ve bu yönüyle mevcut literatürdeki stratejilerle önemli bir farklılık göstermektedir.

L. garvieae ve *L. petauri* için mikrokapsüllü ve kapsülsüz suşların birlikte kullanılması, hem virulens farklılıklarını kapsayarak heterojen koruma sağlamış hem de literatürde ilk defa *L. petauri'* yönelik bir aşı hazırlanmış olması laktokokkozise karşı korumada etkili bir çözüm olma potansiyeli göstermektedir.

Y. ruckeri BT1 ve BT2 biyotipleri arasındaki serolojik ve antijenik varyasyonlar dikkate alınarak her iki biyotipin eş zamanlı kullanılması, BT2'nin monovalan aşılarla yetersiz kontrolünü destekleyen önceki çalışmalarla (Chettri vd. 2013; Riborg vd. 2022) örtüşmektedir. Bu nedenle aşının, biyotip temelli varyasyonları dikkate alarak tasarlanmış olması, saha başarısını artıran önemli bir avantaj sunmuştur.

V. anguillarum O1 suşunun aşılama kapsamına alınması ise özellikle **havuz ve kafes sistemlerinde artan Vibrio enfeksiyonları** ve Türk Somonu üretiminde gözlenen mortalite sorunlarıyla mücadele açısından stratejik bir yaklaşımı temsil etmektedir. Aşıda kullanılan V-21 suşunun **yüksek virulens ve antijenik uygunluk** taşıması, aşının etkinliğini artırmıştır.

Genel olarak, YLV5 ICIEV aşısı mevcut ithal ve otovaksin bazlı yaklaşımlara kıyasla;

- Hem ***L. petauri*** gibi yeni tanımlanmış türleri kapsamı içine alması,
- Hem de **BT1-BT2 biyotip farklarını göz önüne alarak *Y. ruckeri* enfeksiyonlarına daha geniş perspektiften yaklaşması**,
- Ve **yüksek virulens *V. anguillarum* O1 izolatını içermesi** yönüyle **Türkiye'de geliştirilen ilk kapsamlı, beşli antijenli, inaktif balık aşısı** niteliğindedir.

Bu özellikleriyle, **YLV5 ICIEV**, Avrupa Farmakope Monografları ve GMP üretim standartlarına uygun olarak ruhsatlandırılabilir potansiyele sahip olup, hem **iç piyasada lisanslama** hem de **yakın coğrafyadaki üretici ülkelerde ticarileştirme** potansiyeli taşımaktadır. Etkinlik testlerinin tamamlanmış olması, lisansör adayları açısından preklinik aşamayı tamamlayan önemli bir avantajdır.

Bu proje kapsamında geliştirilen YLV5 ICIEV (Beşli Inaktif Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşısı), gökkuşağı alabalığında sıklıkla görülen beş farklı bakteriyel patojene—*Y. ruckeri* (Serotip O1, BT1 ve BT2), *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* (O1)—karşı homolog ve heterolog koruma sağlayan, tek doz uygulamayla etkinlik gösteren çok antijenli bir prototip biyolojik ürün olarak formüle edilmiştir.

Eprüvasyon çalışmaları sonucunda elde edilen RPS (Relatif Yüzde Sağkalım) değerleri, aşının her bir hedef etken için Avrupa Farmakopesi ve ilgili literatürde tanımlanmış başarı eşiklerinin (%75 ve üzeri) üzerinde olduğunu açıkça ortaya koymuştur. Aşılanmış balıklarda gözlenen RPS değerleri sırasıyla;

- *Y. ruckeri* BT1: %99,6 ± 0,4
- *Y. ruckeri* BT2: %91,2 ± 1,1

- *L. garvieae*: %93,4 ± 1,7
- *L. petauri*: %89,1 ± 1,5
- *V. anguillarum*: %87,8 ± 1,9

olarak hesaplanmıştır. Kaplan-Meier sağkalım analizleri, tüm patojen gruplarında aşılı ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı koruyuculuk sağlandığını göstermiştir ($p < 0,001$). Bu sonuçlar, aşının yalnızca homolog koruma değil, aynı zamanda heterolog suşlara karşı da etkili bir bağışıklık oluşturabildiğini ortaya koymaktadır.

Antijenik Tasarım ve Biyotip Farklılıkları:

YLV5 ICIEV formülasyonu, sahada yaygın olarak izole edilen, yüksek virülens düzeyi sergileyen yerli suşlara dayanarak oluşturulmuştur. *Y. ruckeri*'nin BT1 ve BT2 biyotipleri arasındaki serolojik ve antijenik farklar (Riborg et al., 2022; Chettri et al., 2013) dikkate alınarak her iki biyotip eşzamanlı olarak aşı formülasyonuna dahil edilmiştir. BT2 suşlarının monovalan aşılarla yeterince kontrol edilemediği literatürle desteklenirken (Tobback et al., 2007), bu proje BT1-BT2 varyasyonlarına karşı genişletilmiş bir koruma sağlayarak önemli bir avantaj sunmuştur.

Laktokokkozise Yönelik Yaklaşımın Özgünlüğü:

Laktokokkozise karşı geliştirilen bileşenlerde, *L. garvieae* ve *L. petauri* suşlarının hem mikrokapsüllü hem de kapsülsüz antijen formlarının birlikte kullanılmasıyla, hem virülens düzeyleri hem de immünojenik varyasyonlar dikkate alınarak heterojen koruma sağlanmıştır. *L. petauri*, yakın zamanda tür düzeyinde ayrıştırılmış bir patojen olarak literatürde ilk kez bu projede yerli saha suşlarından geliştirilmiş bir aşı bileşeni olarak formülasyona dahil edilmiştir (Vendrell, 2006). Bu durum, projeye özgün bilimsel ve yenilikçi bir değer kazandırmaktadır.

***V. anguillarum* Bileşeni ve Stratejik Önemi:**

V. anguillarum O1 suşunun aşı kapsamına alınması, özellikle denizel sistemlerde ve Türk Somonu üretiminde artan vibriosis vakalarına karşı önemli bir koruyucu yaklaşımı temsil etmektedir. Seçilen V-21 suşu, genomik analizlerde yüksek virülens profili sergilemiş ve antijenik açıdan saha izolatlarıyla yüksek uyum göstermiştir. Bu durum, aşının geniş spektrumlu etkinliğini desteklemektedir.

Adjuvan Etkisi ve Bağışıklık Yanıtı:

Aşıda kullanılan yağ bazlı emülsiyon adjuvan, literatürde bildirildiği gibi lenfoid dokularda uzun süreli antijen sunumunu teşvik ederek hem humoral hem de hücresel bağışıklık yanıtını güçlendirmiştir (Salinas, 2015; Vendrell et al., 2007). Bu durum, aşının tek dozla yüksek RPS değerlerine ulaşmasını sağlayan temel unsurlardan biri olarak değerlendirilmektedir.

Ruhsatlandırma ve Ticarileştirme Potansiyeli:

YLV5 ICIEV, Avrupa Farmakopesi monografları ve GMP uyumlu üretim ilkelerine uygun olarak geliştirilmiş olup, ruhsatlandırma sürecine temel oluşturacak preklinik etkinlik verilerine sahiptir. Bu aşının;

- *L. petauri* gibi yeni tanımlanmış türleri kapsaması,
- *Y. ruckeri* BT1-BT2 biyotiplerine karşı genişletilmiş koruma sunması,
- *V. anguillarum*'un tehditlerine karşı etkili olması

özellikleriyle Türkiye'de geliştirilen ilk **lisanslanabilir çok antijenli balık aşısı** olma niteliğini taşımaktadır. Bu ürünün, yerli üretici firmalar tarafından ticarileştirilmesi durumunda hem ithalat bağımlılığını azaltacağı hem de antibiyotik kullanımını minimize ederek sürdürülebilir akuakültür hedeflerine katkı sunacağı öngörülmektedir.

Saha Etkinlik Deneme Sonuçları

Bu proje kapsamında geliştirilen **yerli inaktif beşli kombine enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV)**'nin saha koşullarındaki etkinliği, iki farklı gökkuşağı alabalığı üretim işletmesinde yapılan uygulamalı denemelerle değerlendirilmiştir. A İşletmesi İç Anadolu Bölgesi'nde, B İşletmesi ise Marmara Bölgesi'nde yer almakta olup, balık ağırlığı, çevresel koşullar ve işletme ölçeği bakımından farklılıklar göstermektedir. Bu durum, geliştirilen aşı prototipinin **farklı coğrafi ve işletme koşullarında** gösterdiği etki düzeyinin karşılaştırmalı olarak analiz edilmesini mümkün kılmıştır.

Her iki işletmede de yerli kombine aşının yüksek düzeyde koruyuculuk sağladığı görülmüştür. A işletmesinde ithal aşı ile karşılaştırıldığında **benzer hatta daha yüksek bir koruyuculuk** oranı elde edilmiş, B işletmesinde ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında **çok daha yüksek bir sağ kalım oranı ve %89,93 RPS** değeri ortaya konmuştur. Bu durum, aşı prototipinin hem **yüksek performans gösterdiğini** hem de **farklı balık ağırlıklarında ve farklı işletme koşullarında etkinliğini koruduğunu** göstermektedir.

Kombine aşıların etkinliğine dair çok sayıda çalışma, bu sonuçları destekler niteliktedir. Özellikle **Brudeseth vd. (2013)**, **genç balıklarda** kombine yağ emülsiyonlu aşıların etkili bağışıklık yanıtı oluşturabildiğini, bu aşılarda mortalitenin anlamlı oranda azaldığını belirtmiştir. Benzer şekilde, **Gudding vd. (2014)**, polivalan (çoklu antijenli) aşıların sahada yaygın enfeksiyon baskısı altında daha avantajlı olduğunu; çünkü **birden fazla patojene karşı bağışıklık sağlayarak** antibiyotik kullanımını azaltabileceğini bildirmiştir. Proje kapsamında geliştirilen YLV5 ICIEV aşısı, ***Y. ruckeri* O1 BT1, *Y. ruckeri* O1 BT2, *L. garvieae*, *L. petauri*, *V. anguillarum* O1** hedeflerine karşı geliştirilmiş olup bu yaklaşımı doğrudan yansıtmaktadır.

Ayrıca, **Salonius vd. (2005)** ve **Midtlyng (2005)** gibi çalışmalarda da enjeksiyon yoluyla uygulanan inaktif aşıların, özellikle yağ bazlı adjuvanlarla birlikte kullanıldığında **uzun süreli ve güçlü bir antijen sunumu** sağlayarak balık bağışıklık sisteminde yüksek düzeyde uyarılma

oluşturduğu vurgulanmıştır. A ve B işletmelerinde elde edilen yüksek sağ kalım oranları bu immünolojik temelle uyumludur.

OIE'nin balık aşıları için tanımladığı **RPS eşik değeri %60** olup, bu sınırın üzerindeki değerler aşıların sahada kullanılabilirliğini desteklemektedir (OIE, 2003. A ve B işletmesinde elde edilen **%89,93 RPS oranları**, bu sınırın oldukça üzerindedir.

Y. ruckeri O1 BT1 ve BT2 Kombine Aşı Gen Ekspresyonları

TLR-2 (Toll-like receptor 2), Gram-negatif bakterilerin lipoprotein ve peptidoglikan bileşenlerini tanıyarak doğuştan bağışıklık sisteminin ilk savunma hattını aktive eder. Bu çalışmada, *Y. ruckeri* kombine banyo aşısı sonrası özellikle geç dönemde (48. saat – 14. gün) solungaç, ön böbrek ve dalakta TLR-2 ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular, antijenik stimülasyona karşı doğuştan bağışıklık yanıtının dokuya özel ve zamana bağlı olarak geliştiğini göstermektedir.

Benzer şekilde, Salinas vd. (2022), mukozal aşılamayı takiben TLR-2 yanıtının solungaç ve barsaklarda 7–14 gün içerisinde anlamlı derecede yükseldiğini, bu artışın mukozal epitelde patojen tanıma ve antimikrobiyal peptid üretimiyle ilişkili olduğunu bildirmiştir.

Özellikle ön böbrekteki ekspresyon artışı, doğuştan bağışıklık hücreleri (monosit, makrofaj) üzerinden sistemik savunmanın geç aktivasyonu ile ilişkilidir. Raida vd. (2011), balıklarda TLR-2 yanıtının, inaktif bakteriyel aşılamalardan sonra ilk 2–4 gün içerisinde artış eğilimine girdiğini ve 14. güne doğru maksimuma ulaştığını bildirmiştir. Bu durum, çalışmamızdaki ön böbrek ve dalak verileriyle paralellik göstermektedir.

Ayrıca Salinas vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, *Y. ruckeri* suşlarına karşı TLR-2 ve IL-1β yanıtlarının korelasyon gösterdiği ve inflamatuar sürecin aktivasyonunda rol aldığı gösterilmiştir.

Y. ruckeri kombine banyo aşı uygulaması, geç fazda TLR-2 gen ekspresyonunu belirgin şekilde artırarak hem mukozal hem de sistemik doğuştan bağışıklık tepkisini uyarıcı rol oynamaktadır. TLR-2'nin geç dönemde artan ekspresyonu, adaptif immün yanıtın şekillenmesinde önemli bir basamak teşkil etmektedir.

IgT, mukozal yüzeylerde patojenlere karşı özgün antikor yanıtı oluşturan immünoglobulin sınıfıdır. Bu çalışmada gözlenen geç dönem IgT aktivasyonu, aşının antijenik bileşenlerine karşı mukozal ve sistemik düzeyde özgün B hücre yanıtının olgunlaştığını göstermektedir. Bu durum, Zhang vd. (2011) tarafından tanımlandığı gibi, balıklarda IgT'nin özellikle bağırsak, solungaç gibi mukozal dokularda dominant antikor rolünü üstlendiğini desteklemektedir Ayrıca, Attaya vd (2020), inaktif *Y. ruckeri* aşısı sonrası IgT gen ekspresyonunun geç dönemde yükseldiğini ve bunun lokal mukozal koruyuculuğa katkı sağladığını bildirmiştir (Xu vd. 2013; Attaya vd. 2020). Mevcut çalışmada da özellikle bağırsak ve solungaçta geç fazda artış gözlenmesi, bu sonuçları desteklemektedir.

Sonuç olarak*, Y. ruckeri* bivalan (BT1 ve BT2) banyo aşısı, geç fazda IgT aracılığıyla mukozal bağışıklığı aktif hale getirmekte ve lokal immün koruma sağlamaktadır. Bu durum, balıklarda IgT'nin adaptif mukozal bağışıklıkta kritik rolünü bir kez daha ortaya koymaktadır.

IgM, teleost balıklarda enfeksiyona karşı ilk gelişen sistemik antikor yanıtı olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada gözlenen erken dönem IgM ekspresyon artışı, doğuştan bağışıklık sisteminin aşılama sonrası hızlı aktivasyonunu yansıtmaktadır.

IgM, teleost balıklarda enfeksiyona karşı ilk gelişen sistemik antikor yanıtıdır. Bu çalışmada gözlenen erken dönem IgM ekspresyon artışı, doğuştan bağışıklık sisteminin aşılama sonrası hızlı aktivasyonunu yansıtmaktadır. Nitekim, Chettri vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada da, banyo yoluyla uygulanan inaktif *Y. ruckeri* aşılarının gökkuşağı alabalıklarında 3–5 gün içinde ön böbrekte IgM ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir. Bu, koruyucu bağışıklığın başlangıcını işaret eden önemli bir göstergedir.

Benzer şekilde, Raida ve Buchmann (2008), immünizasyon sonrası ön böbrek ve dalağın erken IgM transkripsiyonuna katıldığını, bu tepkinin sistemik bir savunma mekanizması olarak hızla devreye girdiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada bağırsakta 7. gündeki geç IgM artışı, muhtemelen lokal antijen sunumu sonrası gelişen sınırlı mukozal humoral yanıtla ilişkilidir. Mukozal yanıtın bu gecikmeli ve geçici profili, Xu vd. (2013) tarafından bildirilen geç faz IgM aktivasyonu ile de örtüşmektedir.

Y. ruckeri kombine banyo aşısı, özellikle erken fazda IgM aracılı sistemik bağışıklık tepkisini aktive etmektedir. Ancak geç fazda baskılanma eğilimi, bu antikor sınıfının kısa süreli koruyucu rol üstlendiğini düşündürmektedir. Mukozal yanıtın sınırlı kalması, banyo aşılarda antijen alımının mukozal yüzeylerle sınırlı oluşunu desteklemektedir.

IL-8 (interlökin-8), kemotaktik bir kemokin olup nötrofillerin inflamasyon bölgesine çekilmesinde önemli rol oynar. Bu çalışmada, ***Y. ruckeri* kombine banyo aşısı** sonrası özellikle solungaç ve ön böbrekte erken dönemde (4–24 saat) IL-8 ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı, ilerleyen süreçte ise regüle edildiği gözlenmiştir.

Benzer şekilde, Raida ve Buchmann (2009), formalin-inaktive *Y. ruckeri* aşılamasını takiben gökkuşağı alabalığında solungaç ve anterior böbrek dokularında IL-8 transkript seviyelerinin ilk 24 saat içinde anlamlı şekilde arttığını bildirmiştir. Bu durum, hızlı bir doğuştan bağışıklık cevabını ve nötrofil aktivasyonunu desteklemektedir.

Tafalla vd. (2016**)**, mukozal aşılama sonrası IL-8 ekspresyonunun özellikle solungaç ve barsak gibi mukozal yüzeylerde erken inflamatuar işaretleyici olarak kullanıldığını ve geç dönemde baskılanmasının, immün homeostazın yeniden kurulmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu yönüyle 48. saat ve sonrası için izlenen baskılanma fizyolojik bir regülasyon mekanizmasını işaret etmektedir.

Bağırsak dokusundaki IL-8 ekspresyonunun genel olarak düşük olması, mukozal yüzeylerde tolerojenik bir mikroçevrenin baskın olabileceğini göstermektedir. Beck ve Peatman (2015), alabalık bağırsaklarında doğuştan gelen yanıtların zayıf regülasyon altında olduğunu ve inflamatuar yanıtın genellikle lokal baskılanma ile sonuçlandığını belirtmiştir.

Y. ruckeri kombine banyo aşı uygulaması, IL-8 aracılığıyla erken dönemde inflamatuar yanıtı özellikle solungaç ve ön böbrekte uyarırken, bu yanıtın geç dönemde baskılandığı gözlenmiştir. Bu durum, aşı sonrası inflamasyonun kontrollü şekilde yönetildiğini ve adaptif faza geçişin düzenlendiğini göstermektedir.

Kompleman sistemi, özellikle C3 komponenti, balıklarda doğuştan gelen bağışıklığın temel bir unsuru olup hem opsonizasyon hem de proinflamatuar sinyalizasyon yoluyla patojen eliminasyonunda rol oynar. Bu çalışmada, *Y. ruckeri* kombine banyo aşılamasını takiben dalak ve solungaçta özellikle 24. saatte C3 gen ekspresyonunun arttığı, ancak sonraki dönemlerde baskılandığı gözlenmiştir. Bu durum, kompleman sisteminin erken aktivasyonunu ve daha sonra regülasyonunu göstermektedir.

Benzer şekilde, Mokhtar vd. (2023), tarafından yapılan incelenede, *Y. ruckeri* enfeksiyonuna karşı alabalıklarda serum C3 seviyelerinin erken dönemde yükseldiği ve enfeksiyonun ilerleyen safhalarında bu düzeyin stabilize olduğu bildirilmiştir. Bu bulgu, mevcut çalışmada gözlenen erken C3 ekspresyon piki ile uyumludur.

Zhang vd. (2010), formalin-inaktive *Y. ruckeri* aşısı uygulanan alabalıklarda, özellikle ön böbrek ve karaciğer dokularında C3 gen ekspresyonunun erken dönemde anlamlı derecede arttığını ve 72 saat sonrasında baskılandığını bildirmiştir. Bu da, aşılama sonrası kompleman aktivasyonunun geçici bir süre etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Sunyer (2013**)**, teleost balıklarda C3'ün, doğuştan gelen bağışıklık ile adaptif immün yanıt arasındaki köprü rolüne dikkat çekerek, C3 ekspresyonunun yalnızca inflamatuar yanıtın değil, aynı zamanda B hücre aktivasyonu ve antikor üretiminin de düzenleyicisi olduğunu belirtmiştir. Bu bağlamda, dalak ve ön böbrekteki erken C3 artışı, adaptif faza hazırlayıcı bir yanıt olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak, *Y. ruckeri* kombine banyo aşısı sonrası gözlenen C3 gen ekspresyon profili, literatürdeki benzer çalışmalarda bildirilen erken aktivasyon ve geç dönem regülasyon eğilimi ile uyumludur. Bu durum, aşının doğuştan bağışıklığı hızlıca uyararak etkili bir ilk savunma sağladığını, ancak inflamatuar kontrol mekanizmalarının daha sonra devreye girdiğini göstermektedir.

L-10, proinflamatuar sitokinleri baskılayarak immün yanıtın düzenlenmesinde ve aşırı inflamasyonun önlenmesinde kritik rol oynayan anti-inflamatuar bir sitokindir. Bu özelliğiyle, balıklarda da hem doğuştan hem adaptif immün sistemde inflamatuar dengenin sağlanmasında önemli bir düzenleyici olarak kabul edilmektedir (Savan vd. 2003).

Bu çalışmada, ***Y. ruckeri* kombine banyo aşısı** uygulamasını takiben özellikle ön böbrek ve bağırsakta 7. ve 14. günlerde IL-10 gen ekspresyonunun artış gösterdiği, solungaç ve dalakta ise daha erken dönemde (24–48 saat) artış ve ardından denge veya baskılanma eğilimi sergilediği belirlenmiştir. Bu bulgu, IL-10'un hem sistemik hem mukozal düzeyde inflamatuar yanıtı regüle etmeye yönelik geç dönem etkisini ortaya koymaktadır.

Raida ve Buchmann (2009) tarafından yapılan çalışmada, formalinle inaktive edilmiş *Y. ruckeri* aşısı ile muamele edilen alabalıklarda, IL-10 ekspresyonunun 3. ve 7. günlerde ön böbrekte arttığı ve bu artışın TNF-α ve IL-1β gibi proinflamatuar sitokinlerdeki düşüşle birlikte seyrettiği bildirilmiştir. Bu bulgu, bizim çalışmamızda gözlenen geç dönem IL-10 artışı ile benzerlik göstermektedir.

Fajardo vd. (2022**)** de, rekombinant *Y. ruckeri* dış membran proteinleri ile aşılanan balıklarda IL-10 seviyelerinde anlamlı bir artış olduğunu ve bu artışın bağışıklık sisteminde dengeleyici rol oynayarak aşırı inflamasyonu önlediğini bildirmiştir. IL-10'un bu şekilde immün yanıtın kontrolünde görev aldığı, özellikle mukozal yüzeylerde immün tolerans ve doku bütünlüğü açısından kritik olduğu vurgulanmıştır.

Sommerset et al. (2005) ise mukozal aşılama yaklaşımlarında IL-10'un inflamasyon modülasyonu açısından önemli bir hedef olduğunu belirtmiş ve banyo aşıları gibi mukozal yoldan uygulanan biyolojik ürünlerde IL-10 ekspresyon düzeylerinin aşının immün regülasyon başarımını yansıttığını ifade etmiştir.

Sonuç olarak, *Y. ruckeri* kombine banyo aşılaması sonrası IL-10 gen ekspresyonundaki geç dönem artışlar, inflamatuar sürecin fizyolojik sınırlar içinde tutulduğunu ve aşının immün regülasyon kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum, aşı güvenliği ve tolerabilitesi açısından olumlu bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir.

L-1β, balıklarda doğuştan gelen bağışıklık yanıtının erken safhalarında görev yapan, güçlü proinflamatuar etkili bir sitokindir. Patojen tanıma sonrasında makrofajlar ve nötrofiller tarafından salınarak, inflamatuar hücre göçünü, vasküler geçirgenliği ve diğer sitokinlerin üretimini tetikler (Zou ve Secombes, 2016).

Bu çalışmada, ***Y. ruckeri* kombine banyo aşısı** uygulamasının ardından özellikle solungaç ve ön böbrek dokularında 4. ve 24. saatlerde IL-1β ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir. Bu bulgu, aşı antijenlerinin hızlı şekilde algılandığını ve erken inflamatuar yanıtın etkin biçimde aktive edildiğini göstermektedir. İlaveten, 48. saat sonrası gözlenen baskılanma eğilimi, inflamasyonun fizyolojik düzeylerde regüle edildiğine işaret etmektedir.

Raida ve Buchmann (2009) da, oral yolla zayıflatılmış *Y. ruckeri* ile aşılanan gökkuşağı alabalıklarında, IL-1β ekspresyonunun ilk 1-3 gün içerisinde anlamlı biçimde arttığını ve bunu takiben düşüş gösterdiğini bildirmiştir. Bu sonuç, bizim verilerimizle örtüşmekte ve IL-1β'nin erken faz göstergesi olduğunu doğrulamaktadır.

Mukozal yüzeylerdeki yanıtları değerlendiren Sommerset et al. (2005), IL-1β ekspresyonunun mukozal bağışıklığın başlatılmasında etkili olduğunu ve özellikle banyo aşıları sonrası epitel dokularda güçlü inflamatuar yanıtın oluştuğunu bildirmiştir. Bu, solungaçta gözlenen erken IL-1β artışı ile uyumludur.

Sonuç olarak, IL-1β gen ekspresyonunun erken zaman dilimlerinde gözlenen artışı, *Y. ruckeri* kombine banyo aşısının inflamatuar immün yanıtı hızlıca tetiklediğini ve doğuştan bağışıklık sistemini aktive ettiğini göstermektedir. Bu sitokinin geç dönemlerde baskılanması ise inflamasyonun kontrol altında tutulduğuna işaret ederek aşının güvenlik profiline katkı sağlamaktadır.

IFN-γ, balıklarda hem doğuştan hem de kazanılmış bağışıklık yanıtında merkezi rol oynayan sitokinlerden biridir. Özellikle Th1 tipi adaptif bağışıklık yanıtının belirleyici aracısı olan IFN-γ, makrofaj aktivasyonu, antijen sunumu ve hücre içi patojenlere karşı savunma mekanizmalarını uyarır (Zou & Secombes, 2016).

Bu çalışmada, ***Y. ruckeri* kombine banyo aşısı** uygulamasını takiben özellikle solungaç, ön böbrek ve dalak dokularında 4. ve 24. saatlerde belirgin bir IFN-γ ekspresyonu artışı gözlenmiştir. Bu bulgular, doğuştan bağışıklığın erken aktivasyonunu ve aynı zamanda Th1 yönelimli adaptif yanıtın şekillenmeye başladığını düşündürmektedir. IFN-γ düzeyinin 48. saat sonrası baskılanması ve 14. günde dengeye ulaşması, immün yanıtın fizyolojik regülasyon içinde tutulduğuna işaret eder.

Raida ve Buchmann (2009), oral aşılamayla *Y. ruckeri*'ye karşı bağışıklanan gökkuşağı alabalıklarında IFN-γ düzeyinin 2. ve 3. günlerde önemli ölçüde arttığını, ardından azaldığını bildirmiştir. Bu bulgular çalışmamızdaki erken pik ve geç regülasyon paterni ile uyumludur.

Mukozal bağışıklık açısından değerlendirildiğinde, Zhang vd. (2010), banyo yoluyla uygulanan inaktif aşı sonrası IFN-γ transkript seviyesinin özellikle solungaç epitelinde hızla arttığını ve mukozal antiviral savunmanın aktive olduğunu göstermiştir. Solungaç dokusunda gözlenen erken güçlü ekspresyon da bu mukozal yanıtla örtüşmektedir.

Sonuç olarak, IFN-γ gen ekspresyonu hem mukozal (solungaç ve bağırsak) hem de sistemik (ön böbrek ve dalak) dokularda erken dönemde artmış, 48. saat ve sonrası regülasyona uğramıştır. Bu patern, *Y. ruckeri* kombine banyo aşısının Th1 yönelimli antiviral ve hücre aracılı bağışıklık aktivasyonunu uyarmadaki etkinliğini desteklemektedir.

CD4-1 T hücreleri, antijen sunan hücrelerden MHC II üzerinden sinyal alarak farklılaşan ve bağışıklık yanıtının yönlendirilmesinde temel rol oynayan yardımcı T hücreleridir. Balıklarda CD4-1 geninin ekspresyonu, özellikle Th hücre popülasyonlarının aktivasyon göstergesi olarak kabul edilir (Sunyer, 2013**)**.

Bu çalışmada, ***Y. ruckeri* kombine banyo aşısı** uygulamasını takiben solungaç, ön böbrek ve dalak dokularında genellikle sınırlı düzeyde CD4-1 ekspresyonu gözlenmiş; en belirgin artış ise solungaç ve ön böbrek dokularında 7. günde kaydedilmiştir. Bağırsak dokusunda ise 14.

günde anlamlı düzeyde yukarı regülasyon izlenmiştir. Bu bulgular, CD4+ T hücrelerinin özellikle geç dönemde mukozal ve sistemik bağışıklıkta devreye girdiğini düşündürmektedir.

Harun vd. (2011), gökkuşağı alabalığında inaktif banyo aşılaması sonrası CD4-1 gen ekspresyonunun sistemik dokularda (özellikle ön böbrek ve dalak) 5. ve 7. günlerde arttığını bildirmiştir. Bu çalışma ile uyumlu olarak, geç dönem aktivasyonu aşının gecikmeli adaptif bağışıklığı uyarabildiğini göstermektedir.

Mukozal düzeyde yapılan diğer araştırmalarda, Picchietti vd. (2021), mukozal CD4+ T hücre aktivasyonunun genellikle daha düşük seviyelerde ve geç dönemde gözlendiğini, bunun balıklarda tolerojenik veya sınırlandırılmış mukozal adaptif yanıt stratejisiyle ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da, solungaç ve bağırsakta CD4-1 ekspresyonunun geç pik yapması bu sonuçları desteklemektedir.

Ayrıca, Picchietti vd. (2021), CD4+ T hücre aktivasyonunun özellikle protein bazlı aşılamalarda gecikmeli fakat antijen spesifik olduğu ve adaptif immün hafızanın gelişimi açısından kritik rol oynadığına dikkat çekmiştir. CD4-1 geninin 14. gün düzeyindeki artışı, bu bağlamda hafıza oluşumunun başlangıç göstergesi olabilir.

Sonuç olarak, CD4-1 gen ekspresyonu, *Y. ruckeri* kombine banyo aşısı sonrası özellikle 7. ve 14. günlerde sistemik ve mukozal dokularda aktive olmuştur. Bu patern, aşının gecikmeli yardımcı T hücre aktivasyonunu tetikleyebildiğini ve bu mekanizmanın uzun süreli koruyuculuk açısından önem taşıyabileceğini göstermektedir.

CD8+ T hücreleri, sitotoksik etki göstererek enfekte hücrelerin eliminasyonunda görev alır ve özellikle virüs kaynaklı enfeksiyonlarda veya hücre içi patojenlere karşı kritik rol oynar. Balıklarda CD8-α gen ekspresyonu, bu sitotoksik T hücrelerin aktivasyon göstergesi olarak kabul edilmektedir (Taniuchi, 2018).

Bu çalışmada, ***Y. ruckeri* kombine banyo aşısı** sonrası CD8-α gen ekspresyonunun dokulara göre farklılık gösterdiği saptanmıştır. Solungaç ve ön böbrekte 7. günde; dalakta ise 24. saatten başlayarak 7. ve 14. günlerde devam eden anlamlı düzeyde artışlar izlenmiştir. Bağırsakta ise 7. günde pik yapan ekspresyon, 14. günde baskılanmıştır.

Özellikle **dalakta güçlü ve devamlı yukarı regülasyon**, sekonder lenfoid organ düzeyinde CD8+ T hücre aktivasyonunun hem erken hem geç fazda devreye girdiğini göstermektedir. **Sommerset et al. (2003)**, banyo aşılaması sonrası CD8+ yanıtın öncelikle dalak ve böbrek gibi sistemik dokularda aktive olduğunu bildirmiştir. Bu bulgular, bizim çalışmamızdaki geç yanıt paternleriyle paralellik göstermektedir.

Mukozal düzeyde 7. günde görülen artış, özellikle solungaç ve bağırsakta geçici bir CD8+ T hücre aktivasyonu olduğunu göstermektedir. Harun vd. (2011), mukozal bağışıklıkta CD8+ hücre aktivasyonunun genellikle daha geç başladığını ve kısa süreli olduğunu, bunun da mukozal dokularda aşırı sitotoksik hasarı önlemeye yönelik koruyucu bir mekanizma olduğunu öne sürmüştür.

Picchietti vd. (2021), balıklarda CD8+ T hücrelerin sadece enfekte hücreleri hedeflemekle kalmayıp aynı zamanda antijen sunumu ve hafıza gelişimi gibi işlevlerde de yer aldığını belirtmektedir. Bu bağlamda, 14. gündeki yüksek ekspresyon özellikle **dalak dokusunda** bağışıklık hafızasının oluşmaya başladığına işaret edebilir.

Sonuç olarak, CD8-α gen ekspresyonu, sistemik dokularda güçlü ve sürekli bir aktivasyon gösterirken, mukozal dokularda geçici ve sınırlı bir aktivasyon paternine sahiptir. Bu durum, aşının sistemik düzeyde sitotoksik adaptif yanıtı etkin şekilde indüklediğini, ancak mukozal bölgelerde bu yanıtın sınırlı tutulduğunu ortaya koymaktadır.

***V. anguillarum* O1 Emülsiyon Banyo Aşı Gen Ekspresyonları**Toll-like reseptör 2 (TLR-2), gram-negatif bakterilere karşı doğuştan bağışıklık yanıtının başlatılmasında önemli bir rol oynar. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulamasını takiben özellikle **solungaç ve ön böbrek dokularında 4. ve 24. saatlerde belirgin TLR-2 gen ekspresyonu artışı** izlenmiş, **48. saat ve sonrası dönemlerde bu aktivasyonun baskılandığı** görülmüştür. Bu durum, mukozal ve sistemik doğuştan bağışıklığın hızlı aktivasyonunu ve ardından immün regülasyon süreçlerinin devreye girdiğini göstermektedir.

Bu sonuçlar, **TLR-2'nin mukozal bağışıklıkta erken fazda patojen tanıma ve proinflamatuar sinyallerin iletimindeki merkezi rolünü** doğrular niteliktedir. Gökkuşağı alabalığında yapılan benzer bir çalışmada, *V. anguillarum* ile enfekte edilen balıklarda TLR-2 ekspresyonunun enfeksiyonun ilk 24 saatinde belirgin şekilde arttığı ve daha sonra normale döndüğü rapor edilmiştir (Tafalla vd. 2013; Jørgensen, 2014. Ayrıca, banyo aşılama yöntemiyle uygulanan antijenlerin mukozal yüzeylerde doğrudan tanınması nedeniyle TLR-2'nin özellikle **solungaç ve bağırsak gibi yüzey organlarında hızlı şekilde uyarıldığı**, önceki deneysel modellemelerle de desteklenmektedir (Salinas, 2015; Heidarieh vd, 2021). Bu bağlamda, *V. anguillarum* O1 banyo aşısı ile elde edilen bu bulgular, doğuştan bağışıklığın hızlı aktivasyonu açısından başarılı bir aşılama yanıtına işaret etmektedir.

Sonuç olarak, TLR-2 geninin erken dönemdeki yukarı regülasyonu, banyo aşısının ilk immün tanıma basamağında etkili olduğunu ve doğuştan bağışıklık yanıtlarını başlatabildiğini göstermektedir. Geç dönemdeki baskılanma ise, inflamatuar sürecin kontrol altına alındığını ve olası doku hasarının önlendiğini düşündürmektedir.

IgT, teleost balıklarda mukozal yüzeylerde görev yapan başlıca immünoglobulindir ve mukozal bağışıklığın başlatılması ve sürdürülmesinde kritik öneme sahiptir (Zhang et al., 2010). *Y. ruckeri* banyo aşı uygulamasını takiben özellikle **bağırsak ve solungaç dokularında 7. ve 14. günlerde gözlenen IgT gen ekspresyonu artışı**, lokal mukozal bağışıklığın geç dönemde aktive olduğunu ortaya koymaktadır. Bu, antijen sunumunun ardından spesifik B-hücrelerinin olgunlaştığını ve IgT üretiminin başladığını düşündürmektedir.

Benzer şekilde, *V. anguillarum*'a karşı oral ve immersiyon aşı uygulamalarında, **IgT'nin geç dönemde (genellikle 7–14. gün) yukarı regülasyon gösterdiği**, çeşitli türlerde yapılan

çalışmalarla da gösterilmiştir (Xu vd. 2013). Özellikle bağırsak ve solungaç gibi antijenle doğrudan temas eden dokularda bu artışın daha belirgin olması, aşının mukozal etkinliğine işaret etmektedir.

Mukozal IgT yanıtının geç başlaması, ilk aşamada antijenin mukozal bağışıklık sistemi tarafından işlenmesi, ardından özgül B-hücrelerin uyarılması ve immünoglobulin sınıf değişimi süreçlerinin zaman almasına bağlanmaktadır (Salinas, 2015). Bu çalışma da IgT yanıtının mukozal yüzeylerde geç fakat spesifik bir şekilde aktive olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak, *V. anguillarum* O1 banyo aşısı, mukozal yüzeylerde spesifik adaptif bağışıklığı uyarabilmiş ve IgT üretimini tetiklemiştir. Bu da aşının özellikle mukozal koruma açısından etkili bir strateji sunduğunu göstermektedir.

IgM, teleost balıklarda hem sistemik hem de mukozal bağışıklığın erken fazında görev alan başlıca immünoglobulindir. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı uygulamasını takiben özellikle **ön böbrek ve dalak dokularında 4. ve 24. saatlerde gözlenen IgM ekspresyon artışı**, antijenle temas sonrası erken sistemik humoral bağışıklığın uyarıldığını göstermektedir.

Gökkuşağı alabalığında yapılan benzer çalışmalarda, banyo veya oral aşılamayı takiben ilk 48 saat içinde IgM transkriptlerinin belirgin şekilde arttığı ve bu artışın 7. gün sonrasında azaldığı bildirilmektedir (Raida ve Buchmann, 2008). Bu erken aktivasyon, *V. anguillarum* antijenlerinin sistemik immün organlar tarafından hızla tanınması ve plazma hücrelerine dönüşüm sürecinin başlatılmasıyla ilişkilendirilmektedir.

Mukozal yüzeylerde (örneğin solungaç ve bağırsak) IgM yanıtı daha düşük ve geçici düzeyde kalmıştır. Bu durum, IgM'in daha çok sistemik dolaşımda görev yapmasına ve IgT'nin mukozal yüzeylerde baskın olmasına bağlanmaktadır (Zhang ve 2010).

Sonuç olarak, IgM ekspresyonunun erken ve geçici artışı, *V. anguillarum* O1 banyo aşısının sistemik bağışıklıkta antikor üretimini başlatma kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Ancak kalıcı mukozal yanıtlar açısından IgT ile kombine değerlendirme daha kapsamlı bir bakış sunmaktadır.

***V. anguillarum* O1 banyo aşısı sonrası**, özellikle **solungaç ve ön böbrek dokularında 4. ve 24. saatlerde gözlenen IL-8 ekspresyon artışı**, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin erken fazda güçlü şekilde aktive olduğunu göstermektedir. IL-8 (CXCL8), nötrofil kemotaksisini başlatan başlıca kemokinlerden biridir ve teleost balıklarda inflamasyonun hızla başlamasında merkezi bir rol oynar.

Gökkuşağı alabalığında yapılan çalışmalarda, özellikle immersiyon (banyo) aşılaması sonrasında IL-8'in hızlı ve geçici şekilde yukarı regüle olduğu, 24–48 saat içinde zirve yaptığı ve daha sonra baskılandığı rapor edilmiştir (Havixbeck ve Barreda, 2011; Raida ve Buchmann, 2008). Bu dinamik yanıt, inflamatuar süreçlerin aşırı aktivasyonunu engelleyerek dokuların korunmasına yardımcı olur.

Mukozal yüzeylerdeki IL-8 aktivasyonu, patojenle ilk temas noktalarında immün hücrelerin hızlı mobilizasyonunu sağlayarak **lokal inflamatuar yanıtın başlatılmasında** önemlidir (Wang vd. 2013). Bu çalışma bulguları da *V. anguillarum* O1 banyo aşısının erken IL-8 yanıtı ile hızlı bir doğuştan bağışıklık uyarımı sağladığını göstermektedir.

Kompleman 3 (C3), hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklıkta görev alan en önemli opsonin proteinlerinden biridir. *V. anguillarum* O1 banyo aşısı sonrasında **dalak ve solungaç dokularında 24. saatte gözlenen belirgin C3 gen ekspresyonu artışı**, aşıya karşı doğuştan bağışıklık sisteminin opsonizasyon yoluyla aktive edildiğini ortaya koymaktadır.

Teleost balıklarda C3 gen ailesinin birden fazla kopyası bulunmakta olup, patojenle karşılaşma sonrası hızlı bir şekilde sentezlendiği bilinmektedir. Gökkuşağı alabalığında yapılan çalışmalarda da *V. anguillarum* ile enfeksiyon veya aşılamayı takiben **C3 ekspresyonunun özellikle 24 saat içinde belirgin şekilde arttığı**, daha sonra ise homeostatik kontrol mekanizmaları ile baskılandığı gösterilmiştir (Zhang vd., 2004; Sunyer, 2013).

Bu çalışmada dalakta ve ön böbrekte gözlenen erken C3 yanıtı, sistemik bağışıklığın antijen temizliğinde ve immün kompleks oluşumunda C3'ün kritik rolünü teyit etmektedir. Bağırsakta geç dönem artış ise mukozal kompleman aktivasyonunun daha sınırlı ve geç yanıt verdiğini göstermektedir (Malmstrøm vd. 2013).

Sonuç olarak, C3 yanıtının erken ve geç dönemlerde farklı dokularda farklı ekspresyon profili göstermesi, banyo aşısının hem sistemik hem de lokal immün aktivasyonu tetiklediğini ve C3 üzerinden opsonizasyonu başlattığını desteklemektedir.

IL-1β, inflamasyonun erken fazında görev alan anahtar proinflamatuar sitokinlerden biridir. ***V. anguillarum*** **O1 banyo aşısı** sonrası **solungaç ve ön böbrek dokularında 4. ve 24. saatlerde gözlenen IL-1β artışı**, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hızlı şekilde aktive edildiğini göstermektedir.

Teleost balıklarında IL-1β gen ekspresyonu, patojen tanıma reseptörleri (örneğin TLR'ler) aracılığıyla aktive edilen sinyal yolakları üzerinden indüklenmekte ve özellikle nötrofil ve makrofaj aktivasyonunu tetiklemektedir (Zou ve Secombes, 2016). Raida ve Buchmann (2008), benzer şekilde immersiyon aşılaması sonrası IL-1β'nin 24 saatte zirve yaptığını ve 48 saatten sonra baskılandığını bildirmiştir.

Dalakta ve bağırsakta gözlenen kısa süreli ekspresyon artışları, sistemik ve mukozal inflamatuar yanıtların sınırlı ve geçici olduğunu göstermektedir. Bu, aşının hedeflenen şekilde inflamasyonu başlatıp aşırıya kaçmadan immün regülasyonu sağladığını işaret eder (Jørgensen vd. 2011).

IL-10, inflamasyonu baskılayan, homeostatik dengeyi sağlayan en önemli anti-inflamatuar sitokinlerden biridir. ***V. anguillarum*** **O1 banyo aşısı** sonrası özellikle **ön böbrek ve bağırsak dokularında 48. saat ve 7. gün civarında gözlenen IL-10 artışı**, aşının oluşturduğu inflamatuar yanıtın **düzenlenmesi ve kontrollü olarak çözülmesi** açısından kritik önemdedir.

Zhang ve Wang (2010) ile Wang vd. (2013), immersiyon aşılaması sonrası IL-10 gen ekspresyonunun inflamatuar genlerin (ör. IL-1β, TNF-α) ardından yükseldiğini ve inflamasyonu fizyolojik sınırlarla sınırladığını belirtmişlerdir. Bu çalışmadaki bulgular da benzer bir zamansal ifade modelini desteklemektedir.

Solungaç ve dalakta erken dönemde baskılanan IL-10 ekspresyonu, ilk aşamada proinflamatuar yanıtın önceliklendirildiğini; ancak daha sonra IL-10'un geçici bir çözümleyici mekanizma olarak devreye girdiğini göstermektedir (Iliev vd. 2013).

IFN-γ, özellikle viral enfeksiyonlara karşı immün savunmanın merkezinde yer alan bir sitokindir. Ancak bakteriyel aşılamalarda da hücresel bağışıklık ve makrofaj aktivasyonu açısından önemlidir. ***V. anguillarum* O1 banyo aşısı** sonrasında **solungaç, ön böbrek ve dalakta 24. saatte gözlenen IFN-γ artışı**, hücresel bağışıklığın erken fazda aktive olduğunu göstermektedir.

Teleost balıklarında IFN-γ, CD4-1 ve **CD8-α**, T hücre yanıtlarını yönlendiren Th1 benzeri yolakların bir parçasıdır (Zou vd. 2005). Castro vd.. (2015), immersiyon aşılamasının ardından IFN-γ'nın özellikle 24–48 saat içinde zirve yaptığını ve **CD8-α**, T hücre yanıtıyla birlikte hareket ettiğini göstermiştir.

Bağırsakta ise gözlenen kısa süreli ve sınırlı yanıt, mukozal yüzeylerin hücresel yanıtlar açısından daha düşük uyarılabilirliğe sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu sonuç, IFN-γ'nın sistemik yanıttaki rolünü ön plana çıkarırken, mukozal bağışıklığın farklı düzenleme mekanizmalarıyla yönetildiğine işaret eder (Swain vd. 2009).

CD8-α, sitotoksik T hücrelerin (CTL) tanımlayıcı yüzey belirteçlerinden biridir ve viral/bakteriyel enfeksiyonlara karşı hücre aracılı bağışıklıkta kritik rol oynar. ***V. anguillarum* O1 banyo aşısı** uygulaması sonrası özellikle **dalak, ön böbrek ve bağırsak** dokularında 7. ve 24. saatlerde gözlenen **yüksek CD8-α ekspresyonu**, aşı kaynaklı antijenik uyarının CTL aracılı bağışıklığı güçlü biçimde aktive ettiğini göstermektedir.

Balıklarda **CD8-α**, sitotoksik T hücrelerin (CTL) tanımlayıcı yüzey belirteçlerinden biridir ve viral/bakteriyel enfeksiyonlara karşı hücre aracılı bağışıklıkta kritik rol oynar. ***V. anguillarum* O1 banyo aşısı** uygulaması sonrası özellikle **dalak, ön böbrek ve bağırsak** dokularında 7. ve 24. saatlerde gözlenen **yüksek CD8-α ekspresyonu**, aşı kaynaklı antijenik uyarının CTL aracılı bağışıklığı güçlü biçimde aktive ettiğini göstermektedir.

Balıklarda **CD8-α** T hücre yanıtı, genellikle IFN-γ ile korele olarak artış gösterir ve adaptif bağışıklığın sitotoksik kolunun aktifleştiğini gösterir (Castro vd. 2015; Zou vd. 2004). Özellikle **ön böbrek ve dalakta gözlenen güçlü ekspresyon**, bu dokuların teleost balıklarda lenfoid merkezler olarak işlev gördüğünü ve sistemik CTL cevabın bu bölgelerde şekillendiğini desteklemektedir.

Bağırsakta ise 7. günde pik yapan CD8-α ekspresyonunun 14. günde baskılanması, mukozal yüzeylerde kısa süreli bir hücresel aktivasyon dalgası yaşandığını düşündürmektedir (Takizawa et al., 2011). Bu da mukozal **CD8-α** T hücrelerinin geçici aktivasyonuna işaret eder. Bu sonuçlar, **banyo aşısının sistemik dokularda güçlü ve geçici bir CD8-α T hücre yanıtı** oluşturabildiğini ve bunun olası hücre-içi patojenlerin eliminasyonu için önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Kurtz vd. 2004).

T hücre yanıtı, genellikle IFN-γ ile korele olarak artış gösterir ve adaptif bağışıklığın sitotoksik kolunun aktifleştiğini gösterir (Castro vd.., 2015; Zou vd.., 2004). Özellikle **ön böbrek ve dalakta gözlenen güçlü ekspresyon**, bu dokuların teleost balıklarda lenfoid merkezler olarak işlev gördüğünü ve sistemik CTL cevabın bu bölgelerde şekillendiğini desteklemektedir.

Bağırsakta ise 7. günde pik yapan CD8-α ekspresyonunun 14. günde baskılanması, mukozal yüzeylerde kısa süreli bir hücresel aktivasyon dalgası yaşandığını düşündürmektedir (Takizawa vd. 2011). Bu da mukozal CD8+ T hücrelerinin geçici aktivasyonuna işaret eder.

Bu sonuçlar, **banyo aşısının sistemik dokularda güçlü ve geçici bir CD8+ T hücre yanıtı** oluşturabildiğini ve bunun olası hücre-içi patojenlerin eliminasyonu için önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Kurtz vd. 2004).

İnaktif *L. garvieae/petauri* Emülsiyon Enjeksiyon Aşı Gen Ekspresyonları

L. petauri inaktif enjeksiyon aşısı sonrasında TLR-2 gen ekspresyonunun özellikle solungaç ve dalak dokularında geç fazda anlamlı şekilde artış göstermesi, aşının doğuştan bağışıklık sistemini mukozal ve sistemik düzeyde etkili biçimde aktive ettiğini göstermektedir. TLR-2'nin gram pozitif bakterilere özgü patojen ilişkili moleküler desenleri (PAMPs) tanıdığı bilinmektedir. Bu bağlamda, *L. petauri*'nin hücre duvarında bulunan lipoprotein ve peptidoglikanların TLR-2 aracılı doğuştan bağışıklığı tetiklediği düşünülmektedir (Palti, 2011). Benzer şekilde, gökkuşağı alabalığında'da yapılan çalışmalarda, inaktif *L. garvieae* aşılarının TLR-2 yanıtını sistemik dokularda geç fazda artırdığı rapor edilmiştir (Halimi vd. 2020).

IL-8 ekspresyonundaki erken dönem artış ve sonraki fazlarda baskılanma*, L. petauri* aşısının inflamatuar yanıtı hızlı başlatıp ardından kontrol altına aldığını göstermektedir. IL-8 kemokin olarak nötrofil çekilimini düzenlemekte ve akut fazda önemli rol oynamaktadır. Aşı sonrası gözlenen bu erken artış, benzer şekilde *Aeromonas salmonicida* ve *L. garvieae* inaktif aşılamalarında da bildirilmiştir (Raida ve Buchmann, 2008; Castro vd. 2019). Dalakta izlenen geç dönem baskılanma, inflamasyonun fizyolojik sınırlar içinde düzenlendiğini ve aşının güvenli immün profil sunduğunu göstermektedir.

IgT ekspresyonunun geç fazda artması, özellikle mukozal dokularda lokal adaptif immün yanıtın zamanla devreye girdiğini göstermektedir. Bu durum, balıklarda IgT'nin özellikle mukozal yüzeylerde görev yapan bir immünoglobulin olmasıyla uyumludur (Zhang vd. 2010). *L. garvieae* aşısı sonrasında bağırsak ve solungaç dokularında artış gösteren IgT düzeyi, aşı antijenlerinin mukozal yüzeylerde spesifik immün hafıza oluşturabildiğini göstermektedir. IgT

yanıtının geç aktivasyonu, özellikle banyo yerine enjeksiyon yoluyla verilen inaktif aşıların karakteristiği olarak tanımlanmıştır (Xu vd. 2013).

IgM gen ekspresyonunun erken dönemde (4. ve 24. saatlerde) solungaç ve ön böbrekte artış göstermesi, aşının hızlı bir humoral yanıtı tetiklediğini göstermektedir. IgM, balıklarda ilk ortaya çıkan immünoglobulin sınıfıdır ve sistemik adaptif bağışıklığın temel efektörüdür (Uribe et al., 2011). Bu bulgu, *L. garvieae* ve *Y. ruckeri* inaktif enjeksiyon aşı çalışmalarında bildirilen erken IgM aktivasyonu ile uyumludur (Muñoz-Atienza et al., 2016; Raida ve Buchmann, 2008). Ancak, dalak ve bağırsak dokularında sınırlı ve geç dönem aktivasyon, IgM'in daha çok sistemik dolaşımda rol oynadığını ve mukozal dokularda IgT'ye kıyasla daha az etkili olduğunu göstermektedir. Geç dönem baskılanma ise aşının akut faz sonrası inflamatuar yük oluşturmadan etkisini tamamladığını düşündürmektedir.

IL-10 gen ekspresyonundaki geç dönem artışı, özellikle ön böbrek ve bağırsakta gözlemlenmesi, aşının inflamatuar yanıtları düzenleyici bir rol oynadığını göstermektedir. IL-10, anti-inflamatuar bir sitokin olup proinflamatuar tepkilerin fizyolojik sınırlar içinde tutulmasında kritik öneme sahiptir (Zou ve Secombes, 2016). Aşılamaya yanıt olarak erken dönemde IL-8 ve IL-1β gibi proinflamatuar genlerdeki artışların ardından IL-10'un ekspresyonunun yükselmesi, immün yanıtın kontrollü biçimde tamamlandığını göstermektedir. Bu düzenleyici mekanizma, *L. garvieae* ve *V. anguillarum* aşıları sonrası rapor edilen anti-inflamatuar profillerle uyumludur (Picchietti et al., 2012; Savan et al., 2003).

IL-1β, balıklarda doğuştan gelen bağışıklık sisteminin anahtar proinflamatuar sitokinlerinden biridir ve özellikle makrofajlar tarafından salgılanarak patojen tanısında ilk savunma hattını oluşturmaktadır (Zou ve Secombes, 2016). Bu çalışmada, *L. petauri* aşısına yanıt olarak solungaç ve ön böbrek dokularında 4. ve 24. saatlerde artış gösteren IL-1β gen ekspresyonu, doğuştan bağışıklığın hızlı aktivasyonunu ve aşı antijenlerinin immün sistem tarafından tanındığını göstermektedir.

Bu bulgu, *L. garvieae* aşı çalışmalarında da benzer şekilde erken IL-1β aktivasyonunun gözlendiği çalışmalarla örtüşmektedir (Pérez-Sánchez, vd. 2011). Ancak, 48. saatten itibaren IL-1β ekspresyonunun baskılanması, inflamatuar cevabın kontrol altına alındığını ve aşının fizyolojik sınırlarda kalacak şekilde bağışıklık yanıtı oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca, bağırsakta yalnızca 7. günde görülen kısa süreli IL-1β artışı, mukozal yüzeyde gecikmeli ve sınırlı bir inflamatuar aktivasyonu düşündürmektedir. Bu durum, aşının mukozal yüzeylerde daha tolerojenik bir yanıt oluşturduğuna işaret etmektedir.

Bu profil, hem *V. anguillarum* (Raida ve Buchmann, 2008) hem de *Y. ruckeri* (Wang vd. 2010) aşılamalarında gözlenen erken ve sınırlı IL-1β ekspresyon desenlerine benzerlik göstermektedir. Böylece, IL-1β'nin aşılama sonrası inflamatuar sürecin başlatılmasında kısa ama etkili bir rol üstlendiği ve ardından düzenleyici mekanizmalarla baskılandığı anlaşılmaktadır.

IFN-γ, adaptif immün yanıtın kilit bir sitokinidir ve genellikle Th1 hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler ve CD8-α T lenfositler tarafından üretilir. Geliştirilen *L. petauri* aşısı sonrası balıklarda gözlenen IFN-γ ekspresyon profili, özellikle dalak ve ön böbrek dokularında geç fazda yukarı regülasyon ile karakterizedir. Bu durum, aşının sistemik düzeyde hücresel immüniteyi indükleme kapasitesine işaret eder.

Benzer şekilde, Saeij vd. (2003) çalışmasında, DNA aşısı uygulanan *Cyprinus carpio* bireylerinde IFN-γ transkript seviyelerinin özellikle dalak ve baş böbrek dokularında anlamlı düzeyde arttığı rapor edilmiştir. Bu da aşının Th1 tipi yanıtı ve makrofaj aktivasyonunu tetiklediğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, bizim çalışmamızdaki IFN-γ artışıyla tutarlıdır ve *L. petauri*'ye karşı geliştirilen inaktif aşının da benzer bir mekanizmayla hücresel bağışıklığı aktive ettiğini düşündürmektedir.

Ayrıca, Linh vd. (2022) tarafından bildirilen IFN-γ aktivitesi, formalin-inaktive *Streptococcus agalactiae* aşısı uygulanan *Oreochromis niloticus* türlerinde, bağışıklık organlarında sitokin düzeylerinin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlar, inaktif aşıların yalnızca antikor üretimini değil, aynı zamanda hücresel bağışıklık aracılı tepkileri de uyardığını göstermektedir.

Ayrıca, Jia vd. (2021*)* çalışmasında, formalin-inaktive bir *Flavobacterium columnare* aşısı sonrası, IFN-γ transkript düzeylerinde belirgin bir yükselme rapor edilmiş ve bu durum hücresel savunmanın aktive edildiğinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, elde edilen IFN-γ ekspresyon bulguları, *L. petauri* aşısının Th1-benzeri bir adaptif immün yanıtı aktive ettiğini ve bu etkinin literatürde bildirilen benzer inaktif aşıların immün yanıt profiliyle uyumlu olduğunu göstermektedir.

CD8-α, sitotoksik T lenfositlerin (CTL) belirteci olup, hücre aracılı bağışıklıkta önemli rol oynar. CD8+ T hücreleri, genellikle intraselüler patojenlere karşı, özellikle virüsler ve bazı bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunma sağlar. *L. petauri* inaktif aşısı sonrası gözlenen CD8-α gen ekspresyonu, özellikle dalak ve ön böbrek dokularında 7. ve 14. günlerde yukarı regülasyon ile karakterize olmuş, bu da geç dönemde sitotoksik T hücre aktivasyonuna işaret etmiştir.

Bu bulgular, Purcell vd. (2006*)* tarafından *Cyprinus carpio* üzerine yapılan çalışmayla paralellik göstermektedir. Araştırmada, DNA aşısı uygulamasını takiben CD8-α ekspresyonunun ön böbrek ve dalakta anlamlı düzeyde arttığı ve sitotoksik T hücre yanıtının aşı ile aktive edildiği rapor edilmiştir.

Benzer şekilde, Yamasaki vd. (2013)*,* formalin-inaktive *Edwardsiella tarda* aşısı uygulanan Japon levreklerinde (Lateolabrax japonicus) CD8+ T hücrelerine ait ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış olduğunu ve bu artışın aşının hücresel immüniteyi güçlendirdiğini göstermiştir.

Ayrıca, Picchietti vd.. (2015) tarafından zebrafish modelinde yapılan bir çalışmada, CD8-α ekspresyonunun, mukozal immünite aktivasyonu sonrası intestinal ve solungaç dokularında geç fazda arttığı bildirilmiştir. Bu durum, bizim çalışmamızda da solungaç ve bağırsakta CD8-α ekspresyonunun 7. günde tepe yapmasıyla örtüşmektedir.

Sonuç olarak, *L. petauri* inaktif emülsiyon aşısı, adaptif hücresel bağışıklığın bir parçası olan CD8+ T hücre yanıtını özellikle geç dönemde aktive etmiş ve bu aktivasyon literatürde benzer etkileri gösteren inaktif balık aşılarıyla tutarlı bulunmuştur.

Kompleman sistemi, doğuştan gelen bağışıklığın ilk savunma hattını oluşturur ve C3 bileşeni bu sistemin merkezinde yer alır. Aşılama sonrası balıklarda C3 ekspresyon düzeylerinin artışı, opsonizasyon, kemotaksi ve hücre lizisi gibi savunma mekanizmalarının aktive edildiğini gösterir.

Çalışmamızda, *L. petauri* aşısı sonrası özellikle 24. saatte dalak ve solungaçta belirgin C3 artışı gözlenmiş, bu da erken doğuştan bağışıklık yanıtının aktive olduğunu ortaya koymuştur. Ancak sonraki zaman noktalarında bu yanıtın baskılandığı izlenmiştir.

Bu bulgular, Sunyer vd. (1998*)* tarafından yayınlanan klasik çalışmayla uyumludur. Araştırmada, gökkuşağı alabalığında formalin-inaktive bakteriyel aşı uygulaması sonrası C3 ekspresyonunun kısa süreli olarak arttığı ve doğuştan bağışıklığın geçici olarak aktive edildiği gösterilmiştir.

Zapata vd. (2006) ise balıklarda kompleman sisteminin aşılara yanıt olarak hızlı, ancak kontrollü şekilde aktive olduğunu belirtmiş, bu da bizim 24. saatteki artış ve 7–14. günlerdeki baskılanma bulgularımızla örtüşmektedir.

Sonuç olarak*, L. petauri* aşısı sonrası C3 yanıtı kısa süreli, ancak etkili bir doğuştan immün aktivasyonu yansıtmaktadır. Bu durum, aşının erken dönem patojen eliminasyonuna katkı sunduğunu göstermektedir.

CD4-1 T hücreleri, MHC sınıf II antijen sunumu yoluyla aktive edilen yardımcı T lenfositler olup, hem hücre aracılı hem de humoral immün yanıtların koordinasyonunda kritik rol oynar.

Çalışmamızda, CD4-1 gen ekspresyonu özellikle 7. günde solungaç, ön böbrek ve bağırsakta artış göstermiştir. Bu, geç fazda yardımcı T hücrelerin aktive olduğunu ve adaptif bağışıklık sürecinin başladığını göstermektedir.

Wang vd.. (2002*)*, Japon levreğinde inaktif bakteri aşılaması sonrası CD4 benzeri moleküllerin özellikle 5–7. gün arasında yukarı regülasyon gösterdiğini bildirmiştir. Benzer şekilde, Zhang vd. (2011*)* de zebrafish modelinde CD4+ hücre ekspresyonunun 6–8. günler arasında pik yaptığını ve aşılama sonrası yardımcı T hücre diferansiyasyonunun bu dönemde başladığını vurgulamıştır.

Ayrıca, Picchietti et al. (2015) tarafından bildirilen solungaç ve intestinal mukozada CD4+ ekspresyon artışı da bizim çalışmamızdaki geç dönem mukozal aktivasyonu desteklemektedir.

Sonuç olarak, *L. petauri* inaktif aşısı CD4-1 T hücre aracılı adaptif yanıtı geç dönemde uyarmış; bu, uzun süreli bağışıklık gelişimi açısından olumlu bir göstergedir.

***L. garvieae* İnaktif Emülsiyon Enjekssyon Aşı Gen Ekspresyonları**

Solungaç ve ön böbrek dokularında 4. ve 24. saatlerde anlamlı düzeyde TLR-2 ekspresyonu artışı gözlenmiş, 7. ve 14. günlerde ise ekspresyon baskılanmıştır. Bu durum, doğuştan gelen

bTLR-2, Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglikan ve lipoteikoik asit gibi yapıları tanıyan temel bir PAMP reseptörüdür. *L. garvieae* gibi Gram-pozitif patojenlere karşı erken aktivasyon, bağışıklık sisteminin hızlı yanıt kapasitesini yansıtır (Villumsen vd., 2012). Mukozal ve sistemik düzeyde erken TLR-2 artışı, aşı antijenlerinin tanındığını ve nötrofil/kemokin yolaklarının devreye girdiğini gösterir (Takano vd. 2019). Geç dönem baskılanma ise inflamatuar yanıtın fizyolojik dengeye ulaştığını düşündürmektedir. Bağışıklık sisteminin erken fazda TLR-2 üzerinden aktive olduğunu göstermektedir.

Solungaç ve dalakta 24. Saatte IL-8 gen ekspresyonunda güçlü bir artış görülmüş, 7. günden itibaren ekspresyon baskılanmıştır. Bağırsakta ise sadece 7. günde artış izlenmiştir.

IL-8, nötrofil kemotaksisini yöneten başlıca kemokindir ve özellikle mukozal inflamasyonun belirtecidir. Aşı sonrası erken dönemde IL-8 düzeyinin artması, inflamatuar hücrelerin lokal bölgeye çekildiğini ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtının başlatıldığını gösterir (Raida vd Buchmann, 2008). *L. garvieae* enfeksiyon modellerinde benzer IL-8 artışı daha önce hem doğal enfeksiyon hem de aşı uygulamaları sonrası rapor edilmiştir (Kim vd. 2017). Ekspresyonun geç dönemde baskılanması, immün regülasyon mekanizmalarının devreye girdiğini yansıtır.

Bağırsak ve solungaç dokularında 14. günde belirgin IgT artışı saptanmıştır. Ön böbrek ve dalakta geç dönemlerde **IgT ekspresyonu** sınırlı düzeyde aktive olmuştur. IgT, özellikle mukozal yüzeylerde antijenlere karşı özgül bağışıklığın temel efektörüdür. Aşı uygulamasını takiben geç dönemde bağırsak ve solungaç gibi mukozal bölgelerde gözlenen IgT artışı, lokal adaptif bağışıklığın geliştiğini ve mukozal koruyucu antikor yanıtının oluştuğunu gösterir (Zhang vdç 2010). Gökkuşağı alabalıklarında *L. garvieae*'ye karşı geliştirilen deneysel aşılarda benzer şekilde geç dönemde mukozal IgT ekspresyonu rapor edilmiştir (Halimi vd. 2020; Buffon vd. 2020).

Solungaç ve ön böbrekte erken dönemde (4–24. saat) **IgM ekspresyonu anlamlı şekilde artmış**, 7. ve 14. günlerde baskılanmıştır. Bağırsakta ise geç dönemde (7. gün) sınırlı IgM artışı izlenmiş; **dalakta 24. saatte güçlü artış görülmüştür**.

IgM, balıklarda hem sistemik hem de mukozal bağışıklıkta ilk yanıtı oluşturan temel antikordur. Bu çalışmadaki erken IgM ekspresyonu*, L. garvieae* aşısının antijenik bileşenlerinin tanınması ve humoral immün sistemin hızla aktive olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Villumsen vd. (2012) ile Li vd. (2020), enjeksiyon yoluyla uygulanan bakterin aşılarının 24–48 saat içinde sistemik IgM transkripsiyonunu artırdığını ve bu artışın 7. günden sonra azaldığını bildirmiştir. Dalaktaki artış, sekonder lenfoid organın erken fazda B-hücre aktivasyonuna katıldığını göstermektedir.

Solungaç ve ön böbrekte 24. saatte güçlü **IL-1β** ekspresyonu gözlenmiştir. Bağırsakta ise yalnızca 7. günde sınırlı artış görülmüştür. Diğer zaman noktalarında ekspresyon baskılanmıştır. IL-1β, balıklarda doğuştan gelen bağışıklığın temel proinflamatuar

sitokinlerinden biridir ve antijenle karşılaşmayı takiben hızlı şekilde aktive olur. *L. garvieae* aşısı sonrasında gözlenen erken artış, aşı antijenlerinin immünojenitesini doğrulamaktadır. Cerezuela vd. (2008) ve Haugland vd. 2005, inaktif bakteriyel aşılarda IL-1β transkript düzeylerinde erken (6–24 saat) pikler bildirirken, daha sonra ekspresyonun homeostatik düzeye döndüğünü belirtmiştir. Solungaçta gözlenen kısa süreli IL-1β artışı, lokal inflamatuar bariyer savunmasını göstermektedir.

Solungaç ve dalakta 24. saatte, ön böbrekte ise hem 24. saat hem 7. günde **IFN-γ** ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Bağırsakta ekspresyon düzeyleri düşük kalmıştır. IFN-γ, Th1 tip adaptif immün yanıtın önemli bir mediatörüdür ve makrofaj aktivasyonu, MHC-I ekspresyonu gibi hücre aracılı bağışıklık süreçlerini düzenler. Bu çalışmada gözlenen erken ve orta dönem ekspresyon artışı, *L. garvieae*'ye karşı sistemik hücresel bağışıklığın aşı ile uyarıldığını göstermektedir.Bulfon vd. (2019), Takano vd.. (2019) ile Vendrell vd. (2007) da benzer şekilde, adjuvanlı inaktif bakteriyel aşılarda IFN-γ düzeylerinde erken dönemde yükselme bildirerek hücresel bağışıklığın devreye girdiğini göstermiştir.

Solungaçta ve ön böbrekte 24. saatte sınırlı düzeyde **IL-10** artışı izlenmiş, sonraki zamanlarda baskılanma gözlenmiştir. Dalakta ekspresyon 24. saatte yükselmiş, 7. ve 14. günlerde baskılanmıştır. Bağırsakta ise IL-10 ekspresyonu genel olarak düşük seviyede seyretmiştir.

IL-10, balıklarda anti-inflamatuar rol üstlenen temel bir sitokindir ve aşırı inflamasyonu baskılayarak immün sistemde dengeyi sağlar. Bu çalışmada 24. saatte gözlenen sınırlı IL-10 artışı, aşıya bağlı doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarının kontrol altına alınmaya başlandığını göstermektedir. Bu bulgu, aşının güçlü proinflamatuar sitokinleri (örneğin IL-1β, IFN-γ) aktive etmesinin ardından, bağışıklık sisteminin homeostatik düzene geçme eğilimiyle örtüşmektedir. Benzer şekilde, *L. garvieae* inaktif aşı uygulamalarında IL-10'un erken dönemde geçici olarak arttığı, ancak uzun süreli bir baskılanma gösterdiği daha önce de gösterilmiştir (Khaj, vd. 2021; Bulfon vd. 2019). Bu düzenleme, immün tolerans mekanizmalarının aktive olduğunu ve aşının inflamatuar yanıtı patolojik düzeyde yükseltmeden sınırlayabildiğini düşündürmektedir. Ayrıca, dalak ve ön böbrek gibi lenfoid dokularda IL-10'un erken aktivasyonu, bağışıklık yanıtının sistemik düzeyde düzenlenmesine katkıda bulunduğuna işaret eder.

Kompleman sistemi bileşeni olan C3, balıklarda doğuştan gelen bağışıklığın merkezinde yer alır. Bu çalışmada, *L. garvieae* aşısı sonrası C3 gen ekspresyonunun özellikle dalakta ve solungaçta erken dönemde arttığı, ancak 7. ve 14. günlerde baskılandığı gözlenmiştir. Bu durum, kompleman aracılı bağışıklık yanıtının erken dönemde aktive olduğunu ve daha sonra kontrollü biçimde regüle edildiğini göstermektedir.

Literatürde, *L. garvieae*'ye karşı geliştirilen inaktif aşıların, özellikle erken dönemde **C3** düzeyini yükselttiği ve fagositik hücrelerin opsonizasyon kapasitesini artırarak bağışıklık yanıtını güçlendirdiği bildirilmiştir (Kim vd., 2019; Xu vd.., 2013). Bu bağlamda, elde edilen C3 ekspresyon profili, aşının etkili bir doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonu sağladığını ve

sistemik olarak kısa sürede kontrol edilen bir inflamatuar yanıt oluşturduğunu düşündürmektedir.

CD4-1 T lenfositleri, özellikle Th hücrelerini temsil eden yüzey glikoproteinleri üzerinden adaptif bağışıklıkta önemli rol oynar. Bu çalışmada, CD4-1 ekspresyonu solungaç ve ön böbrekte 7. günde anlamlı düzeyde artarken, diğer zaman noktalarında baskılanma göstermiştir. Bu sonuç, aşının CD4-1 hücre aracılı yardımcı T hücre yanıtını geç dönemde aktive ettiğini düşündürmektedir.

Balıklarda CD4-1 T hücrelerinin aktivasyonu, özellikle protein bazlı inaktif aşılara karşı geç fazda gözlenmektedir (Picchietti vd. 2021; Takano vd. 2010). CD4+ T hücrelerinin aktivasyonu, B hücreleriyle etkileşimi yoluyla antikor yanıtlarının güçlenmesini destekler. Bu bağlamda, gözlenen CD4-1 gen profili, aşının adaptif bağışıklık üzerine etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

CD8+ sitotoksik T lenfositler, özellikle hücre içi patojenlere karşı etkili savunmada önemli bir rol oynar. Bu çalışmada, *L. garvieae* inaktif aşısı uygulaması sonrası CD8-α gen ekspresyonu, ön böbrek ve dalakta 24. saat ve 7. günde anlamlı düzeyde artmış, 14. günde ise genel olarak baskılanmıştır. Bu bulgu, aşı uygulamasının sitotoksik T hücreleri erken dönemde aktive ettiğini göstermektedir.

Literatürde, balıklarda inaktif aşıların CD8+ T hücre aktivasyonunu, özellikle ilk hafta içinde tetikleyebildiği bildirilmiştir (Bulfon vd., 2019; Nakanishi,vd., 2015). Bu çalışma bulguları, *L. garvieae* aşısının antiviral ya da hücre içi bakteriyel yanıt gerektiren durumlar için CD8+ yanıt oluşturabileceğini ve adaptif immünitenin hücresel kolunu aktive ettiğini ortaya koymaktadır.

 ***L. petauri* aşısı**, hem **doğuştan bağışıklık** (TLR-2, IL-1β, IL-8, C3) hem de **adaptif yanıt** (IgT, IgM, CD4-1, CD8-α) açısından **daha uzun süreli, dengeli ve güçlü bir immün aktivasyon** sağlamaktadır.

 Mukozal yüzeylerde (özellikle solungaç ve bağırsak) **IgT ve CD8-α ekspresyonlarının** daha belirgin olması, ***L. petauri*'ye karşı geliştirilen aşının mukozal koruma düzeyinin daha yüksek** olabileceğini göstermektedir.

 ***L. garvieae* aşısı** ise erken faz yanıtında hızlı aktivasyon sağlasa da, özellikle **dalak ve bağırsak** gibi sekonder lenfoid dokularda **daha sınırlı bir yanıt** oluşturmuştur.

İnaktif Beşli Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı Gen Ekspresyonları (YLV5 ICIEV)

YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben **TLR-2 gen ekspresyonundaki erken faz artış**, (özellikle solungaç ve ön böbrek dokularında) doğuştan bağışıklığın ilk savunmasını yansıtmakta olup, teleostlarda **TLR-2'nin PAMP tanıyan PRR** olarak hızlı aktivasyon gösterdiğini destekleyen literatürle uyumludur (Takano vd. 2010; Palti, 2011). Ayrıca, Gram-pozitif bakteri ile uyarılan çalışmalarda TLR-2 ekspresyonunun artmasıyla sitokin yanıtlarının düzenlendiği bildirilen bulgular, bizim çalışmamızda 4. ve 24. saatlerde gözlenen güçlü ekspresyon artışıyla paralellik göstermektedir (Gao vd. 2012) Genel olarak, bu veriler

aşının doğuştan bağışıklık sistemini hem lokal hem sistemik düzeyde TLR-2 aracılığıyla erken evrede aktive ettiğini ve ardından regülasyon mekanizmalarıyla inflamasyonun kontrol altında tutulduğunu gösterir.

YLV5 ICIEV aşı uygulamasına bağlı olarak **solungaçta erken baskılanma ardından 14. günde belirgin artış** gözlemlenmiştir. Bu geçikmeli fractal yanıt, IL-8'in anti-inflamatuar regülasyonun ötesine geçerek güçlü bir inflamatuar tepki oluşturabildiğini göstermektedir. Asya levreği (*Lates calcarifer*) üzerine yapılan çalışmada da IL-8'nin **en yüksek düzeyde solungaç (gills) dokusunda patojenik streptokok ve *Flavobacterium* maruziyetinin ardından 6–24 saat içinde** anlamlı şekilde artış gösterdiği, ancak **48–96 saat sonra baskılandığı** bildirilmiştir (Santana, 2024). Bu benzerlik, aşının ilk etapta inflamasyonu tetikleyip daha sonra geri regülasyon mekanizmalarını harekete geçirdiğini destekler.

Ayrıca, gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) yapılan bir çalışmada LPS'nin immersiyon yöntemiyle uygulanması sonrası 2 ve 8 saat içinde IL-8 ekspresyonu ve IL-8 reseptörü (CXCR1) proteininin mukozal dokularda belirgin şekilde yükseldiği, erken dönemde güçlü lokal tepkinin işareti olarak tanımlanmıştır (Santana, 2024). Sonuç olarak, YLV5 ICIEV aşısı sonrasında gözlenen IL-8 yanıt paterninin, erken baskılanma sonrası geç dönemde güçlü artış göstermesi, literatürde patojen veya LPS uyarımı altında tanımlanan erken inflamatuar yanıt modelleri ile uyumludur. Bu yanıt, lokalde kısa süreli ama etkili bir kemokin mediyasyonu olduğunu, sistemik dengede inflamasyonun kontrol edildiğini düşündürür.

YLV5 ICIEV aşı uygulamasını takiben **IgM gen ekspresyon profilleri**, dokular arasında zamana bağlı farklılık göstermiştir.

Solungaç dokusunda, 4. ve 24. saatlerde gözlenen güçlü IgM artışı, mukozal düzeyde antijen tanıma sonrası hızlı bir humoral bağışıklık cevabını yansıtmaktadır. Ancak sonraki zaman noktalarında izlenen baskılanma, mukozal IgM yanıtının kısa süreli olduğunu ve sınırlı bir koruyuculuk sağladığını düşündürmektedir.

Ön böbrekte, erken dönemde belirgin artış, sistemik bağışıklık sisteminin hızlı bir IgM cevabı ürettiğini göstermektedir. Ancak geç dönemde baskılanma, IgM yanıtının antijen klirensini takiben fizyolojik olarak regüle edildiğini göstermektedir.

Dalakta 24. saatte görülen yüksek IgM ekspresyonu, dalak düzeyinde geçici bir antikor cevabının varlığına işaret etmektedir. Bu, aşının sekonder lenfoid organlarda geçici IgM aktivasyonuna neden olduğunu göstermektedir.

Bağırsakta ise 7. günde artış, diğer zamanlarda baskılanma, mukozal IgM yanıtının geçici olarak aktive olduğunu, ancak uzun süreli olmadığını göstermektedir. Bu bulgu, mukozal IgM'nin daha çok sistemik yanıtla senkronize şekilde ve sınırlı süreyle aktive olduğunu göstermektedir.

Teleost balıklarında IgM, **en yaygın sistemik immünoglobulin olup, humoral bağışıklığın temel aracı** olarak tanımlanmıştır (Zapata vd. 2006). Balıklarda enjeksiyon yoluyla uygulanan

inaktif bakteriyel aşılara karşı IgM transkriptlerinin ilk 24–48 saat içinde arttığı ve ardından azaldığı bildirilmiştir (Villumsen vd. 2015;Bathige ve Whang, 2013; Veenstra vd. 2017). Bu da bizim sonuçlarımızla uyumludur.

Özellikle yağ bazlı adjuvan kullanılan aşı uygulamalarında, sistemik IgM üretiminin ön böbrek ve dalakta erken fazda aktive olduğu ve bu aktivitenin antijenik yük azaldıkça baskılandığı bildirilmektedir (Raida ve Buchmann, 2008).

YLV5 ICIEV aşı uygulaması sonrasında **IgT gen ekspresyon düzeyleri**, zamana ve dokuya bağlı olarak değişken bir yanıt profili ortaya koymuştur. Bu değişim, mukozal bağışıklığın antijenik uyarıya karşı verdiği gecikmeli ancak özgün yanıtı yansıtmaktadır.

Solungaç dokusunda, erken ve orta dönemlerdeki baskılanmayı takiben 14. günde gözlenen belirgin artış, mukozal yüzeyde lokal antikor (IgT) yanıtının geç dönemde aktive olduğunu göstermektedir. Bu durum, aşının mukozal IgT üzerinden uzun vadeli koruyucu bir yanıt geliştirme potansiyeline işaret etmektedir.

Ön böbrek dokusunda, erken dönemlerde baskılanma, 14. günde ise anlamlı artış gözlenmiştir. Bu geç dönem aktivasyon, sistemik düzeyde IgT+ B hücrelerinin olgunlaştığını ve humoral bağışıklık sürecinin antijenle temas sonrası devreye girdiğini düşündürmektedir.

Dalak dokusunda, 24. saat ve 14. günde görülen güçlü ekspresyon artışları; sekonder lenfoid organ olarak dalakta IgT aracılığıyla özgül bir adaptif yanıtın geliştiğini ve bu sürecin zamana yayılı olduğunu göstermektedir.

Bağırsak dokusunda, 7. ve 14. günlerde gözlenen IgT ekspresyon artışı; mukozal yüzeyde gecikmeli fakat spesifik bir antikor yanıtının oluştuğunu ortaya koymaktadır. Özellikle erken dönem baskılanması, intestinal dokuda tolerojenik ortamın veya immün baskının varlığına işaret edebilir.

Teleost balıklarında IgT, IgM'den farklı olarak mukozal yüzeylerde baskın rol oynayan izotip olarak tanımlanmıştır (Zhang vd. 2010). Mukozal aşılama veya banyo yolu ile uygulanan inaktif aşılarda, IgT ekspresyonunun 7. gün sonrası anlamlı artış gösterdiği ve koruyucu mukozal bağışıklık yanıtının başlıca göstergesi olduğu bildirilmektedir (Xu vd. 2013; Tacchi vd. 2013). Bu bağlamda, YLV5 ICIEV aşısı da benzer şekilde gecikmeli fakat özgül bir IgT yanıtını tetiklemiştir.

Balık immünolojisi çalışmalarında, IgT transkript düzeylerindeki artış, mukozal dokularda B-hücre proliferasyonu ve spesifik antikor üretiminin başlatıcısı olarak kabul edilmektedir (Salinas vd. 2011). Bu yönüyle YLV5 ICIEV aşısı, özellikle mukozal yüzeylerde geç dönemde IgT aracılı savunma mekanizmalarını aktive edebilme potansiyeline sahiptir.

YLV5 ICIEV aşı uygulaması sonrası IFN-γ gen ekspresyonu, özellikle solungaç ve dalak dokularında **4. ve 24. saatlerde belirgin artış**, 48. saatten itibaren ise **azalan bir eğilim** göstermiştir. Bu bulgular, aşının doğuştan bağışıklık sisteminin antiviral bileşenlerinden biri

olan IFN-γ üzerinden **erken yanıt oluşturduğunu**, ancak geç dönemde regülasyona uğradığını ortaya koymaktadır.

Gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) yapılan çalışmalarda, IFN-γ transkriptlerinin intraperitoneal aşılamadan sonraki ilk 24 saat içinde dalak ve böbrek gibi lenfoid dokularda anlamlı şekilde arttığı, ardından **homeostatik bir dengeye geçildiği** bildirilmiştir (Gan vd. 2020). Bu durum, sistemik antiviral ve Th1 hücre farklılaşmasını destekleyici yanıtın geçici bir pencere içinde aktif olduğunu göstermektedir.

YLV5 ICIEV aşı uygulaması sonrası **C3 gen ekspresyon düzeyleri**, dokular arasında farklılık göstermiştir. **Solungaçta 24. saatteki belirgin artış**, doğuştan gelen mukozal bağışıklığın erken fazda kompleman aracılı olarak aktive olduğunu göstermektedir. Ancak **7. günde baskılanma**, bu aktivitenin kısa süreli ve sınırlı olduğunu düşündürmektedir.

Dalakta 24. saatte çok güçlü C3 ekspresyonu, sistemik düzeyde hızlı kompleman aktivasyonu olduğunu işaret ederken; **7. ve 14. günlerdeki baskılanma**, geç dönemde bu etkinin kontrol altına alındığını göstermektedir. **Bağırsakta 7. günde saptanan artış**, geç dönem mukozal kompleman cevabına işaret etmekte; bu durum, intestinal dokuda antijen sunumunun daha yavaş gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Literatürde, teleost balıklarda **kompleman sistemi bileşenlerinin, inaktif bakteriyel aşılamalara yanıt olarak erkenden aktive olduğu** bildirilmiştir. Örneğin, **Oncorhynchus mykiss**'te yapılan bir çalışmada, **C3 ekspresyonunun i.p. aşılamadan sonraki 24–48 saat içinde özellikle karaciğer ve dalakta yükseldiği**, ardından hızla baskılandığı rapor edilmiştir (Sunyer, 2013; Salinas vd. 2015). Bu da bizim bulgularımızla uyumlu şekilde, **C3'ün kısa süreli fakat etkili bir doğuştan bağışıklık aracısı** olduğunu doğrulamaktadır.

Ayrıca, bazı çalışmalarda **C3 aktivasyonunun opsonizasyon, kemotaksi ve fagositozun arttırılmasında** rol oynadığı belirtilmiştir (Deng vd. 2013). Bu bağlamda, erken dönemde gözlenen C3 artışları, aşının antijen sunum sürecinde fagositik hücreler üzerindeki etkisinin bir göstergesi olabilir.

Sonuç olarak, **YLV5 ICIEV aşısı sonrası C3 gen ekspresyon paternleri**, doğuştan bağışıklığın zamanlaması ve dokuya özgü yanıtları bakımından literatürle tutarlılık göstermekte; özellikle **dalak ve solungaç gibi lenfoid dokularda erken aktivasyonu desteklemektedir**.

Ayrıca, **IPNV ve VHSV gibi viral enfeksiyonlar** veya bu virüslere karşı geliştirilen DNA/protein aşı uygulamaları sonrası da IFN-γ ekspresyonunun özellikle solungaç ve böbrekte erken aktive olduğu ve 24–48 saat içerisinde azaldığı gösterilmiştir (Leal vd. 2019). Bu sonuçlar, bizim çalışmamızda gözlenen **geçici yüksek IFN-γ ekspresyonu** ile büyük ölçüde örtüşmektedir.

Bu veriler ışığında, YLV5 ICIEV aşısı sonrası IFN-γ yanıtının kısa süreli ancak güçlü olması, doğuştan bağışıklık sisteminin hızlı bir şekilde aktive edilerek potansiyel viral veya bakteriyel

tehditlere karşı konak savunmasının etkinleştiğini göstermektedir. Aynı zamanda, **kontrollü ekspresyon paternleri**, aşının inflamasyon yönünden güvenli bir profil sergilediğini de ortaya koymaktadır.

YLV5 ICIEV aşısı uygulaması sonrası IL-10 gen ekspresyonu; solungaç ve bağırsakta erken dönemde baskılanma, 7. günde artış ve 14. günde tekrar baskılanma ile karakterize olmuştur. Ön böbrekte 4. ve 24. saatlerde artış, 7. ve 14. günde baskılanma izlenirken; dalakta ekspresyon profili 24. saatte belirgin artış, sonrasında ise regülasyon yönünde olmuştur.

Bu genin ekspresyon paternleri, aşının bağışıklık sisteminde **proinflamatuar yanıtın ardından anti-inflamatuar regülasyonun** devreye girdiğini ve muhtemel inflamatuar dengenin sağlandığını göstermektedir. IL-10'un balıklarda, özellikle **regülatör T hücreleri (Treg) ve monosit/türev hücrelerde** ifade edilerek inflamasyonu sınırladığı bildirilmektedir (Zou vd. 2021).

Gökkuşağı alabalığında yapılan benzer çalışmalarda, IL-10 ekspresyonunun protein bazlı inaktif aşılamalar sonrası **genellikle geç dönemde arttığı** ve bu artışın, doğuştan bağışıklık sonrası gelişen **anti-inflamatuar düzenlemeyi** temsil ettiği ortaya konmuştur (Tacchi vd. 2017). Ayrıca, intraperitoneal ve immersiyon aşılamalarında, IL-10 düzeylerinin özellikle solungaç ve böbrekte **7. ve 14. günlerde azaldığı** bildirilmiş, bu durum **spesifik bağışıklığın baskın hale geldiği dönemi** yansıtmaktadır (Reyes-Cerpa vd. 2012).

Dolayısıyla, bu projede gözlenen IL-10 ekspresyon paternleri, aşının inflamasyon kontrolünü sağladığını, aşırı doğuştan yanıtların önlendiğini ve aşının güvenlik profilinin yüksek olduğunu desteklemektedir.

YLV5 ICIEV aşısı uygulamasını takiben CD4-1 gen ekspresyon düzeyleri, genel olarak düşük seviyede seyretmiş, ancak **solungaç ve ön böbrekte 7. günde** hafif artışlar gözlenmiştir. **Bağırsakta ise 14. günde** daha belirgin bir artış kaydedilmiştir. Bu desen, aşıya karşı gelişen **yardımcı T hücre ($CD4^+$) aracılı adaptif bağışıklık yanıtının geç dönemde** devreye girdiğini ve dokuya özgü bir yanıt olduğunu düşündürmektedir.

Teleost balıklarda CD4+ T hücrelerinin tanımlanması, memelilerdekine benzer şekilde Th1/Th2 farklılaşması ile ilişkilendirilmiştir (Nakao vd. 2011). Balıklarda CD4-1 ekspresyonunun, özellikle **aşı uygulamasını takiben sistemik lenfoid organlarda (ön böbrek ve dalak)** aktive olduğu ve bu yanıtın **7–14. günler arasında belirginleştiği** bildirilmiştir (Salinas, 2015).

Ayrıca, rainbow trout modelinde yapılan aşılamalarda, **CD4-1 geninin özellikle protein esaslı inaktif aşılarla** uyarıldığı ve **T-hücre aracılı adaptif bağışıklığın bir göstergesi** olarak kullanıldığı gösterilmiştir (Yamaguchi vd. 2019). Bu bağlamda, projede elde edilen bulgular, özellikle **bağırsak mukozasında gözlenen 14. gün artışıyla**, aşıya karşı gelişen **lokal yardımcı T hücre yanıtının** geç fazda aktive olduğunu göstermektedir. Bu durum, mukozal aşılarda hedeflenen lokal T hücre yanıtının başarısına işaret eder.

YLV5 ICIEV aşısı uygulamasını takiben **CD8-α gen ekspresyon düzeyleri**, özellikle **solungaç, ön böbrek ve dalakta 24. saat ile 7. günde** anlamlı düzeyde artış göstermiş, **14. günde ise baskılanma** eğilimine girmiştir. Bağırsakta ise **7. günde gözlenen çok güçlü ekspresyon**, ardından gelen 14. günde belirgin baskılanma ile **lokal sitotoksik T hücre yanıtının geçici bir şekilde aktive olduğunu** düşündürmektedir.

Teleost balıklarda CD8+ T hücrelerinin, viral ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı adaptif bağışıklıkta kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin, rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) modelinde yapılan çalışmalarda, **CD8-α ekspresyonunun genellikle protein bazlı aşılara yanıt olarak 7–14. günlerde arttığı** gösterilmiştir (Secombes ve Zou, 2017). Bu durum, sistemik ve mukozal lenfoid dokularda **sitotoksik T hücre aktivasyonunun zamanlamasıyla** uyumludur.

Özellikle **solungaç ve bağırsak dokularında 7. günde gözlenen CD8-α artışı**, mukozal yüzeylerdeki antijen sunumu sonrası lokal sitotoksik hücrelerin aktive olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, **balıklarda CD8+ T hücrelerinin yalnızca viral enfeksiyonlara değil, aynı zamanda inaktif bakteriyel aşılara da yanıt verebildiğini** destekleyen yeni veriler sunmaktadır (Austbø vd. 2014).

Sonuç olarak, bu projede elde edilen **dokulara özgü, geç dönemde pik yapan CD8-α ekspresyonu**, aşının sitotoksik T hücre aracılı adaptif bağışıklığı aktive ettiğini göstermekte; bu da aşı etkinliği açısından önemli bir immünolojik parametre sunmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1 Yerel MALDI-TOF MS Veri Kütüphanesi

Bu proje kapsamında, Türkiye'deki akuakültür işletmelerinden izole edilen bakteriyel patojenlere yönelik ulusal referans MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) veri kütüphanesi oluşturulmuştur. Bu kütüphane, Bruker Biotyper platformu üzerine entegre edilerek hem mevcut ticari kütüphanelerde yer almayan türlerin tanımlanmasına katkı sunmuş hem de yerli izolatlara özgü protein spektrumlarının tanımlanmasını mümkün kılmıştır.

Proje sürecinde;

- Ethanol-formik asit ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen bakteri hücre ekstraktları üzerinden 412 izolatın protein parmak izi (mass spectrum) profili elde edilmiş,
- İlk analizlerde Bruker ticari veri tabanında tanımlanamayan 32 tip suşun yerli kütüphane ile doğru tanımlandığı gösterilmiş,
- Veri kütüphanesi, başta *Y. ruckeri*, *L. garvieae*, *L. petauri*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *V. salmoninarum* gibi Türkiye'de endemik olduğu belirlenen patojenlere ait saha izolatlarının temsili protein profilleri ile güçlendirilmiştir.

Yerli veri kütüphanesinin validasyon sürecinde yapılan çapraz kontrollerde, tür düzeyinde tanımlama başarısının %98'e ulaştığı tespit edilmiştir. Özellikle klasik formik asit protokolüne kıyasla etanol-formik asit yöntemiyle daha yüksek sinyal-tepe oranı ve daha stabil spektrum üretimi sağlanmış; bu durum kütüphanenin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini artırmıştır.

Bu kapsamda geliştirilen ulusal MALDI-TOF MS veri kütüphanesi, sadece bu proje için değil, aynı zamanda Türkiye'de balık hastalıklarının tanısında hızlı, maliyet etkin ve güvenilir bir teşhis aracı olarak ulusal referans laboratuvarlarında (örneğin Bornova VKE) ve bölge laboratuvarlarında yaygınlaştırılabilir. Ayrıca, bu veri kütüphanesi, AB Tek Sağlık stratejileri çerçevesinde yürütülecek gelecekteki antimikrobiyal direnç ve patojen izleme projelerinde yüksek çözünürlüklü tanı altyapısı sağlayacak niteliktedir.

Ayrıca geliştirilen yerli MALDI-TOF MS veri kütüphanesi, sadece tanı süreçlerini hızlandırmakla kalmamış, aynı zamanda Türkiye'de yaygın olarak görülen su ürünleri patojenlerinin izlenebilirliği açısından da referans teşkil edecek bir altyapı sunmuştur.

Tanımlama başarı oranı, etanol-formik asit ekstraksiyon protokolü ile yapılan analizlerde %98 düzeyine ulaşmış olup; elde edilen yüksek kalite spektrumlar, suş düzeyinde güvenilir tanımlamanın önünü açmıştır. Bu bulgular, MALDI-TOF MS sisteminin geleneksel biyokimyasal ve moleküler yöntemlere kıyasla daha hızlı, ekonomik ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğunu bir kez daha **doğrulamaktadır (Böhme et al., 2012; Clark et al., 2013; Welker & Moore, 2011).**

6.2 Antimikrobiyal Duyarlılık ve ECOFF/ECV Değerlerinin Belirlenmesi

Bu proje kapsamında, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki akuakültür işletmelerinden izole edilen ***Aeromonas* spp., *Pseudomonas spp., F. psychrophilum, L. garvieae, L. petauri, V. anguillarum, Y. ruckeri*** ve ***V. salmoninarum*** suşlarının antimikrobiyal duyarlılık profilleri hem **disk difüzyon** hem de **broth mikrodilüsyon** yöntemleriyle sistematik olarak değerlendirilmiştir. Çalışma, hem su ürünleri patojenleri için **tahmini ECOFF (Epidemiolojik Cut-Off) değerlerinin** ilk kez oluşturulması hem de ulusal AMR izleme kapasitesine bilimsel temel oluşturması bakımından önemli bir çıktıdır.

Broth Mikrodilüsyon Yöntemiyle ECOFF/ECV Belirlemeleri

Proje kapsamında:

- *Y. ruckeri*, *L. petauri*, *Aeromonas spp.* ve *Pseudomonas spp.* izolatları için ilk kez **broth mikrodilüsyon** yöntemiyle **tahmini ECOFF/ECV değerleri** belirlenmiştir. Bu değerler, Avrupa İlaç Ajansı (EMA), CLSI ve EUCAST tarafından henüz resmi olarak tanımlanmamış türler için ülkemize özgü referans eşikler sunmaktadır.
- Belirlenen sınır değerler, özellikle yeni tanımlanan türler (ör. *L. petauri*) için önemli bir epidemiyolojik referans oluşturarak **antibiyotik direnci eğilimlerinin takibi** ve

rasyonel antibakteriyel kullanım stratejilerinin geliştirilmesi açısından kritik önemdedir (Turnidge et al., 2006; EUCAST, 2024).

Direnç Eğilimleri ve Antibiyotik Maruziyeti

- Özellikle *Aeromonas* spp. ve *Pseudomonas* spp. izolatlarında **tetrasiklin** ve **sülfametoksazol-trimetoprim (SXT)** ajanlarına karşı **doğal olmayan fenotip (NWT)** oranlarının %80'in üzerinde olması, bu türlerde çevresel antibiyotik maruziyetine bağlı olarak gelişen direnç baskısını açıkça ortaya koymuştur.
- Bu durum, özellikle açık sistem havuz ve akarsu bazlı üretim sistemlerinde, **tarımsal kaynaklı antibiyotiklerin** su ortamına geçişi ile ilişkilendirilmekte olup, One Health perspektifiyle değerlendirilmesi gereken önemli bir çevresel risktir (Cabello, 2006; Miranda et al., 2013; Reverter et al., 2020).

Ulusal AMR İzleme Altyapısına Katkı

- Proje kapsamında elde edilen veriler, **ülkemizde balık patojenlerinde antimikrobiyal direnç izlenebilirliğini sağlayacak ilk ECOFF temelli veri setlerinden birini** oluşturmaktadır.
- Bu bağlamda elde edilen sonuçlar, **AB Komisyonu'nun "One Health Action Plan Against AMR (2017)"** ve **FAO/WHO/OIE AMR Stratejileri** doğrultusunda ulusal düzeyde izleme altyapılarının geliştirilmesine doğrudan katkı sağlamaktadır.

Literatürle Uyumluluğu ve Türkiye'ye Özgü Farklılıklar

- Tespit edilen direnç oranları, benzer çalışmalarla genel olarak paralellik göstermekte olup, bazı bölgelerde daha yüksek direnç yükü gözlenmiştir (Schmidt vd. 2000; Hastein vd. 2008; Satıcıoğlu vd. 2019; Duman vd. 2020c-e).
- Bu durum, Türkiye'deki yoğun üretim bölgelerinde **antibakteriyel ajanların kontrollü ve hedefe yönelik kullanımının** önemini ortaya koymakta; **antimikrobiyal direnç haritalaması** ile bölgesel antibiyotik rehberlerinin oluşturulması gerektiğini desteklemektedir.

6.3 Virülens Belirleme, Aşı Suşu Seçimi ve Karakterizasyonu

Bu projede geliştirilecek inaktif balık aşılarında kullanılacak "master seed" (ana tohum) ve "working seed" (çalışma tohumu) suşlarının belirlenmesinde, fenotipik, serolojik ve genotipik çok katmanlı bir değerlendirme süreci uygulanmıştır. Seçim süreci, aşı etkinliği ve biyogüvenlik açısından kritik öneme sahip olup, her bir suşun **antijenik yeterliliği**, **virülens potansiyeli** ve **saha temsil kabiliyeti** göz önünde bulundurulmuştur.

Fenotipik Virülens Özellikleri (FVÖ) ve Antijenik Profil Analizleri

- Tüm aday izolatlarda **hemoliz**, **kazeinaz**, **jelatinaz**, **DNAse** ve **lipaz** enzim aktivitelerini içeren fenotipik virülens testleri (FVÖ) yürütülmüş; bu testler patojenin konak savunma mekanizmalarını aşma kabiliyetini yansıtan belirleyiciler olarak değerlendirilmiştir (Austin & Austin, 2016).

- FVÖ açısından pozitif profiller sergileyen suşlar, **SDS-PAGE** ile belirlenen yüksek moleküler ağırlıklı yüzey proteinleri ve **Western blot** ile doğrulanan immünojenik bant yapıları ile desteklenmiştir. Bu özellikler, aşılarda güçlü antijen sunumu için kritik öneme sahiptir (Tinsley vd 2011; Vendrell et al., 2007).
- Ayrıca, **mikroaglütinasyon** testleriyle yapılan serotiplendirme sayesinde homolog ve heterolog reaktivite paternleri belirlenmiş, bu da suşların geniş spektrumlu koruyuculuk potansiyellerini ortaya koymuştur.

Genomik Virülens Faktör Taraması ve Bütüncül Değerlendirme

- Master ve working seed aday suşların **tam genom sekanslamaları** (WGS) gerçekleştirilmiş ve bu veriler üzerinden **hemolizinler**, **yalancı kapsül sentez genleri**, **siderofor sistemleri**, **tip III ve tip VI salgı sistemleri** gibi başlıca virülens faktörleri taranmıştır. Virülens profili yüksek olan suşlar öncelikli adaylar olarak belirlenmiştir (Mekasha ve Linke 2021; Sarkar vd.2021; Irshath vd. 2023).
- Bu bütüncül analiz, antijenik kararlılığı, genetik bütünlük ve virülens kapasitesi açısından en uygun suşların seçilmesini sağlamıştır.

Master Seed ve Working Seed Olarak Seçilen Suşlar

Fenotipik ve genotipik değerlendirmeler sonucunda:

- **Master seed (ana tohum) suşları** olarak:
    - *Y. ruckeri* O1 BT1 – **Y-266**
    - *Y. ruckeri* O1 BT2 – **Y-75**
    - Mikrokapsüllü *L. garvieae* – **ÖS-37**
    - Kapsülsüz *L. petauri* – **L-152**
    - *V. anguillarum* O1 – **V21**
- **Working seed (çalışma tohumu) suşları** olarak:
    - *Y. ruckeri* O1 BT1 – **Y-286**
    - *Y. ruckeri* O1 BT2 – **Y2022–430**
    - Mikrokapsüllü *L. garvieae* – **L-67**
    - *L. petauri* – **L2022–296**
    - *V. anguillarum* O1 – **V18**

özellikle ön plana çıkmıştır.

Bu suşların tümü, hem **in vitro virülens testlerinde** hem de **gökkuşağı alabalığında gerçekleştirilen in vivo enfektivite deneylerinde** yüksek mortalite (%>60), tipik klinik semptomlar ve kararlı antijenik profiller göstermiştir. Bu özellikler, suşların aşılarda kullanılmak üzere seçilmesinde belirleyici olmuştur (Tobback et al., 2007; Salinas, 2015).

Stratejik Suş Seçiminin Önemi

Özellikle:

- BT1 ve BT2 serotiplerinin birlikte formüle edilmesi, *Y. ruckeri* kaynaklı biyotip temelli bağışıklık kaçışlarının önlenmesini sağlarken (Chettri et al., 2013),
- Mikrokapsüllü ve kapsülsüz *Lactococcus* suşlarının kombinasyonu, hem yapısal hem de immünolojik varyasyonlara karşı daha geniş kapsamlı koruma sağlamıştır (Altun vd. 2025b),
- *V. anguillarum* V21 ve V18 gibi yüksek virülensli sahaya özgü suşların kullanımı, hem antijenik özgüllüğü hem de saha karşılığı etkinliği artırmıştır.

Bu kapsamlı suş seçimi, geliştirilen **YLV5 ICIEV beşli kombine aşının** hem bilimsel hem de saha uygulaması açısından başarı potansiyelini güçlendirmiştir.

6.4 Aşı Formülasyonu, Güvenlik ve Etkinlik Denemeleri

- Beşli kombine inaktif enjeksiyon aşısının yanı sıra monovalan ve bivalan banyo aşıları da hazırlanmıştır.
- Aşı formülasyonlarında suşlar arasında antijenik homoloji ve heteroloji dikkate alınmış, çapraz koruyuculuk potansiyelleri değerlendirilmiştir.
- Aşı güvenlik testlerinde hiçbir advers etki gözlenmemiştir.
- İn vivo RPS değerleri %80–100 arasında değişmiş, özellikle *Y. ruckeri* BT1 ve *L. garvieae* suşlarına karşı kombine aşının yüksek koruyuculuk sağladığı belirlenmiştir.
- Aşıya ait başvuru Türk Patent ve Marka Kurumu'na yapılmıştır (**"Gökkuşağı Alabalıklarının Laktokokokkozis, Yersiniozis ve Vibriozis Enfeksiyonlarından Korunmasına Yönelik Yeni Bir İnaktif Beşli Kombine Konsantre Emülsiyon Enjeksiyon Aşı"** başlıklı buluş ismi ile **06.08.2025** tarih ve **TR2025/011035** başvuru numarası, ek TÜRKPATENT Başvuru Dilekçesi).

1. **Monovalan Aşılar:**
    - *Y. ruckeri* BT1 ve BT2 için geliştirilen inaktif banyo aşıları, kısa süreli temas sonrası sırasıyla %88 ± 1 ve %85 ± 1,97 RPS sağlamış, istatistiksel olarak anlamlı koruma sağlamıştır ($p<0,001$).
    - *L. garvieae* ve *L. petauri* için enjeksiyon yoluyla uygulanan inaktif aşılar, heterolog suşlara karşı sırasıyla **%86,6 ± 1,30 ve %82 ± 2,31 RPS** düzeyine ulaşmıştır (**$p<0,001$**). Bu oranlar, literatürde tanımlanan başarı eşiklerini aşmıştır (Vendrell vd. 2006; Goodman vd. 2017).
2. **Bivalan Aşılar:**
    - ***L. garvieae* + *L. petauri* kombinasyonu**, hem mikrokapsüllü hem kapsülsüz formları içeren formülasyonla uygulandığında, her iki patojene karşı da güçlü koruma sağlamıştır. Bivalan formül, patojenler arası antijenik varyasyonlara karşı geniş spektrumlu immünite sağlamıştır.

- ***Y. ruckeri* BT1 + BT2 banyo aşısı**, iki biyotipe karşı da eş zamanlı ve etkili koruma sağlayarak saha koşullarına daha uygun bir çözüm olarak değerlendirilmiştir.

3. **Beşli Kombine Aşı:**
    - Geliştirilen **beşli kombine inaktif emülsiyon enjeksiyon aşısı (YLV5 ICIEV)**, her bir patojene karşı **%75'in üzerinde RPS** elde etmiş ve bu oranlar başarı kriterlerini sağlamıştır.
    - Aşı; hem homolog hem de heterolog suşlara karşı koruyuculuk sağlamakla kalmayıp, birden fazla bakteriyel enfeksiyona karşı tek dozla bağışıklama avantajı sunmuştur.
    - Beşli kombine aşıda **hiçbir adjuvan/antijen antagonizması veya koruyuculuk kaybı** gözlemlenmemiştir.

Öneriler:

1. **Aşı Standartlarının Geliştirilmesi:**
    - Aşı suşu seçimi yalnızca tür düzeyinde değil, suş düzeyinde antijenik ve patogenetik özelliklere göre yapılmalıdır.
    - Çalışma tohum (eprüvasyon) suşlarının, ulusal referans laboratuvarlar tarafından standardize edilerek "referans panel" şeklinde belirlenmesi önerilir.
2. **AMR İzleme Programlarına Entegrasyon:**
    - Projede elde edilen ECOFF verileri ve direnç profilleri, TAGEM ve Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü'nün yürüteceği ulusal su ürünleri AMR izleme sistemlerine doğrudan entegre edilmelidir.
    - Türkiye'nin AB'ye su ürünleri ihracatı kapsamında, dirençli patojen taşıma riskini en aza indirmek amacıyla **balık–su–çevre** entegrasyonlu "One Health" izleme sistemleri kurulmalıdır.
3. **Tanı Kapasitesinin Geliştirilmesi:**
    - MALDI-TOF MS ile tanımlama altyapısının yerli veri kütüphaneleriyle zenginleştirilmesi yaygınlaştırılmalıdır.
    - Özellikle üretici bölgelerde bulunan laboratuvarların bu teknolojilerle donatılması, hızlı tanı ve epidemiyolojik karar mekanizmalarının güçlendirilmesine katkı sağlayacaktır.
4. **Kültür Balıkçılığında Endemik Hastalıklara Yönelik Aşı Geliştirme Stratejileri:**

Bu proje kapsamında Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilen bakteriyel balık patojenlerine karşı geliştirilen yerli monovalan, bivalan ve kombine inaktif aşılar, ulusal düzeyde balık sağlığı yönetimi, antibiyotik kullanımının azaltılması ve sürdürülebilir akuakültür hedeflerine katkı sağlamıştır. Elde edilen bilimsel bulgular ve saha denemeleri ışığında aşağıdaki öneriler geliştirilmektedir:

❖ **Ticarileştirme ve Yerli Aşı Teşviki**

- Türkiye'de endemik olarak seyreden *Y. ruckeri*, *L. garvieae*, *L. petauri* ve *V. anguillarum* gibi patojenlere karşı geliştirilen yerli aşı prototiplerinin, ticarileştirilerek sahada kullanımının yaygınlaştırılması sürdürülebilir akuakültür açısından kritik önemdedir.
- Yerli suşlardan geliştirilen bu aşıların, **kamu ihalelerinde "öncelikli biyolojik ürün"** olarak değerlendirilmesine yönelik yasal ve idari düzenlemeler teşvik edilmelidir.

❖ **Regülasyonel Uyum ve Ruhsatlandırma Süreçleri**

- Geliştirilen aşıların, **AB Farmakopesi (Ph. Eur.)** ve **Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı (WOAH/OIE)** standartlarına uygun olarak hazırlanması, ulusal düzeyde ruhsatlandırılabilirliğini güçlendirmiştir.
- Bu doğrultuda, ruhsatlandırma süreçlerinin hızlandırılması ve **GMP koşullarında üretim tesislerinin desteklenmesi**, ticarileşmenin önünü açacaktır (Salinas, 2015; Tobback et al., 2007).

❖ **Kombine Aşı Stratejilerinin Yaygınlaştırılması**

- Proje kapsamında geliştirilen **YLV5 ICIEV** (Beşli Inaktif Kombine Emülsiyon Enjeksiyon Aşı), monovalan uygulamalara göre daha geniş etken kapsama ve lojistik kolaylık sağlamaktadır.
- Kombine aşıların uygulama maliyetlerini azaltması ve küçük-orta ölçekli işletmelerde kullanım kolaylığı sunması nedeniyle, **saha denemeleriyle desteklenerek yaygınlaştırılması önerilmektedir** (Vendrell et al., 2007).

❖ **Bilimsel Özgünlük ve Yeni Etkenlere Yönelik Çalışmalar**

- Bu proje ile, ***L. petauri'*ye karşı geliştirilen ilk yerli prototip aşı**, dünya literatüründe öncü konumda olup, Türkiye'de bu etkenle mücadeleye yönelik önemli bir boşluğu doldurmuştur (Altun vd. 2025a).
- Ayrıca *Y. ruckeri* BT1-BT2 biyotip ayrımı dikkate alınarak geliştirilen formülasyonlar, önceki monovalan aşıların saha başarısızlıklarını giderecek niteliktedir (Chettri et al., 2013; Riborg et al., 2022; Altun vd. 2025b).

❖ **Antimikrobiyal Dirençle Mücadele ve Zorunlu Aşılama Politikaları**

- Kültür balıkçılığı işletmelerinde **koruyucu aşılamanın zorunlu hale getirilmesi**, dirençli patojenlerin yayılımını kontrol altına alacak ve kamu sağlığı açısından risk teşkil eden antimikrobiyal direnç sorununa karşı biyogüvenlik önlemi oluşturacaktır (WHO, 2015).
- Bu uygulamalar, **akılcı antimikrobiyal kullanım (AMU)** hedeflerini destekleyecek ve **AB pazarına ihracat rekabetini** artıracaktır (FAO, 2020).

5. Politika ve Ticarileşme Önerileri:

❖ **Yerli Aşıların Ticarileştirilmesi:**

- Geliştirilen kombine aşının üretim ölçeğine taşınarak ruhsatlandırılması ve sahada kullanımı için özel sektör ortaklıkları desteklenmelidir.
- Ticarileştirme süreçleri kamu-özel sektör-üniversite iş birlikleriyle hızlandırılmalı; "öncelikli patentli ürün" statüsünde desteklenmelidir.

❖ **Yasal Düzenlemeler ve Teşvik Mekanizmaları:**

- Yerli suşlardan geliştirilen aşıların kamu ihalelerinde öncelikli ürün statüsünde değerlendirilmesi yönünde mevzuat düzenlemeleri yapılması teşvik edilmelidir.
- Su ürünleri işletmelerinde koruyucu aşılamayı zorunlu hale getiren uygulamalarla, dirençli patojen yayılımının önüne geçilmesine yönelik politikalar geliştirilmelidir.
- Akılcı antimikrobiyal kullanına yönelik bu tür uygulamalar sürdülebilir sü ürünleri ticareti ve ihracat rekabetine imkan sağlayacaktır.

❖ **Veri Paylaşımı ve Ulusal Platform:**

Proje çıktıları, Türkiye Su Ürünleri Üretici Birliği, Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü ve Veteriner Kontrol Enstitüleri arasında oluşturulacak ulusal bir platformda paylaşılmalı, izleme ve aşı stratejileri ortak veriye dayalı olarak belirlenmelidir.