

Atlantik Salmonu (*Salmo salar* L., 1758)'nda Görülen *Sphaerospora truttae* (Sphaerosporidae: Myxozoa) Enfeksiyonunun Tedavisi Üzerine Bir Araştırma

Ahmet Özer

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 57000, Sinop, Türkiye.

Abstract: A study on the treatment of *Sphaerospora truttae* (Sphaerosporidae: Myxozoa) infections in Atlantic salmon (*Salmo salar* L., 1758). In this study that was started in July 1997, a treatment on the extrasporogenic stages of *S. truttae* using two different dosages of Monensin (25-50 mg kg⁻¹) and Metranidazole (25-50 mg kg⁻¹) and application of bath of Malachite Green (1.5 ppm) baths and Malachite Green (1.5 ppm) + Formaldehyde (20 ppm) baths to Atlantic salmon fingerlings weighing 2.5 – 3 g. was studied. The treatment was lasted for 7 days in all groups. Fish were examined in the intervals of 15 days and it was determined that Monensin (50 mg/kg) and Metranidazole (50 mg kg⁻¹) caused a delay in the appearance of the extasporogenic stages, while Malachite Green (1.5 ppm) and Malachite Green (1.5 ppm) + Formaldehyde (20 ppm) caused a decrease in the infection.

Key Words: *Salmo salar*, *Sphaerospora truttae*, Monensin, Metronidazole, treatment

Özet: Bu çalışmada Temmuz 1997 tarihinde *S. truttae*'ye ait ergin spor öncesi evrelerinin (extrasporogenic) neden olduğu enfeksiyonun tedavisi üzerine çalışıldı ve iki ayrı dozda (25 – 50 mg kg⁻¹) Monensin ve Metranidazole (25-50 mg kg⁻¹) yemlere katılarak, Malaşit Yeşili (1.5 ppm) ve Malaşit Yeşili (1.5 ppm) + Formaldehit (20 ppm) banyo şeklinde 2.5 – 3 g. ağırlığındaki salmon yavrularına 7 gün süreyle uygulandı. 15 günlük aralar ile balıklar incelendi ve Monensin (50 mg) ile Metranidazole (50 mg) nin extrasporogonik evreyi geciktirici bir etkiye sahip oldukları, bunun yanında Malaşit Yeşili (1.5 ppm) ile Malaşit Yeşili (1.5 ppm) + Formaldehit (20 ppm) karışımının ise enfeksiyonları azaltıcı etkiye sahip oldukları belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Salmo salar*, *Sphaerospora truttae*, Monensin, Metronidazole, kemoterapi

Giriş

Myxozoa filumuna ait parazitler balık enfeksiyonlarında en yaygın olarak görülen metazoanlardır. Mikzospör türlerinin çoğu psödokist oluşturan ve ardından balıkların çeşitli organlarında hasarlar meydana getiren hücreler arası (intercellular) yaşayan parazitlerdir. Alabalık çiftliklerinde yaygın olarak gözlenen ve dönme hastalığına (whirling disease) neden olan *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903 balık üretiminde ve üretim sistemlerinin geliştirilmesinde limitleyici

önemli faktörlerdendir (Lom ve Dykova, 1992). Bunun yanında, salmonlarda görülen proliferatif böbrek hastalığı (Proliferative Kidney Disease)'nın etmeni olan PKX ve sazan balıklarında görülen hava kesesi yangısının (Swimbladder Inflammation, SBI) etmeni olan *Sphaerospora renicola* Dykova and Lom, 1982 yine bu grup parazitlerdendir (Csaba *et al.* 1984; Kent ve Hedrick 1984; Molnar *et al.*, 1987). Bazı *Myxobolus*, *Kudoa*, *Myxidium* ve *Henneguya* türlerinde balıklarda enfeksiyon oluşturarak önemli kayıplara neden

oldukları bilinmektedir (Current ve Janovy, 1978; Copland, 1983; Egusa, 1985; Harrel ve Scot, 1985).

Balıkların myxozoan parazitlerinin biyolojileri üzerine son dönemlerde yapılan çalışmalarda, bu grup parazitlerin hayat devirlerini tamamlamak için sucul oligoket ve poliketlere bir ara konak olarak ihtiyaç duydukları ve şekil değiştirerek bir aktinospora dönüştükleri görülmüştür (Özer ve Wootten, 2000). Bu durum tedavi amaçlı çalışmaların aslında balıklar üzerinde yapılması yerine, ara konakçıların ortamdaki uzaklaştırılmasının gereğini ortaya koymuştur. Ancak, bu konuda yapılmış çalışmalar yeterli değildir.

Mikzospore grubu parazitlerin balıklarda tedavisi mümkün olmayan enfeksiyonlar oluşturdukları bir süre öncesine kadar kabul görmüştür. Bununla beraber bazı ilaçların balıkların tedavilerinde kullanılması çalışmaları da artmıştır. Balıklar üzerinde myxospore türü parazitlere karşı gerçekleştirilen tedavi amaçlı denemelerde Fumagilin, Toltrazuril, Proguanil, Clamoxyquin ve Metranidazole gibi kemoterapötikler yeme karıştırılarak ağız yoluyla balıklara verilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Molnar *et al.*, 1987; Szekely *et al.*, 1988; Molnar, 1989; Yokoyama *et al.*, 1990; Wishkovski, 1990; Von ve Müller, 1992). Bu çalışmada, metranidazole ve monensin (ilk defa) yemlere katılarak, malaşit yeşili ve formaldehit ise banyo şeklinde kullanılarak *S. truttae*'nin ergin spor öncesi (extrasporogenic) evresinin Atlantik salmon yavrularındaki tedavisi üzerine ön bir çalışma yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Başlangıç ağırlıkları 2.5–3 g olan Atlantik salmon yavruları %90 civarında *S. truttae* enfeksiyonunun ortaya çıktığı İskoçya'nın kuzeyindeki bir çiftlikten alınıp, Stirling Üniversitesi'ndeki

Parazitoloji Laboratuvarına getirildi. Her tedavi amaçlı denemede toplam 175 olan balıktan 25 adedi kullanılmış ve 10 lt. lik silindirik tanklarda deneme süresince tutulmuşlardır.

Balıklar günde 3 defa olmak üzere %40 protein içeren pelet yem (Biomar-U.K.) ile yemlendi ve tank tabanında toplanan atık yemler bir sifon ile ortamdaki uzaklaştırıldı. Balıklar 7 gün süre ile ilaçlı yemler ile beslendi ya da günde 30 dk. olmak üzere 7 gün süreyle banyoya tabi tutuldu.

Kilogram canlı ağırlığa 25 ve 50 mg olacak şekilde hazırlanan metranidazole (2-methyl-5-nitroimidazole-1-ethanol (C₆H₉N₃O₃) Rhodia Ltd. U.K.) balık yağı kullanılarak 5 dakika süre ile pelet yemle karıştırılıp homojenize edildi. Homojenizasyon oval şekilli metal bir kap içinde el mikseri yardımıyla sağlandı.

Kilogram canlı ağırlığa 25 ve 50 mg olacak şekilde hazırlanan monensin (Monensin-Na (C₃₆H₆₁O₁₁Na) Fisher Sci. Ltd. U.K.) balık yağı kullanılarak 5 dakika süre ile pelet yemle karıştırılıp homojenize edildi.

1.5 ppm malaşit yeşili (Merck Japan Ltd. U.K.) banyo şeklinde 7 gün boyunca günde 30 dk. süreyle uygulandı. 1.5 ppm malaşit yeşili ve 20 ppm formaldehit (Merck Japan Ltd. U.K.) karışımı hazırlandı ve balıklara 7 gün boyunca günde 30 dk. süreyle banyo şeklinde uygulandı. Kontrol grubundaki 25 adet balığa herhangi bir tedavi uygulanmadı ve araştırma süresince ilaçsız yem ile ve aynı oranlarda beslendi.

29.7.1997 tarihinde getirilen balıklardan 50 adedi enfeksiyon yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla incelendi. Bunun için balıklardan kan örnekleri ve böbreklerden ezme ve yayma preparatları hazırlanıp Rapi-Diff II boyama seti ile boyanarak hazırlanan preparatlar 40x lık objektif büyültmesinde incelendi. Bu büyültmede rastgele seçilen 25 mikroskop sahasında spor öncesi

evredeki parazitler sayılarak bir değerlendirme tablosu oluşturuldu. Buna göre;

- Dikkatli bakıldığında görülebilecek sayıda parazit (1)
1-2 parazit / her bir objektif alanı (2)
3-4 parazit / her bir objektif alanı (3)
5-6 parazit / her bir objektif alanı (4)
7-10 parazit / her bir objektif alanı (5)
Çok sayıda parazit / her bir objektif alanı (6)

Enfeksiyon yüzdesi de deneme süresince yapılan ara incelemelerde muayene edilen balıklardan enfekte balık sayısının incelenen balık sayısına oranını ifade etmektedir.

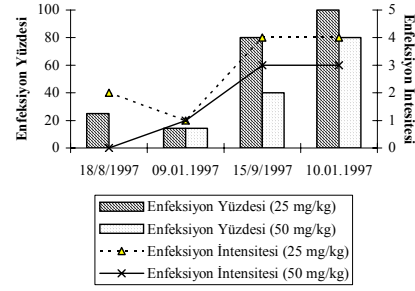
Tedavi amaçlı olarak kullanılan kemoterapötiklere ait tüm veriler, non-parametrik Dun's testi (StatGraph) uygulanarak istatistiksel olarak test edilmiştir.

Bulgular

Metronidazole ilave edilmiş yemlerle beslenen balıklarda enfeksiyonu geciktirici yönde bir etki gözlemlendi. Hem 25mg kg⁻¹ hem de 50 mg kg⁻¹ metronidazole kullanılan gruplarda gözlenen enfeksiyon oranları ve enfeksiyon yoğunluğu Şekil 1 de görülmektedir. Araştırmanın bitiminin ardından yapılan istatistiksel testler sonucunda hem 25 mg kg⁻¹ hem de 50 mg/kg metronidazole içeren yemlerle beslenen balıkların kontrol grubuna göre sırasıyla (P<0.05) ve (P<0.01) daha az enfeksiyon taşıdıkları belirlenmiştir. 25 mg/kg (canlı ağırlık) metronidazole katılan yemlerle beslenen balıklardan 2 adedi 20.8.1997 tarihinde ölü olarak bulundu. 50 mg kg⁻¹ (canlı ağırlık) metronidazole katılan yemlerde ise 3 adet balık 21-22.8.1997 tarihlerinde ölü olarak bulundu.

Monensin ilave edilmiş yemlerle beslenen balıklarda enfeksiyonu geciktirici bir etki yaptıkları kaydedildi ve

enfeksiyon yüzdeleri ile enfeksiyon yoğunluklarında zamanla bir artış gözlemlendi (Şekil 2). Araştırmanın bitiminin ardından yapılan istatistiksel testler sonucunda hem 25 mg kg⁻¹ hem de 50 mg/kg monensin içeren yemlerle beslenen balıkların kontrol grubuna göre sırasıyla (P<0.05) ve (P<0.01) daha az enfeksiyon taşıdıkları belirlenmiştir. 25 mg kg⁻¹ (canlı ağırlık) monensin katılarak hazırlanmış yemlerle beslenen balıklardan 5 adedi 20-21-22.8.1997 tarihlerinde ölü olarak bulundu. 50 mg kg⁻¹ (canlı ağırlık) monensin katılarak hazırlanan yemlerle beslenen balıklardan 3 adedi ise 21-22.8.1997 tarihlerinde ölü olarak bulundu.

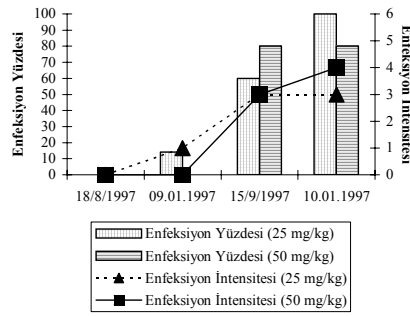


Şekil 1. Metronidazole katılarak hazırlanan yemlerle beslenen balıklardaki Enfeksiyon Yüzdeleri ve Ortalama Enfeksiyon İntensiteleri.

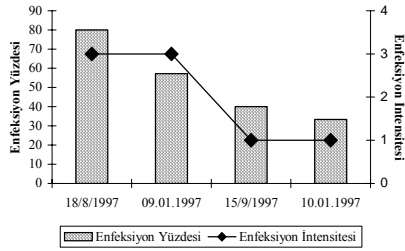
1.5 ppm malaşit yeşili kullanılarak yapılan banyo şeklindeki tedavide, enfeksiyon yüzdesi ve intansitesinde bir azalma gözlemlendi ve Şekil 3 te gösterildi. Araştırmanın bitiminin ardından yapılan testler sonucunda, malaşit yeşili banyosu uygulanan balıklar ile kontrol grubu balıklardaki enfeksiyon intansitelerinde istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmadığı belirlendi. İki adet balık 15.8.1997 tarihinde ölü olarak bulunmuştur. 1.5 ppm malaşit yeşili + 20 ppm formaldehit kullanılarak yapılan banyo şeklindeki tedavi uygulaması

sonucunda enfeksiyon yüzdesi ve intensitesinin azaldığı görüldü (Şekil 4).

Araştırmanın bitiminin ardından yapılan testler sonucunda, malaşit yeşili + formol banyosu uygulanan balıklar ile kontrol grubu balıklarındaki enfeksiyon intensiteleri arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olduğu ($P<0.05$) belirlendi. Üç adet balık 18-19-20.8.1997 tarihlerinde ölü olarak bulundu.



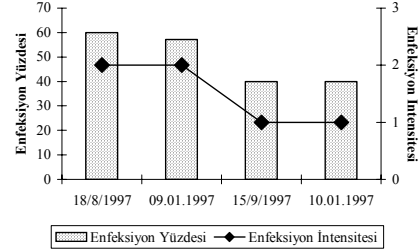
Şekil 2. Metronidazole katılarak hazırlanan yemlerle beslenen balıklardaki Enfeksiyon Yüzdeleri ve Ortalama Enfeksiyon İntensiteleri.



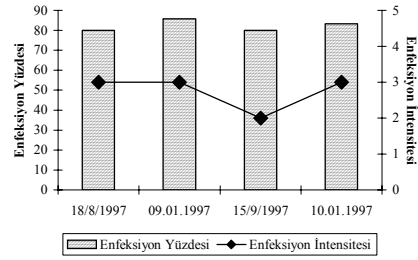
Şekil 3. 1.5 ppm Malaşit Yeşili kullanılarak hazırlanan solüsyonda banyo edilen balıklardaki Enfeksiyon Yüzdesi ve Ortalama Enfeksiyon İntensitesi.

Hiç bir tedavinin uygulanmadığı kontrol grubunda hem enfeksiyon yüzdesinin hem de intensitesinin deneme boyunca fazla değişmediği gözlemlendi.

(Şekil 5). İki adet balık 20/8/1997 tarihinde ölü olarak bulundu.



Şekil 4. 1.5 ppm Malaşit Yeşili ve 20 ppm Formaldehit kullanılarak hazırlanan solüsyonda banyo edilen balıklardaki Enfeksiyon Yüzdesi ve Ortalama Enfeksiyon İntensitesi.



Şekil 5. Herhangi bir tedavi uygulanmaksızın yemlenen kontrol grubu balıklardaki Enfeksiyon Yüzdesi ve Ortalama Enfeksiyon İntensitesi.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada kullanılan monensin, metranidazole ile malaşit yeşili ve formaldehitin salmonlarda (*S. salar*) doğal olarak ortaya çıkan *S. truttae* enfeksiyonlarının tedavisi üzerine yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar monensin ve metranidazole'un yemlere katılarak balıkların tedavi amaçlı beslenmesinde kullanılabileceğini, balıkların yemi almada bir sorun yaşamaksızın tükettiklerini ve iştahlarında herhangi bir azalmaya yol açmadıkları görülmüştür.

Ayrıca monensin ve metranidazole'un *S. truttae*'nin extrasporogenik evresinin tedavisinde enfeksiyon giderici hızlı bir etki yaptıkları, başlangıçtaki enfeksiyon azalmasına karşın, bir süre sonra enfeksiyon oranının arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan kemoterapötiklerin parazit üzerine etki mekanizmaları araştırılmamıştır. Ancak 7 günlük tedavinin ardından gözlenen hızlı enfeksiyon düşüşü ve birincil hücrelerin taşıdıkları ikincil ve üçüncül hücrelerin sayısındaki azalma bu kemoterapötiklerin enfeksiyonu durdurucu ve geciktirici etki yaptıklarını göstermektedir. Buna karşın malaşit yeşili ve formol kullanılan denemelerde ise enfeksiyon intensitesinin zamanla azaldığı kaydedilmiştir. Malaşit yeşili ve formolun etki ediş mekanizmaları da bu çalışmada çalışılmamıştır. Bununla beraber yemlere katılarak ağızdan verilen Fumagillin'in mikrospor grubu parazitlerde DNA ve RNA sentezini durdurucu veya azaltıcı etkiler yaparak parazitlerin gelişimini engelledikleri belirtilmektedir (Hartwig ve Przelecka, 1971; Jaronski, 1972).

Bu çalışmada kullanılan kemoterapötiklere ait dozlar arasında etki bakımından fazla bir farklılık olmamasına karşın, 50 mg kg⁻¹ lik dozajların biraz daha etkili oldukları kaydedilmiştir. Önemli bir nokta olarak, enfeksiyonun tedavisi amacıyla Temmuz ayında başlaması bir dezavantajdır. Özer (1999) *S. truttae* enfeksiyonlarının Haziran sonu ile Temmuz başında başladığını kaydetmiştir. Dolayısıyla, tedavi amaçlı denemelerin enfeksiyonun başladığı bu tarihten daha önce başlatılmasının daha etkili olabileceği düşünülebilir. Ayrıca kullanılan antibiyotikler ile malaşit yeşili ve formaldehitin dokulardaki birikiminin çalışılmasının gerekliliği de tedavi süresinin kısaltılmasına yol açabileceği gibi bu yolla dokulardaki birikimin de azalmasını sağlanabileceği söylenebilir.

Sonuç olarak, Monensin, Metranidazole, malaşit yeşili ve formaldehit *S. truttae* enfeksiyonlarının tedavisinde muhtemel bir potansiyele sahip olup, diğer mikrospor parazitleri üzerinde de denenmesinin bu maddeler hakkında daha da kapsamlı sonuçların alınmasını sağlayacaktır.

Kaynakça

- Copland, J. W., 1983. The pathology of *Myxidium giardi* Cepede, 1906 infections in wild and cultured eels, *Anguilla anguilla*. J. Fish Dis. 6, 451-460.
- Csaba, G., Kovacs-Gayer, E., Bekesi, L., Buscek, M., Szokolczai, J., ve Molnar, K., 1984. Studies into the possible protozoan aetiology of swimbladder inflammation in carp fry. J. Fish Dis. 7, 39-56.
- Current, W. L., ve Janovy, J., 1978. Comparative study of ultrastructure of interlamellar types of *Henneguya exilis* Kudo from channel catfish. J. Protozool., 25, 56-65.
- Egusa, S., 1985. *Myxobolus buri* n. (Myxosporea: Bivalvulida) parasitizing in the brain of *Seriola quinqueradiata*, Temmick et Shlegel. Fish Pathol., 19, 239-244.
- Harrel, L. W., ve Scot, T.M., 1985. *Kudoa thyristis* Gilschrist (Myxosporea: Multivalvulida) in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 8, 329-332.
- Hartwig, A., ve Przelecka, A 1971. Nucleic acids in intestine of *Apis mellifica* infected with *Nosema apis* and treated with fumagillin DCH: Cytochemical and autoradiographic studies. J. Invert. Pathol., 18, 331-336.
- Jaronski, S. T., 1972. Cytochemical evidence for RNA synthesis inhibition by fumagillin. J. Antibiotics., 25, 327-331.
- Kent, M. L., ve Hedrick R.P., 1984. PKX, the causative agent of Proliferative Kidney Disease (PKD) in Pacific Salmonid fishes and its affinities with the Myxozoa. J. Protozool., 31, 7.
- Lom, J. & Dykova, I., 1992. Myxosporidia. In: Protozoan Parasites of Fishes. Development in Aquaculture and

- Freshwater Science. Volume 26. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 315 pp.
- Molnar, K., 1989. Possible uses of Fumagillin against different fish parasites. Chinoin Pharmaceutical and Chemical Works Ltd. Budapest, Hungary, 1-4 sf.
- Molnar, K., Baska, F., ve Szekely, C., 1987. Fumagillin, an efficacious drug against renal Sphaerosporosis of the common carp, *Cyprinus carpio*. Dis. Aquat. Org., 2, 187-190.
- Özer, A., 1999. Studies on actinosporeans (Phylum: Myxozoa) from a salmon farm in Northern Scotland, with special reference to the actinosporean and myxosporean stages of *Sphaerospora truttae* Fischer-Scherl, El-Matbouli and Hoffmann, 1986. Doktora Tezi, 333 sayfa.
- Özer, A ve Wootten., R., (2000): The life cycle of *Sphaerospora truttae* (Myxozoa: Myxosporea) and some features of the biology of both the actinosporean and myxosporean stages. Disease of Aquatic Organisms, 40: 33-39.
- Szekely, C., Molnar, K., ve Baska, F., 1988. Efficacy of Fumagillin treatment against *Myxidium giardi* Cepede, 1906 infection of the European eel (*Anguilla anguilla*): New observations on myxidiosis of imported glass eels. Acta Vet. Hungarica. 36, 239-246.
- Von, G. F., ve Müller, W., 1992. Versuche zur Therapie der Schwimmblasenentzündung (renicola-Sphaerosporose) des Carpfens. Angew. Parasitol., 33, 79-90.
- Wishkovski, A., Groff, J. M., Lauren, D. J., Toth, R. J., ve Hedrick, R.P., 1990. Efficacy of fumagillin against proliferative kidney disease and its toxic side effects in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Fish Pathol., 25, 141-146.
- Yokoyama, H., Ogawa, K. ve Wakabayashi, H., 1990. Chemotherapy with Fumagillin and Toltrazul against Kidney Enlargement Disease of goldfish caused by the myxosporean *Hofereilus carassii*. Fish Pathol., 25, 157-163.