

Bakteriyel Balık Patojenlerinin Tanımlanmasında Kullanılan Serolojik Yöntemler

Şükrü ÖNALAN^{1*} Mahmut ÇAĞIRGAN² Muhammed ARABACI¹ Haşmet Çağırğan²

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 65080, Van, Türkiye
²Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 35040, İzmir, Türkiye

Öz: Balık hastalıklarında, bakteri kaynaklı enfeksiyonlar önemli bir yer tutmaktadır. Bakteriyel balık patojenlerini tanımlamak için fenotipik, genotipik ve serotipik yöntemler kullanılabilir. Fakat her bir yöntem için kullanılan farklı metodların iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, çeşitli balık hastalıklarının oluşumunda önemli bir role sahip bakteriyel balık patojenlerinin serotipik olarak tanımlanabilmesi için uygulanan serolojik yöntemler, balık patojenlerine karşı mücadelede bu yöntemlerin kullanımı ve önemi hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; kalitatif yöntemlerden presipitasyon, flokülasyon, aglütinasyon ve komplemanfiksasyon testlerine değinilmiştir. Kantitatif yöntemlerden ise turbidimetrik-nefelometrik ölçümler ile immünokimyasal ölçümlerden bahsedilmiştir.

Anahtar kelimeler: Balık hastalıkları, patojen bakteriler, serolojik yöntemler

Serological Methods Used for Classification of Bacterial Fish Pathogens

Abstract: In fish diseases, bacterial originated disease agents are important. To identify of bacterial fish pathogens can be used phenotypic, genotypic and serotypic methods. However, the different methods used for each method need to be well known. In this study, it is aimed at giving information about the serological methods that are required to be classified as the serotypical identification of bacterial fish pathogens which have an important role in occurrence of various fish diseases, using of these methods in struggling against fish pathogens and their importance. For this purpose; qualitative methods such as precipitation, flocculation, agglutination and compliment fixation are explained. In the quantitative methods are mentioned turbidimetric-nephelometric measurements and immunochemical measurements.

Keywords: Fish diseases, pathogen bacteria, serological methods

GİRİŞ

Balık yetiştiriciliği, sağlıklı bir besin kaynağı, istihdam ve önemli bir ihracat ürünü durumu olması nedeniyle, büyük kazanç geliri olan önemli bir sektördür. Türkiye bulunduğu iklim kuşağı ve coğrafi yapısı nedeniyle denizlerde ve iç sularda birçok su ürününün yetiştirilmesi açısından uygun olanaklara sahiptir (Atay ve ark., 2000).

Balık hastalıkları, yetiştiricilikte önemli bir sorun oluşturmaktadır. Çünkü balıklar, havuz ve kafes gibi kapalı alanlarda yetiştirilmekte ve birim alandaki verimliliği yükseltmek için stok yoğunlukları giderek arttırılmaktadır. Bu durum, balıklar için uygun olmayan yetiştiricilik koşullarının oluşmasına ve buna bağlı olarak da enfeksiyonlara karşı hassasiyetin artmasına neden olmaktadır (Sakai, 1999).

Balıklarda bağışıklık temel olarak omurgalıların ile aynı yapıdadır. İmmün yanıtta başlıca fark tüm fizyolojik sistemlerde olduğu gibi bağışıklık sisteminin sıcaklığa bağlı değişken yapıda olmasından kaynaklanmaktadır. Balıklarda bağışıklık sistemi temel olarak doğal ve kazanılmış bağışıklık olmak üzere iki ana alt grupta sınıflandırılmaktadır (Bly ve ark., 1997).

Yumurtadan yeni çıkan larva balıkların lenfosit ve antikor üretim kapasiteleri sınırlı olmakta, dolayısıyla çevresel antijenlere ve hastalıklara karşı dirençleri de düşük olmaktadır (Tatner, 1986).

Antijen-antikor arasındaki ilişkiler, organizmaları enfeksiyonlara karşı koruyucu özellik görevini üstlenmelerinin yanı sıra, bakterilerin in vitro ortamda tanımlanmasında da yardımcı olmaktadır. Antijen-antikor bağlanması ile ilgili in vitro yapılan deneylerde, antikorlar içinde buldukları serumlarla kullanıldıkları için bu konudaki reaksiyonlar serolojik olaylar olarak bilinmektedir. Serolojik olaylar ile ilgilenen bilim dalı ise seroloji olarak isimlendirilmektedir (Erkan ve ark., 2011).

Bir antijen molekülünde aynı veya farklı yapıda çok sayıda epitop bulunabilir. Epitop sayısı molekülün büyüklüğü ve karmaşıklığı ile yakından ilgilidir. Bu nedenle, bir antijen molekülü birden fazla sayıda özgüllük gösterebilmekte ve farklı yapıdaki her epitop kendine özgül antikorlarla ayrı ayrı birleşebilmektedir. Antijen yüzeyindeki epitop ile özgül antikorun bağlanma yeri arasındaki ilişki anahtar ile kilit arasındaki uyuma benzerdir ve bu iki molekül arasındaki birleşmenin düzeyi moleküllerin özelliklerine bağlı olmaktadır. Uyum ve çekim gücü yüksek ise moleküller daha hızlı ve sağlam bir biçimde birleşmekte ve çözümleri ise çok yavaş olmaktadır (Erkan, 1992).

Günümüzde serolojik yöntemler viral, bakteriyel, fungal ve parazit enfeksiyonlarının tanısı amacıyla kullanılmalarının yanı sıra; immünizasyon, immünrekonstitüsyon ve immünsüpresyon sonrası immün kompetansın değerlendirilmesi, immün sistem yetmezliklerinin ya da hiperaktivitesinin belirlenmesi, malignansilerin tanısı, transplantasyon öncesi MHC (Major histocompatibility complex) tespiti ve immünolojik hastalıkların tedavi ve progresyonunun izlenmesi gibi alanlarda

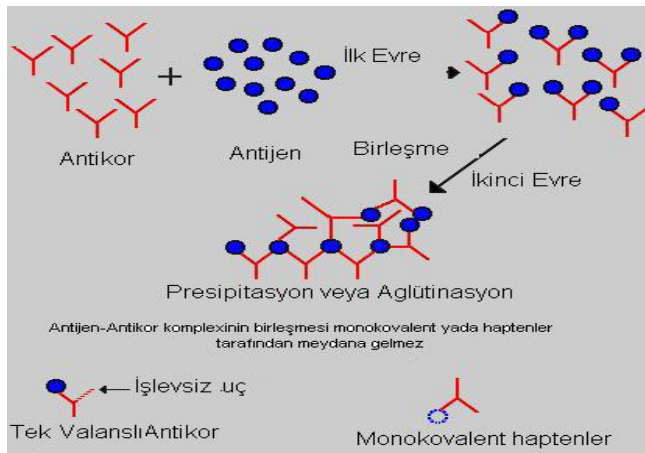
kullanılmaktadır. Serolojik testlerde, mekanizmalarına (aglutinasyon, presipitasyon), uygulama şekline (otomatize, manuel), hızlarına (birkaç saatten birkaç güne kadar) ve kullanım amaçlarına göre (antikor tipi tespiti, kantitasyon vb.) çok sayıda yöntem mevcuttur (Kılıç, 2012).

UYGULAMA METODOLOJİSİ

Serolojik yöntemler ile bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan bazı immünolojik teknikler, kalitatif ve kantitatif yöntemler olmak üzere başlıca iki şekilde yapılmaktadır. Kalitatif yöntemler; Presipitasyon testleri, Flokülasyon testleri, Aglutinasyon testleri ve Komplemanfiksasyon testidir. Kantitatif yöntemler ise; Türbidimetrik-nefelometrik ölçümler ve İşaretlenmiş immünokimyasal ölçümlerdir.

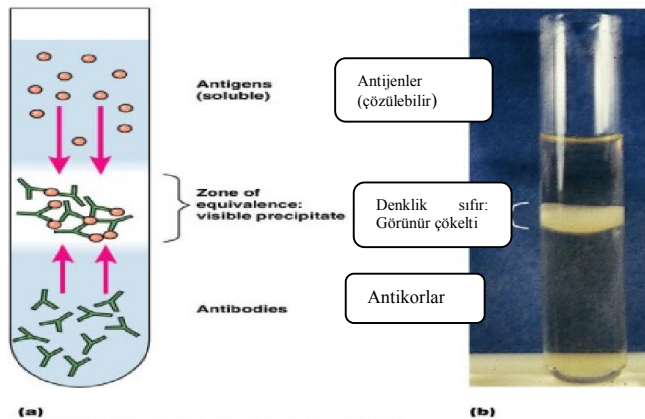
1. Kalitatif Yöntemler

1.1. Presipitasyon Testi: Presipitasyondan hem enfeksiyon hastalıklarında tanı koymak hem de mikroorganizmaların identifikasyonu amacıyla yararlanılır (Çağırın ve ark., 1997). Reaksiyon sonucu kompleks (presipitat) gözle görülür. Reaksiyonda optimum antijen (Ag) ve antikor (Ab) miktarı önemlidir. Ayrıca pH, elektrolit ve ısı da önemli yer teşkil eder (Kocazeybek, 2012). Bu test solüsyonda ve tüpte yapıldığında presipitasyon testi, agar jelde yapıldığında jel presipitasyon testi olarak adlandırılır. Antikorlar iki valanslı, antijenler ise çok değerlikli moleküllerdir (Erkan ve ark., 2011).



Şekil 1. Antijen-antikor tepkimesi (Altınışık, 2004).

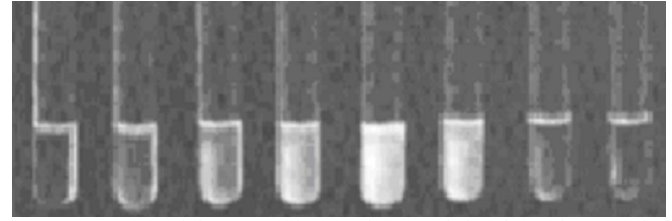
1.1.1. Tüpte Halka (Ring) Testi: Sıvı ortamda yapılan presipitasyon formudur. Tüpe konulan sabit miktardaki antikor solüsyonu üzerine bir tabaka oluşturacak şekilde antijen eklenir. Temas yerinde halka şeklinde presipitasyon pozitif olarak kabul edilmektedir (Afonso ve ark., 2003).



Şekil 2. Tüpte halka testi sonucunda gözlenen reaksiyon (Kılıç, 2012).

1.1.2. Tüpte Sulandırma Testi: Optimal antijen-antikor oranını araştırmak için tüpte yapılan en eski yöntemdir. Bir sıra tüpe konulan belli miktarlardaki antikorun üzerine değişen miktarlarda suda çözünür antijen eklenmesi yapılır.

İlk tüplerde antikor fazlalığı, son tüpte ise antijen fazlalığı vardır. Bulanıklık ve çökeltinin en yüksek düzeyde olduğu tüpte antijen-antikor oranı birbirine eşittir ve bu durum reaksiyona giren moleküllerin titre ve konsantrasyonunu belirlemeye yardımcı olduğu bildirilmektedir (Erkan ve ark., 2011).



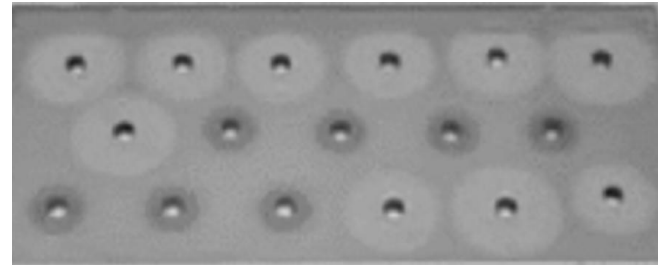
Şekil 3. Tüpte presipitasyon testi ve gözlenen reaksiyonlar (Erkan ve ark., 2011).

1.1.3. İmmünodifüzyon (Jelde Presipitasyon) Testleri:

Presipitasyon reaksiyonları antijen ve antikor moleküllerinin birbirine doğru yayılabildiği jel veya yarı katı (Agar Jel) ortamlarda yapılmaktadır. Böyle bir ortamda birbirine doğru yayılan antijen ve antikorun optimal oranda buldukları bölgelerde karşılaştıklarında bir presipitasyon çizgisi veya bantı oluşturarak çökelme bildirilmektedir. Jelde presipitasyon işlemi çeşitli şekillerde yapılabildiği rapor edilmiştir (Shepard, 1972).

1.1.3.1. Radyal Difüzyon (Tek Yönlü Difüzyon) Testi:

Antikor içeren antiserumlarla homojen olarak karıştırılmakta ve karışım bir tabaka halinde lam, plak veya petri kabına konulmaktadır. Katılaşmadan sonra, agar üzerinde eşit aralıklarla ve aynı çaplara sahip olan küçük çukurlar açılarak bunların her birine farklı antijen veya bir antijenin çeşitli seyreltileri ilave edilmektedir. Daha sonra; lam, plak veya petri kabı 37 °C'de nemli bir ortamda muhafaza edilmektedir. Süre sonunda, antijen çukurlardan agarın içerisine doğru yayılmakta ve çukurların çevresinde beyaz renkli halka şeklinde bir presipat oluşmaktadır. Çukurların çevresinde daire şeklinde beyaz halkanın oluşması pozitif olarak değerlendirilmektedir (Hampton ve ark., 1990).



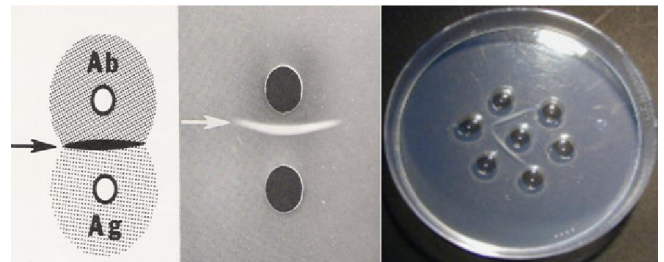
Şekil 4. Radyal difüzyon testi (Shepard, 1972).

1.1.3.2. Çift Yönlü Difüzyon (Yayıma) Testi:

Bu yöntemde hem antijen hem de antikor molekülleri jel içinde yayılarak (özgüllük varsa) optimum konsantrasyonlarda karşılaştıkları yerde presipitasyon bantı oluştururlar (Kılıç, 2012).

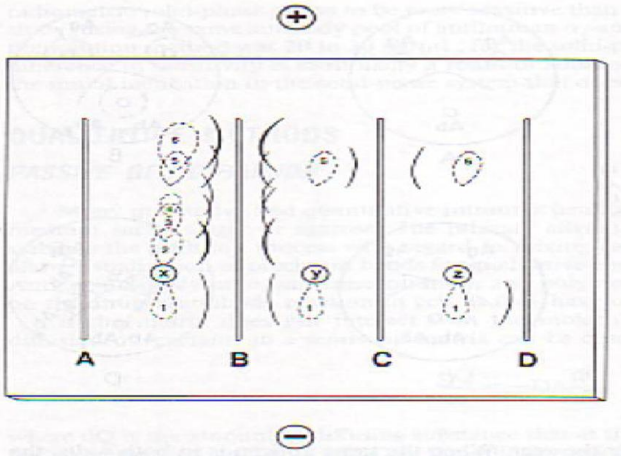
Çözünür antijen ve antikor molekülleri agar plağı üzerinde açılmış karşı çukurlara konulmaktadır. Antijen ve antikor bu çukurlardan birbirine doğru agar içerisinde yayılırlar ve optimal konsantrasyonlarda karşılaştıklarında bir presipitasyon bantı veya çizgisi oluşmaktadır. Bu testle aynı serumla karşı teste tabi tutulan birçok antijenin birbirine yakınlığı da ortaya konulmaktadır. Plağa dökülmüş agarın ortasında bir ve çevresinde birkaç çukur açılır; ortadaki çukura antiserum ve çevredeki çukurlara farklı antijenlerin konulduğu rapor edilmiştir (Shepard, 1972).

Petri kaplarına dökülen agar (% 0.7-1.5) üzerinde bir kalıp yardımıyla ortada bir adet ve bunun çevresinde ise 0,5-10 mm uzaklıklarda olmak üzere 4-6 adet çukur açılmakta ve çukurların iç kısımları boşaltılmaktadır. Ortadaki çukura bilinen bir antiserum veya antijen konulmaktadır. 37°C'de 1-2 gün bekletilen petri kaplarında, gerek ortadaki ve gerekse bunun çevresindeki çukurlarda bulunan moleküller agar içine karşılıklı olarak yayılacakları için antijenle antikorun birleştiği yerlerde beyaz renkli bir çizgi ya da bant meydana gelmektedir (Dijkstra ve De Jager, 1998).



Şekil 5. Agarda çift yönlü difüzyon testinde oluşan çizgiler/bantlar (Shepard, 1972).

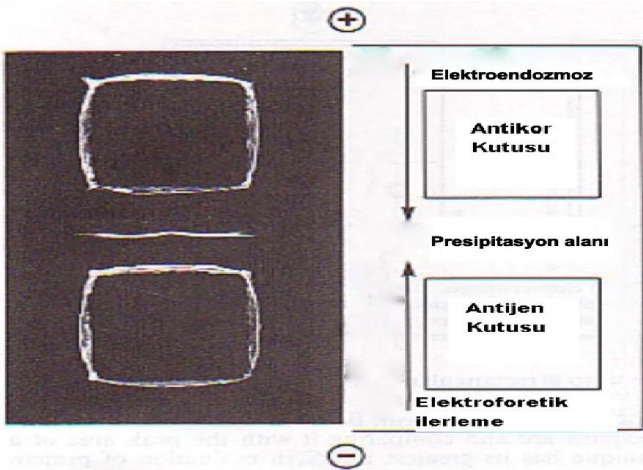
1.1.3.3. İmmunoelektroforez Testi: İmmün difüzyon ve elektroforezin birleştirilmiş tekniğine İmmunoelektroforez denilmektedir. Antijenler elektriksel alanda ayrılmaktadır (elektroforez). Elektroforez için kağıt, selüloz asetat, agar ve poliakrilamid kullanılmaktadır. Antijen molekülleri bu elektrik alanında hareket ederek 7,5 ile 8,6 arasında değişen bir pH derecesinde elektrik yüklerinin farklı olması sebebiyle birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Elektroforezden sonra agardan hareket yönüne paralel olacak şekilde bantlar kesilip çıkarılmakta ve bu bantların yerlerine antiserumlar konulmaktadır. Antiserumun yayılması için bir süre beklenmekte ve uygun antijen antikorla karşılaştığında presipitasyon bandı oluşmaktadır (Agrios, 2005).



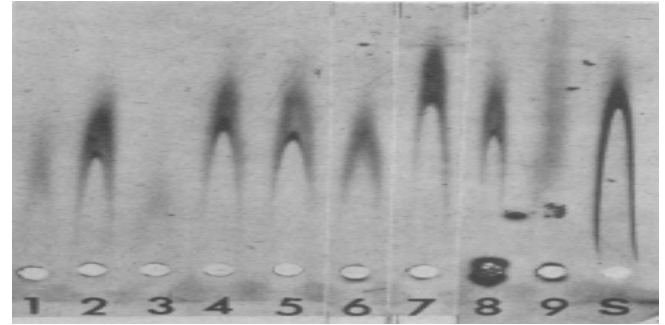
Şekil 6. İmmuno elektroforez testi (Altınışık, 2004).

1.1.3.3.1. Zıt Yönlü İmmunoelektroforez Testi: Hazırlanıp lama yayılan agarın iki ucuna iki çukur açılıp çukurların birine antijen, diğerine antiserum konulmaktadır. Antikorum bulunduğu taraf pozitif kutba, antijenin bulunduğu taraf ise negatif kutba bağlanılmaktadır. Negatif yüklü olan antijen antiseruma doğru, antikor ise elektroendozmozla antijene doğru hareket eder ve karşılaştıkları yerde bir presipitasyon bandı oluştuğu rapor edilmiştir (Erkan ve ark., 2011).

1.1.3.3.2. Laurell (Roket) İmmunoelektroforez Testi: Roket elektroforezi de denilen bu yöntemde, daha çok "titresi bilinmeyen bir antijenin titresini, titresi bilinen aynı türdeki bir antijen ile karşılaştırarak ölçmek" olarak açıklanmaktadır (Kılıç, 2012). Ortama elektriksel akım uygulandığında, rokete benzer şekilde presipitasyon bantları oluşmaktadır. Meydana gelen presipitasyon bantlarının yüksekliği eklenen antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Erkan, 2011).



Şekil 7. Zıt yönlü immuno elektroforez testi (Altınışık, 2004).

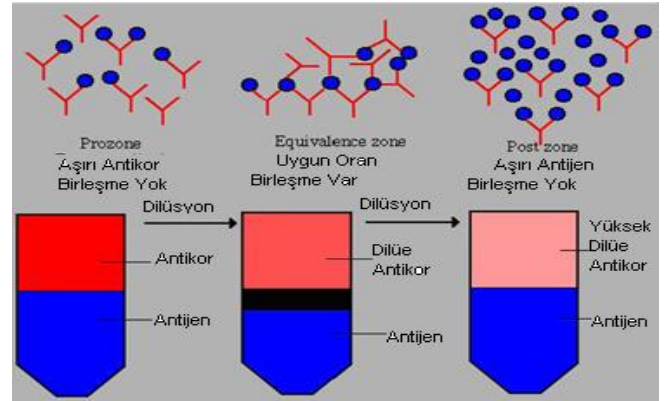


Şekil 8. Laurell (Roket) immuno elektroforez testi (Roseman ve ark., 1987).

1.2. Flokülasyon Yöntemi: Toksin ile antitoksinin uygun miktarlarda karşılaştıklarında meydana getirdikleri kümeciklere flokülasyon denir. Bu kümecikler gözle yada küçük büyütmelemlerle görülebilmektedir. Toksoid aşılarda miktar tayininde kullanılmaktadırlar (Kocazeybek, 2012). Bu testlerde hasta olup olmadığı araştırılacak olan kimsenin kan serumu, sifilize göre özel şekilde hazırlanmış organ ekstreleri ile karıştırılmak ve flokülasyon yani bir çeşit çökelti meydana gelip gelmediği araştırılmaktadır. Kahn testinde bu esasa göre hazırlanmış Kahn antijeni kullanılmaktadır (Kılıç, 2012).

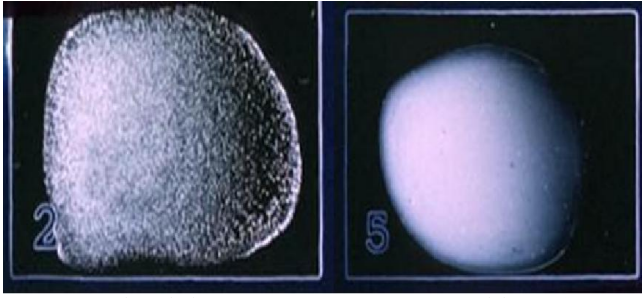
Toksin (antijen) ve antitoksin (antikor) arasındaki reaksiyonla tüpte yaygın bir bulanıklığın meydana geldiği görülmektedir. Flokülasyonda denge bölgesinin çok dar olduğu ve bu bölge dışında prozon ve postzon olayları görüldüğü rapor edilmiştir (Altınışık, 2004).

1.3. Aglutinasyon Yöntemi: Aglutinasyon testleri için, bazı çözümler antijenler inert yapıdaki lateks, polystren veya bentonit gibi partiküler hale getirilmiş taşıyıcı maddeler üzerine bağlanmaktadır. Bazı antijenler taze veya formalin ile işlem görmüş eritrosit yüzeyine direkt olarak bağlanabilmektedir. Sıvı ortamda karıştırılan partiküler yapıdaki antijen ile özgül antikorum (aglutinasyon antikor) homojen görünümü zamanla çıplak gözle görülebilen kümeleşme haline dönüşmektedir. Partiküler antijen olarak eritrositin kullanıldığı aglutinasyon testlerine hemaglutinasyon testleri denilmektedir. Aglutinasyon testleri mikroskopta, tüpte, lamda yapılabilmektedir. Aglutinasyon antikorları genel olarak IgM ve IgG karakterinde olduğu bildirilmiştir (Güngör ve ark., 2014).



Şekil 9. Flokülasyon yöntemi (Altınışık, 2004).

1.3.1. Lateks Aglutinasyon (LA) Testi: Lateks aglutinasyon testinde partiküler antijen olarak lateks boncukları, lam ve özel karteksler kullanılmaktadır. Lateks yüzeyi, antijen araştırılacaksa antikor molekülleri ile, antikor araştırılacaksa antijen molekülleri ile kaplanılmaktadır. Pozitif reaksiyonun değerlendirilmesi kümeleşmenin şiddetine göre derecelendirilmektedir. LA testi ile alınan sonuçlar kullanılan lateks partikülünün boyutuna, kullanılan antikorların avidite ve affinitesine (monoklonal veya poliklonal), sıcaklık, pH, iyon konsantrasyonu ve örnekteki antijen konsantrasyonu gibi değişkenlere bağlı olarak gerçekleşmektedir (Barnes ve ark., 2002). Bu test için her çalışmada mutlaka pozitif ve negatif kontrol kullanılması gerekmektedir.

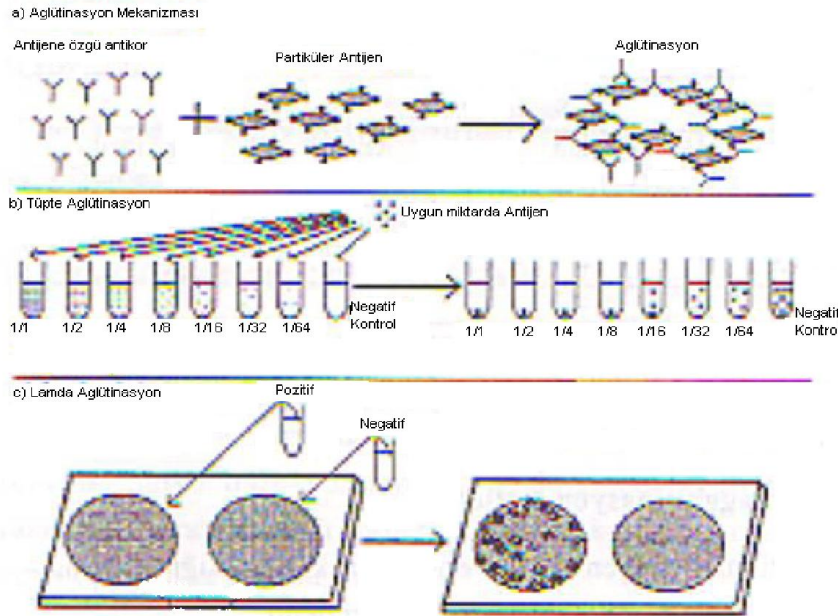


Şekil 10. Lateks aglütinasyon test sonucu görüntüsü (Çolak, 2004).

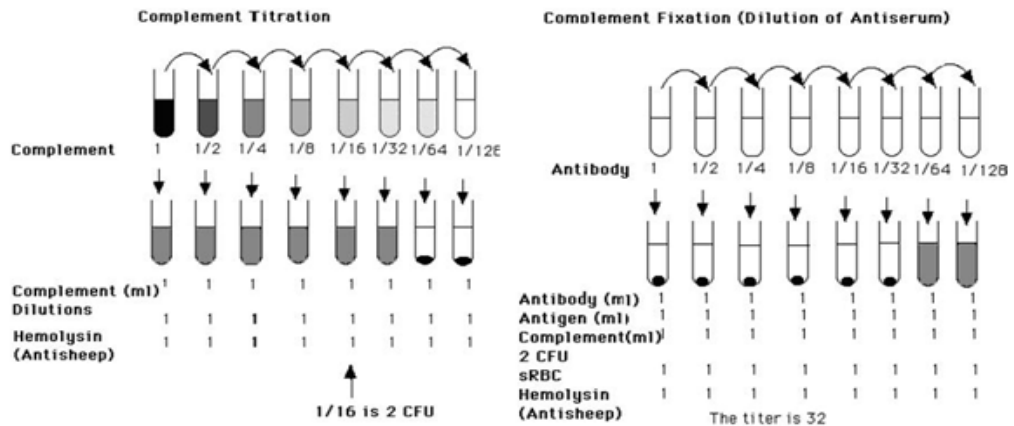
1.3.2. Koagülünasyon (CoA) Testi: Bu yöntemde partikül olarak öldürülmüş *Staphylococcus aureus* bakterisi kullanılmaktadır. Bu bakterinin hücre duvarında bulunan 'Protein A' maddesi büyük miktarda antikor bağlama özelliği taşımaktadır. Stafylokokların yüzeyine istenilen özgüllükte antikor molekülü Fab (antijen bağlama) bölgeleri serbest olacak şekilde Fc kısmından bağlanır ve LA testinin aksine bu yöntem sadece antijen tespitinde kullanılabilir. Özgüllüğü yüksek olmasına rağmen duyarlılığı LA testine göre düşük olduğundan örnekten direkt antijen tespitinde önerilmediği bildirilmiştir (Günaydın, M.,1994).

1.3.3. Hemagglütinasyon Testi:

1.3.3.1. Direkt Hemagglütinasyon Testi; Bu yöntem, bazı enfeksiyonlarda eritrosit yüzeyindeki antijenlere karşı doğal olarak oluşan antikorların tespitinde kullanılmaktadır. Bu testler hızlı tanı için yararlı olmalarına rağmen özgüllük ve duyarlılıkları düşük olduğu rapor edilmiştir (Kılıç, 2012).



Şekil 11. Aglütinasyon yöntemi (Altınışık, 2004).



Şekil 12. Komplemanfiksasyon testi (Altınışık, 2004).

1.3.3.2. İndirekt (Pasif) Hemagglütinasyon Testi; Bu yöntem antikor saptanmasında kullanılır ve 96 çukurlu 'U' tabanlı mikroplyetlerde gerçekleştirilmektedir. Çeşitli antijenler (bakteriyel, viral, fungal, paraziter), kimyasal maddeler kullanılarak (örn: tannik asit) eritrosit (genellikle koyun eritrositi) yüzeyine bağlanması sağlanmıştır (duyarlılaştırma). Pozitiflik olduğunda hemagglütinasyon, negatiflik varsa düğme gibi çökme görülmektedir. Bu yöntem laboratuvarında sifilizserolojisinde (TPHA testi) ve amip ve ekinokok antikorlarının araştırılmasında kullanılmaktadır (Usta ve ark., 2005).

1.4. Kompleman Fiksasyon Testi: Bu teknik balık bakteriyolojisinden ziyade balık virolojisi için daha önemli yer teşkil etmektedir. Bu teknik Ahne tarafından 1981 yılında tanımlanmıştır (Austin ve Austin, 1999).

Antijen-antikor birleşmesinin komplemanı uyarmasına dayanarak geliştirilen iki basamaklı testtir. Serum dilüsyonu yapılmış tüplerin her birine eşit miktarda antijen eklenir. Eklenen antijenle serum örneğindeki antikor (var ise) birleşerek immün kompleks oluşur. Tüplerde antijen-antikor kompleksi aracılığı ile tüketilmemiş kompleman kalmış ise kalan aktif kompleman miktarı ile ilişkili olarak indikatör hücrelerin tamamında veya bir kısmında hemoliz gözlemlenir. Hemoliz olan ilk tüpten bir önceki tüpteki serum titrasyonu antikor miktarını tanımlamak için kullanılır (Darwish, 2006).

2. Kantitatif Yöntemler

2.1. Türbidimetrik ve Nefelometrik Ölçümler: Bu yöntemler, sıvı ortam içinde karşılaştırılan ve birleşerek bulanıklık oluşturan antikor-antijen komplekslerinin içinden geçen ışık şiddetine göre kantitatif olarak ölçüldüğü otomatize yöntemlerdir. Genel olarak kompetitif veya nonkompetitifve heterojenveya homojenolarak sınıflandırılmaktadır. Kompetitif reaksiyonlar, genellikle işaretlenmiş antijen kullanılmakta ve aşırı antijen varlığında antijen ölçümü için yapılmaktadır. Nonkompetitif ölçümler, genellikle işaretlenmiş bir antikor kullanılarak ve aşırı antikor varlığında antijen ölçümü için yapılmaktadır(Kılıç, 2012).

2.2. İşaretlenmiş İmmüno kimyasal Ölçümler: İşaretli antikorların kullanılması ile 1942'de FA (Florasas Antikor-Fluorokromlar), 1954'de IFA (İndirekt Floresan Antikor), 1960'da RIA (Radyoizotoplantıyotla) ve 1970'de EIA veya ELIZA (Enzim ile antikor veya antijen saptamak) yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır (Usta ve ark., 2005).

2.2.1. Radioimmunoassay (RIA): Radioimmunoassay yönteminin tarihi ve geliştirilmesi Najjar ve Weintraub tarafından incelenmiştir. RIA yöntemi biyolojik akışkanlar içinde farmasötik açıdan önemli bileşiklerin sınırsız sayıda belirlenmesi için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Darwish, 2006).

Radioimmunoassay'de temel mekanizma, radyo izotop bir madde ile işaretli antijen veya antikor aracılığı ile karşılığı olan (özgül olduğu) antikor veya antijenin varlığını ve miktarını saptamaktır. En fazla kullanılan madde radyoaktif iyottur. Standart grafikler kullanılarak reaksiyona giren moleküllerin miktarları tayin edilmektedir (Erkan ve ark., 2011).

2.2.2. Enzyme İmmunoassay (EIA-ELIZA): Antijen-antikor etkileşimlerine dayanarak birbirleri arasındaki farklılıkların ortaya konulması için serolojik yöntemler içerisinde en duyarlı ve hassas yöntem olarak Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) kullanılmaktadır (Önalın ve Arabacı, 2016).

Enzim İmmünoassay yapışacak kimyasalın bir radyoizotop yerine bir enzim olması ile RadioimmunAssay(RIA) 'den ayrılmaktadır (Darwish, 2006).

Beliren renkli reaksiyon ürünlerinin miktarı enzim işaretli reaktiflerin ve dolayısıyla katı faza bağlanan Ag ve Ab'nin miktarını belirlemektedir (Kılıç, 2012). ELISA ile antijen ve antikor araması yapmak ve bunların miktarlarını saptamak mümkün olmaktadır. Testte; özgül antijen-antikor ilişkisi, bu komplekse eklenen antikorlara alkalın fosfataz veya Horse Radish Peroksidaz gibi bir enzimin bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esas alınmakta ve sonuçlar kolorimetrik olarak değerlendirilmektedir.

Ortama sonradan katılan, antijene karşı oluşturulmuş ve enzimle bağlanmış spesifik antikor da, bu kompleksteki antijene bağlanmaktadır. En son katılan kromojensubstrat, komplekste var olan enzimle reaksiyona girerek renk vermekte ve kolorimetrik olarak değerlendirme yapılmaktadır (Dijkstra ve De Jager, 1998).

2.2.3. Fluoroimmunoassay (FIA): Bu testte, antikorlar fluorokrom bir boya (FITC= fluoresceinisothiocyanate, auramine, rhodamin, vs) ile boyanmaktadır. Test örneğinde bulunan antijenin üzerine boyalı antikorların konulması halinde, boyalı antikorlar antijenle birleşmekte ve UV-ışınları ile çalışan mikroskopta sarı-yeşil renkte parlak bir floresans ışık vererek kolaylıkla fark edilebilmektedirler. Time-Resolved Fluorescence Immunoassay ve Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA) gibi çeşitli fluoroimmunoassay yöntemler vardır (Dijkstra ve De Jager, 1998).



Şekil 13. İmmünofluorescence tipleri ve elde edilen görüntüler (Dijkstra ve De Jager, 1998).

SONUÇ

Bu çalışmada balıklarda enfeksiyona neden olan bakteriyel patojenlerin serolojik olarak değerlendirilebilmesi için kullanılabilecek serolojik yöntemlere değinilmiştir. Serolojik yöntemler balık hastalıklarında koruyucu müdahaleler kapsamında önemli bir yere sahiptir. Günümüzde serolojik çalışmalar hızlı teşhis, enfeksiyon ve bağışıklık hakkında fikir edinme, izolatkarakterizasyonu ve aşı geliştirme gibi konularda kullanılmaktadır.

Kalitativ sonuçlar Cut-off değerine göre pozitif/negatif olarak değerlendirilmektedir. Genelde Ag, bazen IgM varlığının belirlenmesinde değerlidir. IgG düzeyi ve takibinde işe yaramadığı bildirilmiştir. Kantitatif sonuçlarda ise konsantrasyonu bilinen standart serumlar kullanılmaktadır.

Serolojik yöntemlerin duyarlılıkları arasında farklılıklar olduğu belirtilmekte ve gerektiğinde bu yöntemlerin diğer tanı yöntemleri ile birlikte kullanılması önerilmektedir. Serolojik yöntemlerin duyarlılıklarına ilişkin bilgiler şekil 13'de verilmektedir.

Tablo 1. Serolojik yöntemlerin duyarlı oldukları aralıklar (Dijkstra ve De Jager, 1998).

Yöntem Adı	Tanılama Aralığı (µg/ml)*
Presipitasyon Testleri (Sıvı)	20-200
Presipitasyon Testleri (Jel)	
- Radial Immuno diffüzyon	10-50
- Çift Yönlü Immuno diffüzyon	20-200
- Immuno elektroforez	20-200
Immuno fluorescence Assay (IFA)	1-8
Aglütinasyon Testleri	0,3-0,06
Radio immuno assay (RIA)	0,0006-0,006
Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	< 0,0001-0,008

*Antijenin varlığında pozitif reaksiyonun oluşması için gerekli olan en düşük antikor miktarları

Bu çalışmada bahsi geçen serolojik yöntemler içerisinde ELISA testi, kullanılan konjugatlardan Alkalın Fosfataz ve Horse Radish Peroksidaz (HRP) enzimlerinin; ucuz, kolay olması ve fazla çeşitte substrat olarak kullanılabilmesi sebebiyle tercih edildiği bildirilmiştir (Çağırğan, 2008).

Serolojik yöntemlerin dezavantajları; tür içindeki farklı izolatlar arasındaki çapraz reaksiyon oluşumuve antijenler için uygun antiserum bulunması veya elde edilmesindeki zorluklardır (Diler ve ark., 2002).

Avantajlı olan yönleri ise; belli bir etkene özgül olan reaksiyon vermesi, az miktarda enfekte olmuş doku materyaline ve antiseruma gerek duyulması, rutin testlerde kullanılabilmesi, sonuçların kısa sürede ve kantitatif olarak elde edilebilmesi, testlerde yararlanılan tanı kitlerinin ticari olarak piyasada bulunması ve maliyetlerinin düşük olması olarak sıralanabilir (Yula, 2009).

Buna rağmen, son yıllarda geliştirilen ve nükleik asit temelli olan yöntemlerin serolojik yöntemlerle birlikte kullanılması, inceleme konusunu teşkil eden patojenlerin doğru ve kesin olarak teşhis ve tanısını yapabilmek için uygulamalarda yerini almaya başlamıştır. Bununla birlikte; çalışmalarda kullanılacak olan yöntemin seçiminin eldeki kaynaklara, testi yürütenin bilgi ve deneyimine, uygulamanın yapılacağı laboratuvarın koşullarına, testler için gerekli olan reaktiflerin durumuna, testin duyarlılık düzeyine ve süresine, test edilecek örneğin durumuna, çeşidine ve miktarına bağlı olduğunu göz önünde tutmak yararlı olacaktır (Dijkstra ve De Jager, 1998). Moleküler tiplene sonuçlarının da en faydalı biçimde sonuçlarından yararlanılması için klasik yöntemler ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Afonso, A., Silva, J. ve Gomes, S., (2003). *Lactococcus garvieae* trout infections in portugal: A new challenge on fish vaccinology. IBMC News, February, 4-6.
- Agrios, G.N., (2005). Plant Pathology "5th Edition". Elsevier Acad. Press, U.S.A., XXV+922 p.
- Altınışık, M., (2004). İmmünojenik teknikler. ADÜTF biyokimya A.D., <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/45-uzm-03.pdf>.
- Austin, B. and Austin, D.A., (1999). Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Third (Revised) edition, Springer. Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK, 166-173. p.
- Barnes, A.C., Guyot, C., Hansen, B.G., Mackenzie, K., Home, M.T. and Elms, A.E. (2002). Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated

- isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Fish&Shell fish Immunology*, **12**, 155-168.
- Bly, J.E., Quinio, S.M.-A and Clem,L.W., (1997).** Environmental effects on fishimmun emechanisms. *Dev. Biol. Stand.* **90**, 33-49.
- Çağrgan, H., (2008).** İnfeksiyöz pankreatik nekrozis hastalığının teşhisi için enzyime linked immunosorbent assay geliştirilmesi. *Bornova Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg.*, **30** (44): 15-22.
- Çağrgan, H., Tanrikul, T.T. and Balta, F., (1997).** Characteristics of yellow pigmented bacteria isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Eighth international conference. Diaseases of fish and shell fish 14-19 Sep. 1997. Edinburg, Scotland european association of fish pathologists.
- Çolak, D., (2004).** Hızlı viral tanı testleri. Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi mikrobiyoloji anabilim dalı, Viroloji bilim dalı. <http://slideplayer.biz.tr/slide/2860053/>.
- Darwish, İ. A., (2006).** Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: Basic methodology and recent advances. *International Journey of Biomedical Science*, **2** (3): 217-235.
- Dijkstra, J. and De Jager, C.P., (1998).** Practical plant virology-protocols and exercises. Springer - Verlag, Berlin, Germany, XVI+459 p.
- Diler, O., Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A. ve Işık, B., (2002).** First occurrence of *Streptococcosis* affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **22**, 21-25.
- Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ.C., Sipahioğlu, H.M., (2011).** Bitki virüslerinin tanınmasında kullanılan serolojik yöntemler *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, **9** (2): 35-49.
- Erkan, S., (1992).** Moleküler biyoloji. Doğruluk matbaacılık Ltd. Şti., Bornova, İzmir, 140s.
- Hampton, R., Ball, E. And Boer, S. D., (1990).** Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: A laboratory manual. APS Press, Minnesota, U.S.A., 389 p.
- Günaydn, M., (1994).** Bakteriyel menenjitlerin laboratuvar tanısı. *ANKEM Derg.*, **8** (3): 291-294.
- Güngör, S., Gökmen, A.A., Uzun, B., Er, H.H., Pektaş, B., ve Kilimcioğlu, A.A., (2014).** Bir üçüncü basamak hastanede *Toxoplasma gondii* IgG avidite test istem ve sonuçların değerlendirilmesi. *Journal of clinical and experimental investigations*, **5** (2): 246-249.
- Kılıç, İ. H., (2012).** Serolojik Tanı Yöntemleri, <http://www1.gantep.edu.tr/~ikilic/wp-content/uploads/2012/12/6imnl.pptx>
- Kocazeybek, B., (2012).** İmmünolojik tanı yöntemleri, Erişim tarihi: 22.03.2014. http://www.ctf.edu.tr/index.php?option=com_content&view=article&id=272&Itemid=110&jsmallfib=1&dir=JSROOT%5Cbekir-kocazeybek/ders-otlari/TIP+2-+7-2 2012 &download_file=JSROOT%5Cbekir-kocazeybek/ders-notlari /TIP+2-+7-2-2012/1-İmmunoloji+Tanı+Yöntemleri +05.03.2013.ppt.
- Önal, Ş., ve Arabacı, M., (2016).** Van, Bitlis, Muş ve Hakkari illerinde bulunan gökkuşağı alabalığı çiftliklerinden elde edilen *Lactococcus garvieae* izolatlarının fenotipik, serotipik ve genotipik farklılıklarının belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Roseman, S., Meadow, N. D., Revuelta, R., Chen, V. N., and Colwell, R. R., (1987).** Phosphoenolpyruvate: Glycose phosphotransferase system in species of vibrio, A widely distributed marine bacterial genus. *Journal of bacteriology*, Nov. 1987, Vol. 169, No. 11. P. 4893-4900 0021-9193/87/114893-08\$02.00/0.
- Shepard, J.F., (1972).** Gel-diffusion methods for the serological detection of potato viruses X, S and M. Montana Agric. Exp. Station, Montana State University, Bulletin No: 662, 72 p.
- Tatner, M.F., (1986).** The Ontogeny of humoral immunity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **12**, 93-105.
- Usta, M., Sipahioğlu, H.M., ve Polat, B., (2005).** Comparison of DAS-ELISA and RT-PCR methods for detection of prunus necrotic ringspot virus (PNRSV). *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, **15** (2): 153-158.
- Yula, E., (2009).** Fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemleri. Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 23-25 Mart 2009. <http://www.klinikmikrobiyoloji.com/indir/fenotipikvegenotipik.pdf> Erişim Trh:08.05.2013 saat: 23:09.

Geliş tarihi: 11.11.2016

Kabul tarihi: 01.12.2016

***Başlıca Yazar Yazışma adresi:**

Dr. Şükrü ÖNALAN

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 65080, Van, Türkiye

E-mail: sukruonalan@yyu.edu.tr