

Levrek Yavrularında (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) Vibriozise Karşı Aşı Geliştirilmesi

Haşmet Çağırğan

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, İskele, Urla, 35440, İzmir, Türkiye
E mail: cagirgan@sufak.ege.edu.tr

Abstract: Vaccine development in sea bass fry (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) against vibriosis. A successful dip vaccine against vibriosis which caused by *Vibrio anguillarum* Serotype O1, was developed for sea bass fry. 0.5-3 g of sea bass fry were vaccinated with 1:10 diluted vaccine which, containing 2×10^9 cfu ml⁻¹ formalin inactivated *V. anguillarum* Serotype O1, for 30 seconds. Fish were boosted for 1 minute bath when reached 10-15 g of size. Protections were determined following 21 days and 240 days with experimental bath challenge and intraperitoneal challenges respectively. All challenges were designed two replicates. Vaccinated (n=30) and control groups (n= 44) were infected with pathogenic *V. anguillarum* serotype O1 (1.23×10^7 cfu ml⁻¹) for 40 minutes bath. 10% and 59% mortality were recorded in vaccinated and control groups respectively. Calculated relative percentage survival (RPS) was 83. The second challenge was performed by 0.5 ml intraperitoneal injection of 1.75×10^8 cfu ml⁻¹ pathogenic *V. anguillarum* serotype O1 which was diluted with phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4) and inoculated to one time vaccinated (n= 38), booster vaccinated (n= 40) and control groups. 53% and 27.5% mortalities were observed in one time vaccinated and boosted fish respectively. However 71% mortality were found in unvaccinated control (n= 34). The results showed that good protection was obtained in booster vaccinated group following 240 days from vaccination (RPS= 61.3).

Key Words: Vaccine, vibriosis, sea bass, *Dicentrarchus labrax*.

Özet: Levrek yavrularında (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) *Vibrio anguillarum* Serotip O1'in neden olduğu vibriozise karşı başarılı bir daldırma aşısı geliştirildi. 0.5-3 g levrek yavruları 1:10 sulandırılmış 2×10^9 cfu ml⁻¹ bakteri içeren formalin ile inaktif edilmiş aşısı ile 30 saniye süreyle daldırma yöntemiyle aşılandı. Balıklar 10-15 g ağırlığa ulaşınca 1 dakika daldırma yöntemiyle tekrar aşılandı. Korunma 21 gün ve 240 gün sonra sırasıyla banyo ve intra peritoneal enjeksiyon yöntemiyle deneysel enfeksiyon oluşturularak belirlendi. Tüm deneysel enfeksiyonlar 2 tekrar olarak düzenlendi. Aşılı (n= 30) ve kontrol grupları (n= 44) 1.23×10^7 cfu ml⁻¹ patojenik *V. anguillarum* Serotip O1 içeren deniz suyunda 40 dakika süreyle banyo yaptırıldı. Aşılı ve kontrol grubunda sırasıyla %10 ve %59 mortalite görüldü. Hesaplanan görecel yaşam oranı (RPS) 83 bulundu. İkinci deneysel enfeksiyon intra peritoneal yolla 0,5 ml fosfat tuz tamponu içinde (PBS) (pH 7,4) $1,75 \times 10^8$ cfu ml⁻¹ patojenik *V. anguillarum* Serotip O1 verilerek gerçekleştirildi. Bir kez aşılı (n= 38) iki kez aşılı (n= 40) gruplarda mortalite oranları sırasıyla %53, %27.5 olarak bulundu. Fakat aşısız grupta (n= 34) %71 mortalite bulundu. Sonuçlar, 2 kez aşılı grupta, aşılamadan 240 gün sonra iyi bir korunmanın olduğunu ortaya koydu (RPS=61.3).

Anahtar Kelimeler: Aşı, vibriozis, levrek, *Dicentrarchus labrax*.

Giriş

Vibriosis, *Vibrio* ve *Listonella* genusuna ait çok sayıda bakteri türünün neden olduğu enfeksiyonlara verilen addır. İlk tanımlanan balık patojenlerinden biri olan *Vibrio anguillarum*, genotipik ve fenotipik araştırmalar sonucunda *Listonella anguillarum* olarak değiştirilmişse de, çoğu araştırmacılar *V. anguillarum*'u kullanmayı tercih etmektedirler (Austin ve Austin, 1999). Değişik balık türlerinde vibriozise neden olan etkenler ve oluşturduğu enfeksiyonun epizootiyolojisi etken özellikleri, klinik ve otopsi bulguları detaylı olarak bildirilmiştir (Tanrıkul ve diğ., 1996; Austin ve Austin, 1999; Cengizler, 2000). Hastalık, antibiyotik ve sulfonamitlerle sağaltılabilirse de, tanı konulup sağaltıma başlayınca kadar geçen sürede ölümler devam etmekte, hastalığı geçiren populasyonda verim kayıpları görülmektedir. Enfeksiyonun bir üretim periyodunda birden çok tekrarlama, sık sık kemoterapotik kullanımına, dolayısıyla sağaltım maliyetlerinin artmasına yol açarken,

kemoterapotik madde kalıntıları tüketici sağlığını ve akuatik çevreyi olumsuz yönde etkilemektedir (Çağırğan, 1993). Bu nedenle tüm dünyada vibriosisin sağaltımından çok, korunmaya yönelmiş, banyo, enjeksiyon ve/veya oral yolla uygulanabilen aşılar geliştirilmiştir (Toranzo ve diğ., 1997).

Hasta balıklardan ve deniz suyundan izole edilen *V. anguillarum*'ların O serotiplendirmeye, 23 tipinin ve alt serotiplerinin bulunduğu bildirilmiş olup (Pedersen ve diğ., 1999), bunlardan ilk dördü değişik balık türlerinde patojen, diğerleri ise patojenik değildir. (Santos, 1995) Levreklerde çoğunlukla serotip O1, alabalıklarda serotip O1, O2 ve *V.ordalii* enfeksiyonlara yol açmaktadır. Serotip O2'nin, O2a ve O2b olarak adlandırılan 2 alt grubu vardır (Larsen ve diğ., 1994). Bununla beraber, Fransa'da levreklerden serotip O3 de izole edilmiş olup 2 alt grubunun (O3a ve O3b) bulunduğu bildirilmiştir (Santos ve diğ., 1995). Fakültemizde son 15 yılda levreklerden izole edilen tüm *V. anguillarum* suşları Serotip O1 olarak tanımlanmıştır (Çağırğan, yayımlanmadı).

Yurdumuzda 90'lı yıllarda levreklerde kullanılmaya başlanan vibriosis aşılardan başarılı sonuçlar alınmasından sonra, çiftliklerde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak tamamı yurt dışından ithal edilen aşılardan yüksek fiyatla satılması, maliyetleri artırmakta ve yurtdışı pazarlarda rekabet şansının azalmasına yol açmaktadır. Bu araştırmada, *V. anguillarum*'ün neden olduğu vibriosten korunmada kısa süreli daldırma yöntemiyle uygulanabilen aşı geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Araştırmada kullanılan 0.5-3 gramlık levrek yavruları Kılıç Deniz Ürünleri Üretim Sanayi ve Ticaret A.Ş.'den sağlandı. Balıklar Nisan ayında kuluçkahaneden alınarak Seferihisar'da bulunan Hünkar Besicilik Hayvancılık ve Su Ürünleri A.Ş.'ye ait çipura levrek üretim tesisinde 5mx5 m ebadındaki tahta kafese, su sıcaklığı 14-15°C'iken konuldu. Kafes, ağ ile tam ortasından bölünerek, 2.5x2.5 m ebadında 4 m derinlikte 4 adet ağ kafes haline getirildi. Her bir göze, 1500'er adet olacak şekilde stoklandı. 10 gün süreyle balıklara hiçbir işlem yapılmadı. 11. gün daldırma yöntemiyle aşılandı. Ağ bölmelerden ikisi aşılı, ikisi aşısız kontrol grup olarak ayrıldı. Aşılı grubun biri 10-15 grama gelince tekrar aşılandı. Balıklar deneme süresince pelet yemle (ÇamlıYem, Bornova-İzmir), su sıcaklığı ve balık ağırlığına göre değişen oranlarda üretici firmanın önerileri doğrultusunda beslendi. Aşılı grup ve kontrol grubundan ayrı ayrı alınan örnekler Urla'ya, Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarlarına taşınarak, ilk aşılama 21 gün ve 240 gün sonra deneysel enfeksiyonla aşının koruyuculuğu belirlendi. Taşımadan önce balıklar 2-phenoxy ethanol ile anesteziye edildi ve saf oksijen ilave edilerek anestezi bulunmayan tankta taşındı.

Aşı, daha önceki salgınlarda hasta levreklerden izole edilen *V. anguillarum* serotip O1'den (*V. ang. B-O1*), detayları Dec (1984) tarafından bildirildiği şekilde kısaca; %1.5 NaCl içeren triptik soy buyyonda (Oxoid) bakterinin kültürü yapıp formaldehit ile inaktive edildikten sonra, mililitrede 2×10^9 cfu ml⁻¹ bakteri olacak şekilde standardize edilerek hazırlandı. Aşı suşunun biyokimyasal özellikleri API 20 E yöntemiyle biyokimyasal karakterleri doğrulandı. 7 basamaklı API 20 E kodu 3247524 olarak belirlendi. Aşı suşunun serolojik yönden doğrulanması için ayrıca lamda çabuk aglutinasyon testi uygulandı.

İlk aşılama, balıkların 30 saniye süreyle 10 kez dilüe aşılı suya (1 lt aşı+9 lt deniz suyu) daldırılmasıyla, ikinci aşılama aynı şekilde fakat 1 dakikalık daldırma yöntemiyle uygulandı. İlk aşılama balıklar 0.5-3 gramken 16°C su sıcaklığında, ikinci aşılama 10-15 gramken 21°C su sıcaklığında yapıldı. Her iki aşılama da 100 kg balığa 1 litre aşı kullanıldı. Balıkların taşınma, yakalanma ve aşılanmalarından önce 2-phenoxy ethanol (Merck) ile hafif düzeyde sedasyon sağlandı.

Aşının sağladığı koruyuculuğun belirlenmesi için laboratuvara getirilen balıklar 1 hafta süreyle 2.5 ton filtre edilmiş deniz suyu içeren tanklara (2mx 2mx 0.7 m) konuldu.

Deneme süresince su sıcaklığı 16-18°C olup sürekli akış ile saatte %50 su değişimi sağlandı. Sudaki çözünmüş oksijen düzeyi 6 ppm'in üzerinde tutuldu.

Birinci deneysel enfeksiyon; 3.5±0.5 gramlık balıklarda Haziran ayında, aşılama 21 gün sonra, su sıcaklığı 18-19°C iken 50 litrelik plastik kovalarda yapıldı. Sedasyona tabi tutulmuş balıklar kepçelerle alındıktan sonra patojenik *V. anguillarum* serotip O1 (*V.ang. R-O1*) içeren suda (1.23×10^7 cfu ml⁻¹) 40 dakika süreyle banyo yaptırıldı. Banyo süresince ortama hava taşından difuze edilen hava sürekli olarak verildi. Aşılı ve kontrol grupları sırasıyla 44 ve 30 adetlik gruplar halinde ve ikişer paralel olarak denemeye alındı. İkinci deneysel enfeksiyon, ilk aşılama 240 gün sonra, 140±10 gramlık balıklara su sıcaklığı 15°C' de iken, 1.75×10^5 cfu ml⁻¹ bakterinin (*V.ang. R-O1*) 0.5 ml PBS'te intraperitoneal yolla (İP) enjeksiyonuyla yapıldı. Kontrol grubuna 0.5 ml steril PBS (pH: 7.4) enjekte edildi.

Balıklar deneysel enfeksiyondan sonra 21 gün 200 litre deniz suyu bulunan tanklarda (1mx0.7 mx0.4 m) tutuldu (%30 su değişimi, minimum 6 ppm çözünmüş oksijen). Deneysel enfeksiyon sonucunda ölen veya semptom gösteren balıkların böbreklerinden TCBS'ye ekimler yapıldı. Petri kutuları 22±1°C'de 72 saat inkube edildi. İzole edilen tipik kolonilerin TSA'ya pasajından sonra hareket, O/129, oksidaz ve katalaz testi uygulandı. Koloniler homolog antiserumla aglutinasyonla identifiye edildi. Aglutinasyon testi, tavşanda *V. anguillarum* serotip O1'e (ATTC 43305) karşı hazırlanan serumla, lamda çabuk yöntemle yapıldı. Antijen ve antiserum hazırlanması, aglutinasyon testi; detayları Toranzo ve diğ. (1987)'nin bildirdiği yöntemle yapıldı.

Gruplar arasındaki mortalite oranlarındaki farklılığı ortaya koymak için istatistiksel analiz, Student t testi (Gruplar arası farkın önem testi) yapılarak belirlendi. (Sümbüloğlu 1978).

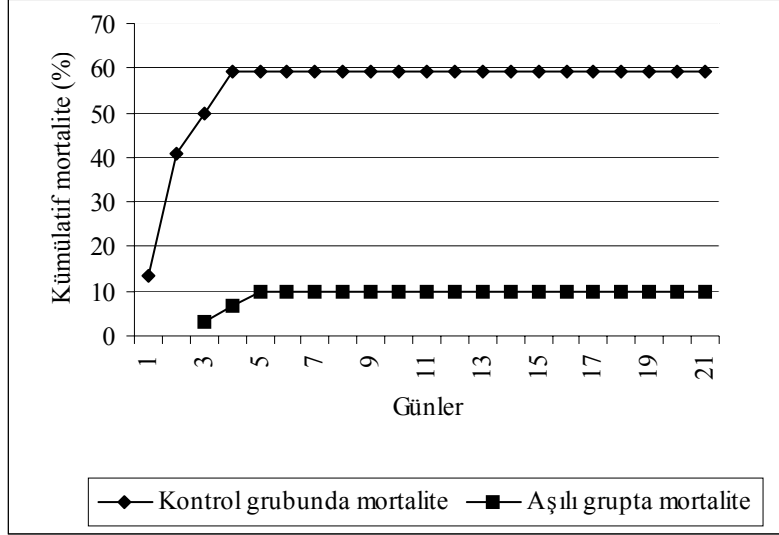
Bulgular

Deneysel olarak enfekte edilen balıklarda renkte kararma, su yüzeyinde yüzme, halsizlik, yüzgeç kaidelerinde, operkulum ve çevresinde hemorajiler, bağırsakta beyaz renkli ishal görüldü. Birinci deneysel enfeksiyonda aşılı balıklar ve kontrol grubunda ölümler 6 gün içerisinde sonlandı, 21 gün süreyle gözlem devam ettirildi. Aşılı grupta (30 balık, 2 paralel) deneysel enfeksiyon sonucunda her iki paralelde de üçer balık (%10) ölümler, kontrol grubunda, birinci tankta 44 balıktan 25, paraleli olan denemede ise 27 balık (ortalama 26) öldü. Banyo yoluyla deneysel enfeksiyon sonuçları ve hesaplanan RPS Tablo 1'de, kümülatif mortalite oranları Şekil 1'de verilmiştir. 240 gün sonraki deneysel enfeksiyonda; bir kez aşılı (n= 38) ve iki kez aşılı balıklarda (n=40) ve aşısız kontrol grubunda (n=34) ölüm oranları sırasıyla %53, %27.5 ve %71 olarak bulundu. Enjeksiyon yöntemiyle yapılan deneysel enfeksiyon sonuçları ve hesaplanan RPS Tablo 2'de kümülatif mortalite oranları Şekil 2 de verilmiştir.

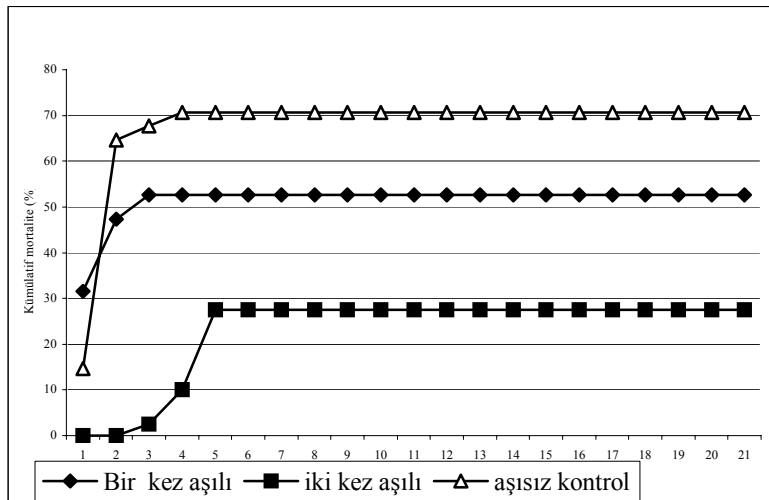
Tablo 1. Aşılı balıklarda ve kontrol grubunda aşılardan 21 gün sonra banyo yoluyla yapılan deneysel enfeksiyon sonucundaki mortalite oranları ve aşının verdiği görecel korunma oranı (RPS)*.

Banyo yoluyla enfeksiyondaki bakteri sayısı	deneysel Denemeye alınan balık sayısı (2 tekrar olarak)	Kontrol grubundaki balık sayısı	Kontrol grubunda mortalite (%)	Aşılı grupta mortalite (%)	RPS
40 dakika banyo 1.23×10^7 cfu/ml	30	44	59	10	83

$$*RPS = \left[1 - \frac{\text{Aşılı balıklardaki mortalite (\%)}}{\text{Kontrol grubunda mortalite (\%)}} \right] \times 100$$

**Şekil 1.** Aşılı ve kontrol grubunda aşılardan 21 gün sonra banyo yoluyla yapılan deneysel enfeksiyon sonucunda gözlenen kümülatif mortalite.**Tablo 2.** Bir kez ve iki kez aşılı balıklarda ve kontrol grubunda aşılardan 240 gün sonra İP yolla yapılan deneysel enfeksiyon sonucunda mortalite oranları ve aşının RPS'i.

İP yolla 1.75×10^5 cfu deneysel enfeksiyon uygulanan grup	Denemeye alınan balık sayısı (2 tekrar olarak)	Kontrol grubundaki balıksayısı	Kontrol grubunda mortalite (%)	Aşılı grupta mortalite (%)	RPS
1 kez aşılı	38	34	71	53	-
2 kez aşılı	40	34	71	27.5	61.3

**Şekil 2.** 1 kez ve 2 kez aşılı balıklarda ve kontrol grubunda aşılardan 240 gün sonra intra peritoneal yolla yapılan deneysel enfeksiyon sonucundaki kümülatif mortalite.

Tartışma ve Sonuç

Vibriosis'e karşı aşı uygulaması ilk defa 1970'li yıllarda Kuzey Amerika kıyılarında görülen *V. anguillarum* ve *V. ordalii* enfeksiyonlarından korunmaya yönelik uygulanmış, Pasifik salmonlarını aşılamanın, ilaçlarla sağaltımdan daha başarılı ve ekonomik olduğu anlaşılmıştır (Evelyn, 1984). Daldırma yöntemiyle ilk aşılama çalışmalarında hiper ozmotik infiltrasyon yöntemi kullanılmıştır. Ancak bu yöntemle aşılanan salmonid balıklarda stres nedeniyle subklinik enfeksiyonların provake olduğu görüldüğünden, doğrudan daldırma yöntemi denenmiş ve bu yöntemin daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Antipa ve diğ., 1980).

Levreklerde vibriosisten korunma için banyo, enjeksiyon ve oral yolla uygulanan aşılarda içerisinde en kolay uygulananı kuşkusuz oral yoldur. Dec ve diğ. (1990) 10-50 g ağırlığındaki levrek balıklarının 90 g yeme 3 ml, 2×10^{11} bakteri içeren ticari aşı ile ıslayarak 5 gün süreyle beslemiş, aşılardan 33 gün ve 79 gün sonra İP yolla sırasıyla 9.5×10^6 cfu ml⁻¹ ve 2.6×10^7 cfu ml⁻¹ patojenik *V. anguillarum* vermek suretiyle aşının koruyuculuğunu test etmiştir. Oral yolla aşılama balıklarda aşılardan 33 ve 79 gün sonra yapılan deneysel enfeksiyonda aşı grubunda sırasıyla %11.3 ve %71.4 mortalite belirlenirken, kontrol grubunda sırasıyla %40.9 ve %92.8 mortalite belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar on kez dilüe aşıyı, 0.2 ml İP yolla uygulaması sonucunda 33. ve 79. günlerdeki deneysel enfeksiyonda sırasıyla %0 ve %10.7 mortalite görüldüğünü bildirmişlerdir. Denizde kültürü yapılan Atlantik halibutta (*Hippoglossus hippoglossus*) bir dakikalık banyo ve 0.1 ml enjeksiyonla ile aşılardan 12 hafta sonra *V. anguillarum* serotip O2 α ile yapılan deneysel enfeksiyonda aşı grubunda yaşama oranı %100 e yakın iken aşısız grupta ise %0 olduğu bildirilmiştir (Bowdwen ve diğ., 2002).

Bu araştırmada levrek balıklarından bir grup sadece bir kez banyo yoluyla diğeri ise iki kez banyo yoluyla aşılanmıştır. İlk aşılama balıklar 0.5-3 g iken aşı 10 kez sulandırılıp 30 saniye daldırma yöntemiyle, ikincisi balıklar 10-15 gramken 1 dakika süreyle aşı suya daldırma yöntemiyle uygulanmıştır. Birinci aşılardan 21 gün sonra banyo yoluyla gerçekleştirilen deneysel enfeksiyon sonucunda RPS 83 olarak hesaplandı. Balıklara banyo yoluyla deneysel enfeksiyon yapılmışsa 60 RPS ve üzeri, korunma için yeterlidir (Amend, 1981). Kontrol grubunda görülen spesifik mortalite oranı (%59) ile aşı grubundaki mortalite oranlarının (%10) karşılaştırılmasında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunurken ($t=4.24$, $P<0.05$), kontrol grubu balıklardaki paralel denemedeki fark ise önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Birinci aşılardan 240 gün sonra enjeksiyon yöntemiyle yapılan deneysel enfeksiyon sonucunda; her ne kadar aşı balıklarda %53, kontrol grubunda %71 spesifik mortalite görülmüş, ölüm

oranlarında %18'lik bir fark elde edilmişse de, aşı ve aşısız gruplar arasındaki ölüm oranları arasındaki fark, istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($t=1.65$, $P>0.05$) İki kez aşılama balıklarda mortalite oranı (%27.5) kontrol grubu (%71) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olup ($t=3.75$, $P<0.05$) RPS 61.3 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak bu araştırmada Türkiye'de ilk kez üretilen vibrio aşısı ilki 0.5-3 gramlık, ikincisi 10-15 gramlık levrek yavrularına kısa süreli daldırma yöntemiyle uygulanmış, ve en az 240 gün süreyle koruyuculuk sağladığı belirlenmiştir.

Kaynakça

- Amend, D. F. (1981). Potency testing of fish vaccines. In: International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A. 1981, Develop. Biol. Standard., 49, pp. 447-454.
- Antipa, R., R. Gould, D. F. Amend (1980). *Vibrio anguillarum* vaccination of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) by direct immersion and hyperosmotic immersion. J. Fish Dis., 3, 161-165.
- Bowden, T. J., D. Menoyo-Luque, I. R. Bricknell, H. Wergeland (2002). Efficacy of different administration routes for vaccination against *Vibrio anguillarum* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) Fish & Shellfish Immun. 12, 283-285.
- Çağırğan, H., 1993 An investigation on the diagnosis and treatment of bacterial diseases in cultured sea bass (*Sparus aurata* L.) and sea bream (*Dicentrarchus labrax* L.). Ph.D Thesis 1-117 Bornova-İzmir.
- Cengizler, İ., Textbook of Fish Diseases. Cukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları Yayın No:7 Adana.
- Dec, C., P. Angelidis, F. B. Laurencin, 1990. Effects of oral vaccination against vibriosis in turbot *Scophthalmus maximus* (L.) and sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). J. Fish Dis. 13, 369-376.
- Evelyn, T. P. T., 1984. Immunisation against pathogenic Vibriosis. In Symposium on Fish Vaccination. In: Symposium on fish vaccination. 'Theoretical Background and Practical Results on Immunization against Infectious Diseases. 20-22 February., O.I.E., Paris, pp. 121-150.
- Larsen J. İ., K. Pedersen, I. Dalsgaard, (1994). *Vibrio anguillarum* seovars associated with vibriosis in fish. J. Fish Dis. 17, 259-267.
- Pedersen K., L. Grisez, V. R. Houdt, T. Tiainen, F. Ollevier, J. L. Larsen, (1999). Extended serotyping schema for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-Serogroups. Current Microbiology, Vol.38, 183-189.
- Ricque, D., 1982. la vaccination Contre La Vibriose Des Salmonides. 1-104 These Doctorat Veterinaire-Alfort.
- Santos Y., F. Pazos, I. Bandin, A. E. Toranzo, 1995. Analysis of Antigens present in the Extracellular Products and Cell Surface of *Vibrio anguillarum* Serotypes O1, O2 and O3. Appl. Environ. Microb. 61;7 2493-2498.
- Sumbuloglu, K. (1978). Research Techniques and Statistics in Health Sciences. 1-230 Matis yayınları. Cag Matbaası, Ankara.
- Tanrikul, T. T., H. Çağırğan, E. Toksen, (1996). Bacterial Diseases of Fish. Bornova Vet. Kontr. ve Arast. Enst. Md. Derg. (Balık Hastalıkları Özel sayı) Cilt: 20 Sayı: 34, Sayfa: 105-127.
- Toranzo A., A. Baya, B. Roberson, J. L. Barja, D. Grimes, F. Hetrick, 1987. Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. Aquaculture 61, 81-97.
- Toranzo A. E., Y. Santos, J. L. Barja, 1997. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* Infections Gudding R., Lillehaug, A., Midtlyng P.J. Brown F. (eds): In: Fish vaccinology. Dev. Biol. Stan. Basel karger.