

Gökkuşluğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'nda beyaz benek hastalığına (*Ichthyophthirius multifiliis*) karşı bağışıklık kazandırılması

Trails for immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against to white spot disease (*Ichthyophthirius multifiliis*)

Egemen Nemli*  • Haşmet Çağırğan

Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Balık Hastalıkları A.B.D. 35100 Bornova, İzmir, Türkiye

* Corresponding author: egemennemli@hotmail.com

Received date: 26.01.2017

Accepted date: 16.03.2017

How to cite this paper:

Nemli, E. & Çağırğan, H. (2017). Trails for immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against to white spot disease (*Ichthyophthirius multifiliis*). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(2): 187-194. doi:10.12714/egejfas.2017.34.2.10

Öz: Bu çalışmada canlı teront, sonike trofont, ısı ile inaktive adjuvantlı teront ile aşılama gökkuşluğu alabalıklarında *O. mykiss* (Walbaum, 1792), *Ichthyophthirius multifiliis*'e (Ich) karşı oluşan humoral immun yanıt belirlenmiştir. Canlı teront, sonike trofont, ısı ile inaktive adjuvantlı teront kullanılarak intraperitoneal (İ.P.) enjeksiyon yoluyla immunizasyon gerçekleştirildi. İmmunizasyondan 21 gün sonra serum immobilizasyon titreleri belirlendi. Dört hafta sonra yapılan deneysel enfeksiyondan 4 gün sonra deriye tutunan trofont sayısı belirlendi. İ.P. yolla canlı teront (1/67,4) ve sonike trofontla (1/29,7) immunize edilen balıkların, ortalama serum anti-Ich immobilizasyon antikor seviyeleri, ısı ile inaktive adjuvantlı teront (1/11,4) ve PBS (1/9,4) enjeksiyonuyla immunize edilenlere göre daha yüksek (P<0.05) bulundu. Deneysel enfeksiyon sonrası, İ.P. yolla canlı teront (54,07 trofont/balık) ve sonike trofont (48,53 tr/balık) uygulanan balıklarda, ısı ile inaktive adjuvantlı teront (29,13 tr/balık) ve P.B.S (21 tr/balık) enjekte edilenlere göre, deriye penetre olabilen ortalama trofont sayısı önemli derecede (P<0.05) azaldığından dolayı bu balıklarda kısmi korunma meydana geldiği belirlendi. Immobilizasyon titresindeki artış ile immun balıklardaki kısmi korunma arasında pozitif korelasyon bulundu.

Anahtar kelimeler: *Ichthyophthirius multifiliis*, aşılama, gökkuşluğu alabalığı, immobilizasyon titresi

Abstract: In this study, the humoral immune responses and host protection of rainbow trout, *O. mykiss* (Walbaum, 1792) against *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) were determined after vaccination with live theronts, sonicated trophonts, adjuvant added heat inactivated theronts. Immunizations with live theronts, sonicated trophonts or adjuvant added heat inactivated theronts by intraperitoneal (I.P.) injection. Serum immobilization titres were determined 21 days post-immunization. Four weeks after immunization, the number of trophonts were assessed in rainbow trout skin four days after challenge. Mean of serum immobilization titres levels were significantly higher (P<0.05) in fish immunized with live theronts (1/67,4) and sonicated trophonts (1/29,7) by I.P. injection, than in the fish immunized with adjuvant added heat inactivated theronts (1/11,4) and PBS (1/9,4) by I.P. injection. Mean number of the trophonts that can penetrated to skins were significantly lower (P<0.05) in fish administered live theronts (21 trophonts/fish) and sonicated trophonts (29,13 tr/fish) by i.p. injection, than in the fish immunized with adjuvant added heat inactivated theronts (48,53 tr/fish) and PBS (54,07 tr/fish) by I.P. injection. Therefore, partial protection was noted on those fish. There was found positive correlation between higher levels of immobilization titres and partial protection in the immunized fish.

Keywords: *Pelophylax bedriagae*, Levant Water Frog, Lake Sülüklü, breeding ecology, population parameters

GİRİŞ

Dünya nüfusunun artışına karşın, doğal balık stoklarında hızla azalma gözlenirken, yetiştiricilik yoluyla üretilen balık miktarında artış gözlenmektedir. Dünyada su ürünleri yetiştiricilik sektöründe iç sularda üretilen gökkuşluğu alabalık balık miktarı, 2014 yılında yaklaşık 577 bin tona ulaşmıştır (FAO, 2014). Ülkemizde yetiştiricilik yoluyla yapılan üretimin yaklaşık % 42'si gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretimi olup, 2015 yılı üretimi 100 411 bin tondur (TÜİK, 2015).

Alabalık üretiminde görülen en önemli paraziter hastalıklardan biri *Ichthyophthirius multifiliis* tarafından oluşturulan beyaz benek hastalığıdır. Hastalık Ich, whitespot

disease ve ichthyophthiriasis adıyla da bilinmektedir. *Ichthyophthiriasis* 10-27 °C su sıcaklığı aralığında, Antarktika hariç, dünyanın tüm kıtalarında görülmektedir (Dickerson ve Dawe, 1995).

Enfeksiyonun şiddetli seyrettiği ve herhangi bir tedavinin uygulanmadığı durumlarda, mortalite % 100'e ulaşabilmektedir. Her ne kadar ülkemizde beyaz benek hastalığının çiftliklerde meydana getirdiği kayıplar üzerine detaylı bir araştırma yapılmıyorsa da Büyük Britanya'da alabalık çiftliklerinde hastalığın % 80 lere varan mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir. Aynı raporda tedaviye rağmen hastalık nedeniyle

kaybın % 5 olduğu bildirilmiştir (Shinn vd., 2003).

Ichthyophthiriasis'in tedavisinde banyo yoluyla ilaçların kullanılması, çok fazla iş gücüne ve çok sayıda donanım ihtiyacı duyulması nedeniyle oldukça zordur. Balıkların ilaçlı suda tutulmaları, kepçe ile aktarımı, yaralanmalara, doku bütünlüğünün bozulmasına bağlı sekonder enfeksiyonlara, kimyasal uygulamalara ve ellemeye bağlı strese yol açmaktadır (Hines ve Spira, 1974). Özellikle büyük işletmelerde, hastalığın patlak vermesi durumunda çok miktarda kemoterapötik banyo yolu ile uygulanması, çevre kirliliğine neden olabilir. Kemoterapötiklerin kullanımı tüm bu dezavantajları beraberinde getirmesinin yanı sıra hastalığı kalıcı ve etkin olarak tedavi edemez. Hâlihazırda beyaz benekle mücadelede tedaviden çok sudaki terontun öldürülerek balıkların enfekte olmaması sağlanmaya çalışılmaktadır. Enfekte balıkların aslında ilaçla tedavisi yapılmamakta uygulanan terapötikler tedaviden çok, yeni invazyonlardan korunma şeklindedir (Post, 1987). Fakat bu tarz uygulamalarda, ne kadar dikkat edilirse edilsin ölümler tamamen engellenememektedir. Bu nedenle hastalıkla mücadelede balıklara bağışıklık kazandırılması (immünizasyon) alternatif bir yöntem olarak değerlendirilmelidir.

İmmünizasyon, hastalıklardan korunmada en etkin yol olmakla beraber protozoonlara karşı etkili bir aşı geliştirmek antijenik epitopların çokluğu nedeni ile oldukça zordur. Bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarında beyaz benek hastalığına karşı koruyucu olabilecek bir aşı geliştirilmeye çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Araştırmada 11.13 ($\pm 1,48$) gr ağırlığında ve 10.9 ($\pm 0,5$) cm boyunda 260 adet alabalık kullanıldı (Demirköprü Barajı-Salihli-Manisa).

Denemede kullanılan balıklar 10 adet 220 litre hacimli silindirik plastik tanklara konuldu. Alabalık yetiştiriciliğine uygun artezyen suyu, ihtiyaç duyulan oksijen miktarının sağlanması ve sudaki kaba partiküllerin giderilmesi için resirküle filtreden geçirildi (Jet 907F). Suyun oksijen düzeyinin 6,5 mg/L'nin altına düşmemesine özen gösterildi. Her gün tanklardaki oksijen, oksijenmetre (Hanna HI 8043) ile ölçüldü. Su sıcaklığının ayarlanması amacı ile 8 adet 300 W lık termostatlı ısıtıcı (Resun) kullanıldı.

Yapılan bakteriyel ve paraziter muayenelerde herhangi patojene rastlanmamasından sonra, balıklar her tankta 65 balık olacak şekilde 200 litrelik 2 ye bölünmüş, plastik silindirik tanklara aktarıldı. Her bir tanka 1,5 L/dakika olacak şekilde su girişi sağlandı. Tüm denemeler iki paralel üçer tekrarlı olacak şekilde düzenlendi.

Antijenlerin Hazırlanması

Sonike trofontların hazırlanması

Sonike trofontların hazırlanmasında, Xu vd. (2004) yaptığı çalışmadaki yöntemi modifiye edildi. Deneysel olarak enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarından ölmek üzere olan ve üzerinde trofontların belirginleştiği balıklar yüksek dozda

fenoksi etanolle ötanazi uygulandı. Ölen balıkların her biri 600 ml'lik ve 25 °C sıcaklıkta su bulunduran plastik kaplara aktarıldı. Trofontlar balığı terk eder etmez mikropipet yardımıyla alınarak ependorf tüplerinde toplandı. Parazitin yoğunlaştırılması ve saklanması amacı ile dolan ependorf tüplerine, tüpteki sıvıda % 4 formalin olacak şekilde formalin ilavesi yapıldı. Böylece trofontların ölerek dibe çökmesi dolayısıyla da yoğunlaşması sağlandı.

İlerleyen aşamalarda trofont sayısının çok fazla olmasına ve bazı tespit edilmiş (formalin ilavesi ile öldürülmüş) trofontların ependorf tüpünün yukarı bölgesine yapışması nedeni ile ependorf tüpleri 2822 g de 1 dk süre ile santrifüj edildi (Nüve NF-200). İstenilen yoğunlukta toplanan trofontların içinde bulunduğu sıvı tamamen uzaklaştırılarak, yerine % 4 formalin içeren tespit solüsyonu ilave edildi ve kullanılabilecek kadar -20 °C saklandı (Xu vd., 2004).

Deneme grubuna kullanılacak tüm balıklara yetecek kadar trofont sayısına (19320) ulaşıldıktan sonra, trofontlar 3 defa PBS ile yıkanarak tespit solüsyonu uzaklaştırıldı. Balık başı 223 trofont olacak şekilde standardize edildi. Trofontlar, 20 KHZ'de 5 kez 5 saniye olacak şekilde sonike edildi (Bandelin sonoplus HD 2200). Ultrasonikatör sonikasyon sırasında % 45 güce ayarlandı. Sonikasyon işlemi sırasında, ısınmaya bağlı antijenik yapıda meydana gelebilecek bozulmaların engellenmesi amacı ile trofontlar buz kalıpları içinde sonike edildi. Hazırlanan antijenin Lowry Metoduna göre protein miktarı ölçüldü (Lowry vd., 1951).

İnaktive adjuvantlı terontların hazırlanması

Gökkuşağı alabalıkları *I. multifiliis*le şiddetli şekilde enfekte edilerek, trofontların deride gözle görülebilir hale gelmesi beklendi. Balıkların üzerinden ayrılan trofontlar ayrılır ayrılmaz, tomont evresine geçip kistleşmeden, pasteur pipeti yardımıyla toplanarak, 2 adet 2 ml hacimli cam kaplara ve 30 adet 10 ml hacimli plastik kaplara aktarıldı. Trofont sayısı, cam kaplarda 30'u, plastik kaplarda ise 100'ü geçmeyecek şekilde ayarlandı ve kaplardaki suyun buharlaşmasının önlenmesi amacıyla ağızları kapatıldıktan sonra 23 °C'ye ayarlanan inkubatöre yerleştirildi (Nüve ES-110).

Kapların inkubatöre yerleştirilmesinden 21 saat sonra, kaplar inkubatörden çıkarılarak lup altında (20 ve 40 x) incelendi (Novex AP-8), tomokistlerin canlı olup olmadığı ve sudaki teront sayısı belirlendi, bu sayımlar saatte bir tekrar edildi. Tomontların canlı olduğu ve çoğunun patladığı tespit edilen ve çok yoğun şekilde teront görülen kaplardaki su, 10 ml hacimli plastik tüplere aktarıldı. Burkart vd. (1990)'ın izolasyon metodu modifiye edildi, buna göre teront içeren su 20 °C'de 1000 g de 2 dakika santrifüj edildi (Hettich EBA 12R). Santrifüj işlemi biter bitmez cam pipet yardımıyla tüpün üzerinden yavaşça 7 ml su çekilerek uzaklaştırıldı. Her tüpün dibinde kalan, yoğun teront içeren su (3ml), 10ml lik tüplere toplanarak istenilen teront yoğunlu elde edilene kadar yoğunlaştırma işlemi tekrar edildi. Sayım için tüpün üzerindeki suyun uzaklaştırılmasından sonra, dipte kalan sıvıdan, otomatik pipet yardımıyla (Gilson 1-20 µl) 5 kez 1 µl lik su örnekleri alındı.

Örnekler 10 kat sulandırıldıktan sonra kısık ışıkta 40 x ve 100 x büyütmede incelenerek, içinde yer alan aktif terontlar sayıldı (Olympus CX21FSI).

Teront sayısı yeterli yoğunluğa ulaşıncaya (2500 th/0,2 ml) inaktivasyon işlemine geçildi. İnaktivasyon için sıcaklık kullanıldı. Hazırlanan antijen 35 °C de 2 saat süreyle inkubatorde bekletildi (Nüve EN-500). İnaktivasyonu takiben tekrar yoğunlaştırma santrifüj (1000g de 2 dk) işlemi uygulanarak, 2500 th/0,1 ml yoğunluğunda antijen elde edildi.

Yoğunlaştırılan antijene 1'e 2,5 (1 birim antijen 2,5 birim adjuvant) oranında ticari adjuvant (Seppic, Cedex, France) ilave edildi. Adjuvantın homojenizasyonu amacı ile antijen-adjuvant karışımı homojen hale gelinceye kadar buz kalıpları içerisinde sonike edildi. Adjuvantlı antijen, + 4 °C de 24 saat saklandıktan sonra kullanıldı.

Canlı (Aktif) teront antijeninin hazırlanması

Terontlar, inaktif adjuvantlı teront kısmında değinilen şekilde hazırlandı ve yoğunlaştırıldı. Önceki bölümde değinilen işlemlerden farklı olarak, teront sayımında sadece aktif hareketli terontlar sayıldı. Terontların yoğunluğu 2500 th/0,2 ml olarak ayarlandı. Antijen hazırlanır hazırlanmaz canlı haldeyken, balıklara intraperitoneal (I.P.) yolla enjekte edildi.

Balıkların immunizasyonu

Antijenlerin hazırlanması kısmında belirtilen antijenlerin hepsi, balıklara i.p. yolla verildi. Kontrol grubundaki balıklara, aynı yolla 0,2 ml. phosphate buffered saline (PBS) verildi. Balıklar fenoksietanol anestezide alındıktan sonra (0,32 ml/L), bir gruba insulin enjektörü ile 0,2 ml sonike teront (457,20 mg/ml protein içeren), diğer gruba aynı miktarda canlı teront verilerek I.P. yolla aşılandı. Kontrol grubuna aynı miktar ve yolla PBS verildi. Adjuvantlı inaktive teront uygulanacak gruba ise balık başı 0,35 ml antijen I.P. yolla verildi.

Canlı terontun verildiği grupta Xu vd. (2004) yaptığı yöntemin modifikasyonuna göre olası Ich enfeksiyonlarını önlemek amacı ile enjeksiyon işlemi takiben bir hafta süre ile her gün 1 saat 250 ppm formalin banyoları uygulandı .

Antijenlerin verilmesinden deneysel enfeksiyonun yapılacağı zamana kadar, balıklar 17 (± 2) °C sıcaklıkta ve (10lt/dk) su girişi olacak şekilde tutuldu.

Deneysel enfeksiyon

İmmunizasyondan 4 hafta sonra deneysel enfeksiyon gerçekleştirildi. Deneysel enfeksiyonun yapılmasından bir gün önce tanklardaki su sıcaklığının yükseltilmesi ve yüksek sıcaklığın korunmasını kolaylaştırmak amacı ile su akışı azaltıldı (1.2 lt/dk) ve tanklardaki su sıcaklığı 24 °C (±1)'ye çıkartıldı.

Yeni enfekte edilen balıklar temiz su içeren tanka aktarıldıktan sonra, su sıcaklığı 25 °C yükseltildi ve su akışı azaltıldı (1.2 lt/dk), tankın içinde bulunan balıkların tamamının ölümünü takiben 20 adet enfekte olmamış balık tankın içine

yerleştirildi. Bir saat süre ile tankta bekletilen balıklar daha sonra parazitten arı su içeren tanklara aktarıldı ve su sıcaklığı 23 (±1) °C'ye ayarlandı, balıkların üzerinde trofontların gözle görülür hale gelmesi beklendi. Derinin üzerindeki trofontlar belirginleştikten sonra her bir balık, yüksek dozda anestezikle ötanazi uygulanmasını takiben her balık ayrı 600 ml lik su içeren plastik kaplara aktarıldı. Kabin içindeki balıklar 23 °C sıcaklıkta inkube edilerek, saatte bir, ölen balık bulunduğu kaptan alınıp, yeni artezyen suyu içeren kaba aktarıldı. Bu işlem her balık için 3-6 defa tekrar edildi. Balıktan ayrılan trofozoitler 23 °C de inkube edildi. İnkubasyonun başlamasından sonraki 20-26. saatler arasında otomatik pipet yardımı ile her kaptan 5 kez 10-50 µl hacminde alınan su örneklerindeki terontlar, 100x büyütme altında sayıldı.

Parazitin üretimini takiben, balık başı 2500 teront düşecek sayıda teront içeren su, tanklara aynı anda boşaltıldı. Tanklardaki su akışı kesildi ve yoğun miktarda parazit içeren suyun tanklara dökülmesini takiben 6 saat süresince tanklara su verilmedi. Bu sürenin bitiminde tanklardaki su akışı eski haline döndürüldü (1.2lt/dk).

Balıklarda meydana gelen immün cevabın ortaya konması

Balıklarda meydana gelen bağışıklığın yorumlanmasında konakçıda parazite karşı gelişen immobilizasyon titreleri ve deneysel enfeksiyon sonrası deri üzerine tutunan trofont sayıları kullanıldı.

İmmobilizasyon

İmmunizasyondan 3 hafta sonra her deneme grubundan 5'erden 3 tekrarlı olacak şekilde toplam 15'er adet balık kan alınması amacıyla kullanıldı. Balıklar fenoksiethanolla anestezide edildi, kaudal vena'dan heparinli enjektörler yardımıyla kan alınarak serumları çıkarıldı. Kan alınan balıklar deneysel enfeksiyonda olası strese bağlı immün supresyon oluşması ihtimaline karşı denemelerden uzaklaştırıldı. Serum 20 °C de pıhtılaşmış kanın 1 dakika santrifüjü (2822 g) ile elde edildi. Serum örnekleri mikropipet yardımı ile başka ependorf tüpüne aktarıldı, -20 °C'de saklandı.

Daha önce deneysel enfeksiyon kısmında bildirildiği gibi üretilen terontlar 50 µl suda ortalama 50 adet teront olacak şekilde sulandırıldı. Serum örnekleri, Sakai, 1992'de bildirdiği yöntemle 44 °C 20 dakika tutularak komplement faktörler inaktive edildi. Mikroplak gözlerine 50'şer µl plazma konu (Greiner bio-one, Germany). Her örnek 2 şer kat olacak şekilde 1/256 dilüsyona kadar PBS (ph 7.2) ile sulandırıldı. Negatif kontrol olarak plaklardan 3 göze 50 µl PBS ilave edildi. Sulandırılan örneklerin ve PBS içeren mikroplakların gözlerine 50 µl teront (yaklaşık 50 teront) içeren su ilave edildi. Mikroplaklar 30 dk. arayla 2 saat boyunca 40 x büyütmede lup altında incelendi. Mikroplak gözlerinde bulunan terontların yarısından fazlasının aktif hareketini kaybettiği örnekler "immobilizasyon pozitif" olarak değerlendirildi.

Balıkların üzerine tutunan parazitlerin sayılması

Deneysel enfeksiyonun yapılmasından 4 gün sonra her deneme grubundan 5'er den 3 tekrarlı olacak şekilde toplam 15'er balık alındı. Bu balıklar fenoksi etanolle bayıltılarak lup altında 20 ve 40x büyütmelerde incelendi, her balıkta bulunan trofont sayısı tespit edildi (Şekil 1 ve 2). Üzerindeki parazitlerin sayıldığı balıklar, diğer balıklara göre ekstra stres faktörlerine (elleme, anesteziye alma gibi) maruz kaldıklarından tekrar tanklara geri konulmadı, yüksek dozda anesteziyle öldürüldü.

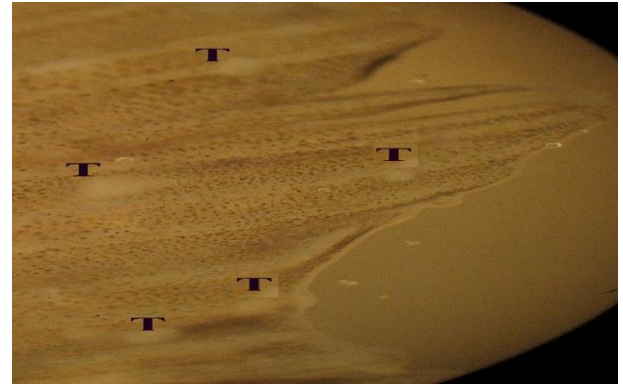
BULGULAR

İmmobilizasyon Sonuçları

İmmobilizasyon sonuçları Tablo 1'de sunuldu. Bu bulgulara göre canlı aşının kullanıldığı grubun serum örnekleri gerek ortalama, (67,4), gerekse birey bazında (1/128) en yüksek titreyi verdi. Canlı terontla aşılana balıklarda en yüksek immobilizasyon titresi bazı balıklarda 128'e kadar ulaşabilirken, sonike trofontlarla aşılana balıklarda en yüksek değer 64, diğer iki grupta ise 32 olarak gerçekleşti. Canlı teront ve sonike trofontla aşılana gruplarda meydana gelen immobilizasyon titre farkları kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında aralarındaki fark önemli bulundu (Mann Mann-Whitney U testi, $p < 0,05$). Adjuvantlı inaktif terontla aşılana grupta meydana gelen immobilizasyon titresiyle kontrol grubu arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulundu ($p > 0,05$). Canlı teront verilen gruptaki immobilizasyon titresi, sonike trofont verilen gruba göre 2 kattan daha yüksek çıkmasına rağmen aralarında oluşan bu titre farkı istatistik olarak önemsiz bulundu ($p > 0,05$) (Tablo 1)



Şekil 1. *I. multifiliis*'in trofontları
Figure 1. Trophonts of *I. multifiliis*



Şekil 2. Kaudal yüzgeçte sayılan trofontlar (T) (20x)
Figure 2. Trophonts that counted on caudal fin (20x)

Tablo 1. İmmünizasyondan 21 gün sonra gruplarda meydana gelen ortalama immobilizasyon titreleri (*Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak (Mann-Whitney U testi) önemli derecede fark bulunan gruplar ($p < 0,05$))

Table 1. Immobilization titers meaning of groups 21 days after immunization (*Statistical (Mann-Whitney U test) significant difference from control ($p < 0,05$))

Grup	Kullanılan Balık Sayısı	Ortalama İmmobilizasyon Titresi
Canlı Teront (2500/balık)	3x5	67,4*
Sonike Trofont (223/balık)	3x5	29,7*
Ad. İnaktif Teront (2500/balık)	3x5	11,4
Kontrol (PBS)	3x5	9,4

Tablo 2. Deneysel enfeksiyondan 4 gün sonra balıkların derisinde görülen ortalama trofont sayıları (\pm Standart sapma, *Kontrol grubuna göre, tek yönlü varyans analizi sonucunda istatistiksel olarak önemli derecede fark görülen gruplar ($p < 0,05$)).

Table 2. Number of trophonts meaning of groups 4 days after challenge on fish skin (\pm Standard Deviation, *Statistical (ANOVA) significant difference from control ($p < 0,05$))

Grup	Kullanılan Balık Sayısı	Deneysel Enfeksiyon Dozu	Deride Belirlenen Ortalama Trofont Sayısı
Canlı Teront (2500/balık)	3x5	2500 th/balık	21* ($\pm 12,89$)
Sonike Trofont (223/balık)	3x5	2500 th/balık	29,13* ($\pm 15,80$)
Ad. İnaktif Teront (2500/balık)	3x5	2500 th/balık	48,53($\pm 17,90$)
Kontrol (PBS)	3x5	2500 th/balık	54,07 ($\pm 19,44$)

Balıklara tutunan trofont sayılarının karşılaştırılması

Deneysel enfeksiyon sonrası, su sıcaklığı güneş ışınlarına bağlı değişmekle beraber, tanklar arası 0,5 °C'den yüksek fark gözlenmedi. Enfeksiyon boyunca tanklarda ölçülen en yüksek sıcaklık 26 °C, en düşük sıcaklık ise 23,5 °C olarak belirlendi. Terontların verilmesinden 3 gün sonra, parazitlerin trofont safhasına geçmeye başladığı gözlemlendi. Deneysel enfeksiyonu takiben 4. günde sayılan trofontlar **Tablo 2**'de gösterilmektedir

Tutunan trofont sayılarına göre immunitenin değerlendirilmesi ile immobilizasyon sonuçları arasında paralellik gözlenmiştir. Ancak canlı aşı ile aşılardan balıklarla, sonike trofontla aşılardan balıklar arasında, immobilizasyon titrelerine göre önemli fark gözlenmezken, tutunan trofontların değerlendirilmesinde, canlı aşı sonike trofonta göre daha etkili bulundu.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan araştırmada değişik yöntemlerle hazırlanan Ich aşılarının gökkuşağı alabalıklarında meydana getirdiği koruyuculuk; deneysel enfeksiyon sonrası balığın üzerine oluşan trofontların sayılması ve immobilizasyon antikor titresinin belirlenmesi yöntemleri ile belirlendi.

Balıkların üzerine tutunan trofont sayıları esas alınarak immunitenin değerlendirilmesinde, canlı terontun aşısının sonike trofont aşısından daha başarılı olduğu inaktif aşının ise etkili olmadığı tespit edildi.

Immobilizasyon testinde parazitin trofont evresi yerine enfektif olan teront formu kullanıldı. Şu ana kadar yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda serumdaki immobilizasyon titresinin mukustakinden yüksek olması, ayrıca serum immobilizasyon ve antikor titresinin humoral yanıtta daha etkin rol oynadığının tespit edilmesi (Xu vd., 2004; Maki ve Dickerson, 2003; Osman vd., 2009) nedeni ile bu araştırmada mukustan immobilizasyon testi tercih edilmedi.

Gökkuşağı alabalıklarında yapılan bu araştırmada, ortalama immobilizasyon titresini arttıkça, deriye tutunan trofont sayısında azalma gözlemlendi. Buchmann vd. (1999) tarafından yapılan deneysel çalışmada deriye tutunan trofont sayısı ile immobilizasyon arasında herhangi bir korelasyon gözlenmediğini bildirmiştir. Bu araştırmada sıcaklıkla inaktif serum örneklerinin hiçbirisi immobilizasyon meydana getirmeyenken, sıcaklıkla inaktif edilmeyen serum örneklerinde 1/256'ya kadar immobilizasyon gözlenmiştir. Ancak Buchmann vd. (1999) araştırmasında uygulanan immobilizasyon testinde her mikropak gözüne 5 adet teront konmuştur. Yapılan çalışmadaki immobilizasyon yöntemi ile Buchmann'ın uyguladığı yöntem arasında büyük benzerlikler görülmekle beraber, titre belirlemede kullanılan teront sayıları (50 adet) farklıdır.

Çalışmada, immün balıklarda ortalama immobilizasyon titresini yaklaşık 1/67 olarak gerçekleşti. Gökkuşağı alabalıklarında yapılan bir başka çalışmada, banyo yoluyla enfekte edilen immün balıklara yapılan immobilizasyon testinde, serumun sıcaklıkla inaktif edildiği durumda, I.

multifiliis'e karşı oluşan immobilizasyon titresinde önemli düşüşlerin gözlemlendiği saptanmıştır (Sigh ve Buchmann, 2001). Çalışmada belirtilen bu farklılığın ise, komplement faktör gibi nonspesifik immün sistem komponentlerinin eliminasyonu ile ilgili olabileceği öne sürülmüştür. Sigh ve Buchmann (2001) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ısı ile inaktif edilen serumda titre 1/32'ye kadar düşmüştür. Bilindiği gibi ısı ile inaktivasyon işlemi bazı nonspesifik faktörlerin (komplementler gibi) eliminasyonu amacı ile yapılmaktadır, bu çalışmada titrenin daha yüksek çıkması, komplement faktörler dışında ısı ile inaktif olmayan diğer faktörlerin (antikor, lektin, lizozimler gibi) daha yüksek olduğunu düşündürmektedir.

Gökkuşağı alabalıklarında yapılan çalışmada, deriye tutunan trofont sayısı azalma ile immobilizasyon titrelerindeki artış arasında korelasyon olduğu belirlendi. Nil tilapalarında yapılan immunizasyon çalışmasında, canlı teront ve sonike trofontlar İ.P. yolla verilmiştir (Xu vd., 2008). Immunizasyonu takiben balıklardan kan alınarak immobilizasyon antikor titreleri karşılaştırılmıştır. Antikor titreleri ile korunma arasında da pozitif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Immobilizasyon antikor titresinin immunizasyondan sonraki 25. günde en yüksek olduğu ve canlı terontla İ.P. yolla aşılardan balıklarda titrenin 1:1922'ye kadar çıktığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada immobilizasyon titrelerinin tilapyadaki kadar yüksek titrelere çıkmadığı görüldü. Daha önce alabalıklarda yapılan çalışmaların hiç birinde ısı ile inaktif edilen serumla yapılan immobilizasyon testlerinde, tilapya ve kanal yayın balıklarındaki titrelere yakın titrelere ulaşamamıştır, bu kadar yüksek titrelere ulaşamaması tür duyarlılığına bağlanabilir (Burkart vd., 1990; Buchmann vd., 1999; Dalgaard vd., 2002; Xu ve Klesius, 2002, 2003; Alishahi ve Buchmann, 2006; Xu vd., 2004, 2005, 2006, 2008).

Gökkuşağı alabalıklarında *I. multifiliis*'e karşı oluşan bağışıklığın su sıcaklığı ile bağlantısının araştırıldığı bir çalışmada, 20 °C de immunize edilen balıkların 12 °C immunize edilen balıklara göre immobilizasyon titresinin daha yüksek olduğunu, en yüksek immobilizasyon titresinin ise canlı terontlarla aşılardan balıklarda bulunduğu bildirilmiştir (Alishahi ve Buchmann, 2006). Yaptığımız çalışmada elde edilen veriler, yaptıkları çalışma ile paralellik göstermiş olup, canlı terontla immunize edilen grupta immobilizasyon titreleri, en yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar, en iyi immunizasyon gösteren grupta yer alan balıklardaki titre ortalamasını 46 olarak bulmuştur, bu araştırmada ise elde edilen ortalama titre 67,4'dir. Alishahi ve Buchmann'ın (2006) çalışmasında kontrol grubunun ortalama titresinin 8,5'a kadar çıktığı bildirilirken, yapılan çalışmada bu titre ortalama 9,42 olarak gerçekleşti. Gökkuşağı alabalıklarında doğuştan bağışıklığın yanı sıra, sonradan kazanılan bağışıklığında popülasyonlar arası farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Gleeson vd., 2000). Alishahi ve Buchmann'nin (2006) yapmış olduğu çalışmada da bu çalışmada olduğu gibi immobilizasyon titresini ile deriye tutunan trofont sayısının azalması arasında paralellik olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada sonike trofont aşısının gökkuşağı alabalığında antikor titresini yükselttiği ve yükselen bu titrenin deriye tutunan trofont sayısındaki azalma ile paralel seyrettiği belirlendi. Gökkuşağı alabalığında yapılan bu çalışmada immobilizasyon antikor titresini yaklaşık 1/29 olarak belirlendi. Kahverengi alabalıkta (*S. trutta*) sonike *I. multifiliis* trofont aşısının kontrol grubuna göre daha yüksek immobilizasyon titresini sağladığı bildirilmiştir (Sigh ve Buchmann, 2002). Gökkuşağı alabalıklarında yapılan çalışmada sonike trofont kullanılarak elde edilen bulgular, kahverengi alabalıkla yapılan çalışma sonuçlarına benzerlik göstermektedir. İmmün kahverengi alabalıklarda yapılan çalışmada immobilizasyon titresinin 1/256 olduğu belirlenmiştir (Sigh ve Buchmann 2002). Kahverengi alabalıkta immobilizasyon titresinin gökkuşağı alabalığına göre daha yüksek çıkması, gökkuşağı alabalıklarının (*O.mykiss*) kahverengi alabalıklara (*Salmo trutta*) göre hastalığa karşı daha duyarlı olması ile açıklanabilir (Butcher, 1947; Gleeson vd., 2000).

Dalgaard vd. (2002) gökkuşağı alabalığı yavrularını 10 ve 20 trofont/g CA sonike trofont aşısıyla IP yolla aşılamıştır. Kullanılan aşının toplam protein miktarı 12,70 mg/g CA olarak bildirilmiştir. 11,6 °C su sıcaklığında balık başına 250 teront verilerek yapılan deneysel enfeksiyonda, aşı balıklarda penetre olan trofont sayısının (ortalama 1 adet), kontrol grubuna (ortalama 3,5 adet) karşın anlamlı derecede düşük çıktığı bildirilmiş, ancak balıkların yaşama oranı ile ilgili herhangi bilgi verilmemiştir. Yapılan bu çalışmada ise 20 trofont/g CA balık ultrasonike trofont aşısı IP yolla balıklara inokule edildi. Deneysel enfeksiyon sonucunda aşı grubunda penetre olan ortalama parazit sayısı ortalama 29,13 adet, aşısız kontrol grubunda ise 54,07 adet olarak belirlendi gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0,05$). Dalgaard vd. (2002) yapmış olduğu çalışmada sonike trofont antijenin hazırlanmasında balık başı 20 trofont/g CA dozunun 12,70 mg protein/gCA dozuna denk geldiği bildirilmiş ise de bu çalışmada 20 trofont/g CA dozunun protein içeriği 8,22 mg protein/gCA olarak bulundu. İki eşit sayıda trofont içeren antijen arasında protein miktarında gözlenen bu farklılık, trofontların elde edildiği sıcaklıkların farklı olması ile açıklanabilir. Dalgaard vd. (2002) yaptığı çalışmada, trofontların elde edildiği sıcaklık belirtilmemekle birlikte deneysel enfeksiyon yapılırken elde edilen terontların 11,6 °C de üretiliği bildirilmiştir. Bu çalışmada ise antijen olarak kullanılan trofontlar 22-26 °C de elde edildi. Trofontların çaplarının 0,5-1,5 mm olduğu ve trofont büyüklüklerinin sıcaklığa bağlı olduğu bildirilmiştir (Lom ve Dykova, 1992, Dickerson ve Dave, 1995).

Alishahi ve Buchmann'ın (2006) araştırmasında 20 °C su sıcaklığında canlı terontla aşılanan 10 gramlık alabalıkların 12 °C'de aşılananlara göre daha yüksek immunité gösterdiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada balık başı 800 teront İ.P. yolla verilmiş ve 28 gün sonra 2000 teront/balık dozunda deneysel enfeksiyon yapılmıştır. İmmunitenin değerlendirilmesinde deneysel enfeksiyon sonrası deriye tutunan trofont sayısı ve immuniteyi takiben serum örneklerinde meydana gelen immobilizan antikor titrelerindeki artış esas

alınmıştır. Araştırmacılar 20 °C immunize balıklarda balık başına ortalama 1,02 trofontun tutunduğu bildirilirken kontrol grubunda ise 66,9 trofont olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise immunize balıklarda ortalama 21 trofont, kontrol grubunda ise ortalama 54,07 trofont bulundu. Ancak bu çalışmada, Alishahi ve Buchmann'ın (2006) çalışmasından farklı olarak, balıklar daha yüksek dozda canlı terontla aşılandıktan sonra, 17 (± 2) °C de muhafaza edildi ve 2500 th/balık dozunda parazit kullanılarak enfekte edildi. İki çalışmada özellikle immün balıklarda tutunan trofont sayısında meydana gelen fark, immün balıkların bulunduğu su sıcaklıklarının farklı olmasının yanısıra, deneysel enfeksiyon dozlarının farklı olması, kullanılan parazitlerin (patojenite) ve konakçıların (popülasyonlar arası immunité yeteneğinin) farklı olması gibi faktörlerle açıklanabilir.

Jorgensen vd. (2008), gökkuşağı alabalıklarının 18 °C su sıcaklığında 600 teront/balık dozunda canlı terontla aşılanmışlardır. Aşılamadan sonraki 32. günde 1750 teront/balık ile yapılan deneysel enfeksiyonda aşı balıkta deriye tutunan ortalama trofont sayısının 4 olduğunu, kontrol grubundaki balıklarda 18,7 olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise canlı aşı ile kontrol grubu arasındaki fark önemli çıkmakla birlikte her iki grupta da daha fazla sayıda trofont gözlemlendi. İki çalışma arasında deneysel enfeksiyon dozları ve su sıcaklıkları açısından önemli farklar vardır. Bu çalışmada su sıcaklığı 23°C ve deneysel enfeksiyon dozu 2500 teront/balık olarak belirlendi. Bundan dolayı immunize edilen balıklarda deneysel enfeksiyon sonrası daha fazla trofont belirlenmesi beklenen bir durumdur.

Japon balıklarında yapılan çalışmada dondurulup çözülerek İ.P. olarak verilen terontların immunité sağladığı bildirilmiştir (Parker, 1965, Areerat, 1974; Dickerson ve Dawe, 1995). Kanal yayın balıkların inaktif trofontların İ.P. yolla verilmesi ile korunma sağlandığı bildirilmiştir (Beckert, 1975; Dickerson ve Dawe, 1995). Sonraları yapılan çalışmaların çoğunda sonike trofontun bağışıklık sistemini uyardığı bildirilirken inaktif teront aşıları etkisiz olduğu bildirilmiştir (Burkart vd., 1990; Dickerson ve Dawe, 1995; Dickerson ve Clark, 1996; Dalgaard vd., 2002; Xu vd., 2004). Başka bir çalışmada, kanal yayın balıklarına inaktif terontun Freund'un tam (complete) adjuvantı ve Freund'un tam olmayan (incomplete) adjuvantı ile yapılan immunizasyon denemelerinde korunma sağlanmadığı bildirilmiştir (Wang ve Dickerson, 2002). Bu çalışmadaki sonuçlar Parker (1965) ve Areerat (1974)'un çalışmasından farklı, Wang ve Dickerson (2002)'un araştırması ile paraleldir. Tam Freund adjuvantı ve ya tam olmayan Freund adjuvantı balıklara İ.P. yolla verildiğinde adjuvantın yapısındaki mineral yağlar sebebiyle peritonda adezyon ve et kalitesinde bozulmalara yol açmaktadır (Vagsholm ve Djupvik, 1999). Böyle bir adjuvant başarılı olsa bile, araştırma sonuçlarının uygulanabilirliği olmayacaktır. Alabalıklarda yapılan bu çalışmada bu nedenle bitkisel yağlarla balık için özel olarak hazırlanmış ve Freund adjuvantındaki gibi olumsuzluklara yol açmadığı bildirilen adjuvant (Seppic, France) denendi. Ayrıca, inaktif terontların

immunojen etkisini kaybetmesinde inaktivasyon yönteminin rol oynayabileceği göz önüne alınarak terontlar daha önce denenmemiş bir yöntemle inaktive edildi. Ancak bu yöntemlerle hazırlanan antijen herhangi immune meydana getirmedi.

Yapılan çalışmada, deneysel enfeksiyonu takiben, sonike trofontla aşılana balıklara, kontrol grubundakilere göre balık başı yaklaşık 25 adet (% 46) daha az trofontun tutunduğu gözlemlendi. Kahverengi alabalıkta (*S. trutta*) 12 °C su sıcaklığında yapılan immunizasyon çalışmasında, 40 trofont/gCA dozunda sonike trofont ile aşılana grubun, kontrol grubuna göre daha yüksek immunizasyon gösterdiği bildirilmiştir (Sigh ve Buchmann 2002). Ancak araştırmacılar yaptıkları çalışmada aktif terontla immunizasyon yapmayı denememişlerdir. Deneysel enfeksiyon sonrası, sonike trofontla aşılana grupta, deriye tutunan trofont sayısı ortalama olarak 6.5 adet azalmıştır. Araştırmacılar, deneysel enfeksiyonda kullanılan teront dozunu belirtilmemiş ancak tüm balıkların enfektif teront içeren aynı tanka konulduğu bildirmiştir. Bu şekilde yapılan deneysel enfeksiyonda, teront dozu ile enfeksiyon şiddeti arasında pozitif korelasyon görülmesi nedeni ile deneysel enfeksiyon standart dizasyonu açısından probleme neden olur.

Japon balıklarında (*Carassius auratus*) 24-27 °C su sıcaklığında yapılan immunizasyon denemesinde, canlı teront, sonike edilmiş ve sonike edilmemiş trofont İ.P. yolla ve banyo yoluyla uygulanmış, immunizasyondan sonraki 2 ve 3. haftalarda kan ve mukus örnekleri alınarak immobilizasyon testi yapılmış, deneysel enfeksiyon sonrası deriye tutunan trofont sayıları tespit edilerek değerlendirilmiştir. Deneysel enfeksiyon sonrası alınan tüm serum ve mukus örneklerinde 3. haftadaki titreler 2. haftadakilere göre daha yüksek olarak tespit edilmiştir. En yüksek titre İ.P. yolla canlı terontla aşılana grupta belirlenmiştir. Immobilizasyon titrelerinin yüksekliği ile deriye tutunan trofont sayısı arasında ters orantı olduğu bildirilmiştir (Osman vd., 2009). Japon balıklarında yapılan çalışmada kontrol grubunda immobilizasyon titresi 1/5'e kadar çıkarken, gökkuşuğu alabalıklarında yapılan bu çalışmada kontrol grubundaki balıklarda ortalama titre 1/9,42 olarak tespit edildi. İmmunize edilen japon balıklarında titrenin 1/654'e kadar çıktığı bildirilirken, gökkuşuğu alabalıklarında yapılan bu çalışmada, aynı antijen (canlı teront) kullanılmasına rağmen immobilizasyon titresi 1/128'in (ortalama 1/67,4) üzerine çıkmadı. Oluşan farkın, her ne kadar japon balıklarında kullanılan antijenin yoğunluğunun yüksek olması ya da serotipler arası oluşan immune farkı ile açıklanması mümkünse de şimdiye kadar gökkuşuğu alabalığında yapılan çalışmalarda, ısı ile inaktive edilen serumlarda bu çalışmada belirlenen immobilizasyon antikor titresinden daha yüksek titre bulunamamıştır. Araştırmacılar, balıklara immunizasyonu takiben 21. günde, 15000th/balık dozunda parazit kullanılarak deneysel enfeksiyon yapılmıştır. Deneysel enfeksiyondan 3 gün sonra balığın derisindeki trofontlar sayılmıştır. Osman vd. (2009), yaptıkları immunizasyon denemesinde antijen olarak, kanal yayın balıklarında kullanılan dozda (20000th/balık) teront kullanmışlardır ki bu doza göre kullanılan antijenin her

mikrolitresinde 200 aktif teront bulunması gerekmektedir. Bu çalışmada, yoğun santrifüj işlemleri uygulanmasına rağmen bu yoğunlukta teront elde edilemedi. Osman vd. (2009) japon balıklarında denedikleri antijenlerin, etkiliden etkisize doğru sırasıyla, canlı teront (İ.P.), canlı teront (banyo), sonike trofont (İ.P.), kontrol olarak sıralandığı bildirilmiştir. Banyo yoluyla canlı teront aşısının kontaminasyon riskinin çok yüksek olmasından dolayı ve kullanımının pratik olmaması nedeni ile yapılan çalışmada bu antijen denenmedi. Osman vd. (2009)' un çalışmasında kullanılan antijenlerle, bu çalışmada kullanılanlar arasında, immun cevap kriteri olarak, immobilizasyon ve deneysel enfeksiyon sonrası balığın üzerine görülebilir trofont sayısı belirlendiğinde, paralel sonuçlar elde edildi. Japon balığı, tilapya, sazan, kanal yayın balığı gibi birçok türde (Xu vd., 2004; Hines ve Spira, 1974; Xu vd., 2008 Osman vd., 2009) *I. multifiliis*'e karşı tam korunma sağlanmış ancak gökkuşuğu alabalığında yapılan denemelerde deriye tutunan trofont sayısında azalma görülmekle birlikte balıkların mortalite oranları karşılaştırılmamıştır (Dalgaard vd., 2002; Sigh ve Buchmann, 2002; Alishahi ve Buchmann, 2006; Jorgensen vd., 2008). Bunun nedeni balıkların tamamının deneysel enfeksiyon sonrası ölmesi olabilir. Nitekim bu çalışmada dahil olmak üzere yapılan bazı çalışmalarda, deneysel enfeksiyon sonrası immun gökkuşuğu alabalıklarının tamamı ölmüştür (Jorgensen vd., 2008).

Bu çalışmada sonike trofont antijen miktarının standart dizasyonunda protein/gCA biriminin kullanılmasının trofont/gCA kullanılmasından daha başarılı bir yöntem olduğu belirlendi. Yapılan çalışmada her ne kadar immobilizasyon titresindeki artış ile deriye tutunan trofont sayısında azalma arasında paralellik gözlemlense de, immobilizasyon titresi ile immunitenin paralel olmadığı durumlar da bildirilmiştir (Buchmann vd., 1999; Houghton ve Matthews, 1993). Bu bilgiler ışığında, immunitenin değerlendirilmesinde yeterli korunma bulunmadığında, gerek istatistik olarak gerekse biyolojik olarak, tutunan trofont sayısına göre değerlendirmenin yapılması, immobilizasyon titresine göre yapılmasından daha yararlı olacaktır.

Bu çalışmada, gökkuşuğu alabalıklarında *I. multifiliis*'e karşı denenen aşıardan en iyi sonucu canlı teront aşısı verdi. Sonike trofont aşısında da kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı kabul edilen ($p < 0,05$) immun cevap meydana geldi. İnaktif adjuvanlı teront aşısı ise immun cevap oluşturmada etkili olmadı ($p > 0,05$). Etkili antijenlerin kullanılması ile her ne kadar balıklarda kısmi bir korunma gözlemlense de oluşan bu immun yanıt *I. multifiliis*'den tam olarak korunmada yeterli olmadı. Canlı aşı ile inaktif aşı arasındaki bu farklılığın immun sistemle ilgili genlerin canlı parazitteki bileşenlerle (Membran proteinleri, sekret, eksret vb.) yüksek derecede aktive olduğu veya bu bileşenlerin öldürülen parazitte ilgili işlemler sırasında immuniteden sorumlu epitoplara (dondurma, sillerin izole edilmesi veya formalinle fiske etme) kaybına bağlı olduğu sanılmaktadır. Terontun inaktivasyonu ile kaybolan immunojenite faktörünün belirlenerek çoğaltılması ile pratikte kullanılacak bir aşı yapılması mümkün olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Alishahi, M., & Buchmann, K. (2006). Temperature-dependent protection against *Ichthyophthirius multifiliis* following immunisation of rainbow trout using live theronts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72: 269-273. doi: [10.3354/dao072269](https://doi.org/10.3354/dao072269)
- Areerat, S. (1974). The immune response of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to *Ichthyophthirius multifiliis*. Master's Thesis, Kansas State University, Kansas, USA, 47 p.
- Beckert, H. (1975). Observation on the biology of *Ichthyophthirius multifiliis*, its susceptibility to exhoxyquin, and some immunological responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus* to this parasite. Ph.D Thesis, Dissertation. University of Southwestern Louisiana, Louisiana, USA, 187p.
- Buchmann, K., Lindenstrom, T., & Sigh, J. (1999). Partial cross protection against *Ichthyophthirius multifiliis* in *Gyrodactylus derjavini* immunized rainbow trout. *Journal of Helminthology*, 73: 189-195. doi: [10.1017/S0022149X9900030X](https://doi.org/10.1017/S0022149X9900030X)
- Burkart, M.A., Clark, T.G., & Dickerson, H.W. (1990). Immunization of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet): killed versus live vaccines. *Journal of Fish Diseases*, 13: 401-410. doi: [10.1111/j.1365-2761.1990.tb00799.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1990.tb00799.x)
- Butcher, A.D. (1947). Ichthyophthiriasis in Australian trout hatchery. *Progressive Fish Culturist* 9, 21-26. doi: [10.1577/1548-8640\(1947\)9\[21:IIATH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1947)9[21:IIATH]2.0.CO;2)
- Dalgaard, M., Buchmann, K., & Li, A. (2002). Immunization of rainbow trout fry with *Ichthyophthirius multifiliis* sonicate: protection of host and immunological changes. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(5): 288-296.
- Dickerson, H.W., & Clark, T.G. (1996). Immune response of fishes to ciliates. *Annual Review of Fish Diseases*, 6: 107-120. doi: [10.1016/S0959-8030\(96\)90008-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8030(96)90008-3)
- Dickerson, H.W., & Dawe, D.L. (1995). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* in Woo, P.T.K. Fish Disease and Disorders, Vol. 1, Cab International, Cambridge, 789 p.
- FAO (2014), <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/default.htm> (10.10.2016)
- Gleeson, D.J., Mccallum, H.I., & Owens, I.P. (2000). Differences in initial and acquired resistance to *Ichthyophthirius multifiliis* between populations of rainbowfish. *Journal of Fish Biology* 57: 466-475. doi: [10.1111/j.1095-8649.2000.tb02185.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02185.x)
- Hines R.S. & Spira D.T. (1974). Ichthyophthiriasis in mirror carp *Cyprinus carpio* (L.). III. Pathology. *Journal of Fish Biology*, 6: 189-196. doi: [10.1111/j.1095-8649.1974.tb04536.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1974.tb04536.x)
- Houghton, G., & Matthews, R.A. (1993). *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet): survival within immune juvenile carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish and Shellfish Immunology*, 3: 157-166. doi: [10.1006/fsim.1993.1016](https://doi.org/10.1006/fsim.1993.1016)
- Jorgensen, L.V.G., Nemli, E., Heinecke, R.D., Raida, M.K., & Buchmann, K. (2008). Immune-relevant genes expressed in rainbow trout following immunisation with a live vaccine against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 80: 189-197. doi: [10.3354/dao01935](https://doi.org/10.3354/dao01935)
- Lom, J., & Dykova, I. (1992). Protozoan parasites of fishes. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 315 p.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Osman, H.A.M., Monier, M.M., Abd El Ghany, O.A., Ibrahim, T.G., & Ismail, M.M. (2009). Protection of goldfish (*Carassius auratus*) against *Ichthyophthirius multifiliis* by immunization with live theronts, trophonts and sonicated trophonts. *Global Veterineria*, 3(4): 329-334.
- Maki, J.L. & Dickerson, H.W. (2003). Systemic and cutaneous mucus antibody responses of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10: 876-881. doi: [10.1128/cdli.10.5.876-881.2003](https://doi.org/10.1128/cdli.10.5.876-881.2003)
- Parker, J.C., (1965). Studies on the natural history of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 an ectoparasitic ciliate of fish. PhD thesis, University of Maryland, College Park, Maryland, USA, 83p.
- Post, G. (1987). Textbook of Fish Health, T.F.H. Publication, U.S.A, 288 p.
- Shinn, A.P., Wootten, R., & Sommerville, C., (2003). Alternative compounds for the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* infecting rainbow trout. *Trout News*, 35: 38-41.
- Sigh, J., & Buchmann, K. (2001). Comparison of immobilization assays and enzyme-linked immunosorbent assays for detection of rainbow trout antibody-titres against *Ichthyophthirius multifiliis*. Fouquet, 1876, *Journal of Fish Diseases*, 24: 49-51. doi: [10.1046/j.1365-2761.2001.00258.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00258.x)
- Sigh, J., & Buchmann, K. (2002). Comparative analysis of cross-reactivity between *Ichthyophthirius* and *Tetrahymena*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22: 37-44.
- TUIK (2015). <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21720> (05.01.2017)
- Vagsholm, I., & Djupvik, H.O. (1999). Risk factors for abdominal adhesions in atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 22, 1, 53-58. doi: [10.1046/j.1365-2761.1999.00137.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00137.x)
- Wang, X., & Dickerson, H.W. (2002). Surface Immobilization Antigen of the Parasitic Ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* Elicits Protective Immunity in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9: 176-181. doi: [10.1128/cdli.9.1.176-181.2002](https://doi.org/10.1128/cdli.9.1.176-181.2002)
- Xu, D.H., & Klesius P.H. (2002). Antibody mediated immune response against *Ichthyophthirius multifiliis* using excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius*. *Journal of Fish Diseases*, 25: 299-306. doi: [10.1046/j.1365-2761.2002.00377.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00377.x)
- Xu, D.H., & Klesius P.H. (2003). Protective effect of cutaneous antibody produced by channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet on cohabited non-immune catfish. *Journal of Fish Diseases*, 26: 287-291. doi: [10.1046/j.1365-2761.2003.00463.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00463.x)
- Xu, D.H., Klesius, P.H., & Shelby, R.A. (2004). Immune responses and host protection of channelcatfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against *Ichthyophthirius multifiliis* after immunization with live theronts and sonicated trophonts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27: 135-141.
- Xu, D.H., Klesius, P.H., & Shoemaker, C.A. (2005). Cutaneous antibodies from channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), immune to *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) may induce apoptosis of Ich theronts. *Journal of Fish Diseases*, 28: 213-220. doi: [10.1111/j.1365-2761.2005.00622.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00622.x)
- Xu, D.H., Klesius P.H., & Panangala, V.S. (2006). Induced cross-protection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against different immobilization serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Fish Diseases*, 29: 131-138. doi: [10.1111/j.1365-2761.2006.00700.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00700.x)
- Xu, D.H., Klesius, P.H. & Shoemaker, C.A. (2008). Protective immunity of Nile tilapia against *Ichthyophthirius multifiliis* post-immunization with live theronts and sonicated trophonts. *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 124-127. doi: [10.1016/j.fsi.2008.03.012](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.012)