

## Lepistes Balıkları (*Poecilia reticulata*)'nda Maternal İmmunitenin Transferi

Ayşegül KUBİLAY, Mehmet Rüştü ÖZEN

Süleyman Demirel Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Eğirdir, Isparta - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 30.05.2002

**Özet:** Lepistes balıkları (*Poecilia reticulata*)'nda yavrulara pasif immunitenin transferinin belirlenmesi üzerinde bu araştırma yürütülmüştür. Anaç lepistesler, formalinle öldürülmüş ve *Aeromonas hydrophila* bakterini ile intraperitoneal enjeksiyonla immunize edilmişlerdir. Anaç lepistesler ve yavrularının vücut sıvılarında aglutinasyon antikor titreleri ve presipitasyon antikorları incelenmiştir. Maternal immunitenin *A. hydrophila* patojenine karşı koruma oluşturması test edilmiştir. Immunizasyonundan 4 hafta sonra 14'er adet immunize ve kontrol grubu yavrulara  $1 \times 10^7$  cfu/ml *A. hydrophila* patojenine 5 dakika maruz bırakılarak epruvasyon uygulanmıştır. Aglutinasyon antikor titresi anaçların immunizasyonundan 4 hafta sonra çıkan yavrularda 1/16'dan 1/32'ye yükselmiştir. İmmunize yavruların vücut sıvılarında eriyik *A. hydrophila*'ya karşı presipitin çizgileri görülmüştür. Epruvasyondan sonra, kümülatif mortalite kontrol grubu yavrularında (% 43) immunize yavrulardan (% 14) daha yüksek bulunmuştur. İmmunize yavrularda relatif koruma yüzdesi % 67 olarak saptanmıştır. Bu bulgular lepisteslerden yavrularına antikor transferini ve bu maternal transferin *A. hydrophila* patojenine karşı direnç sağladığını göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Maternal immunité, lepistes, *Poecilia reticulata*, antikor, *Aeromonas hydrophila*

### Transfer of Maternal Immunity in the Guppy, *Poecilia reticulata*

**Abstract:** An investigation was carried out to determine whether transmission of passive immunity from the mother to the fry occurred in the guppy, *Poecilia reticulata*. Female guppies were immunized by an intraperitoneal injection of formalin-killed *Aeromonas hydrophila* bacterin. Agglutinating antibody titers and the precipitating antibody in the body fluid of female guppies and their fry were investigated. The protection against the *A. hydrophila* pathogen by maternal immunity was also tested. Four weeks after immunization, 14 fry from immunized and nonimmunized females were challenged with 5-min exposure to a virulent *A. hydrophila* at dosages of  $1 \times 10^7$  cfu/ml. Agglutinating antibody titers in the fry increased, ranging from 1/16 to 1/32. Body fluid of the newborn fry showed a precipitin line against sonicated *A. hydrophila*. In the challenge, the cumulative mortality of fry from the control fish (43%) was higher than that of fry from immunized fish (14%). The relative percentage protection of fry from immunized females was 67%. The results suggest that the antibody was transmitted from the mother to the newborn fry and the transfer of maternal immunity provides resistance to *A. hydrophila* in the guppy.

**Key Words:** Maternal immunity, guppy, *Poecilia reticulata*, antibody, *Aeromonas hydrophila*

### Giriş

Ovovivipar üreme özelliği gösteren lepistes balıklarında, döllenmeden sonra yumurtalar yumurta kanalı içerisinde gelişir. Embriyonun burada vitellüs kesesini absorbe ettikten sonra açılarak, yavruların dışarı bırakıldığı bildirilmektedir (1-4).

İmmunité hayvanlarda enfeksiyonlara karşı korunmada en önemli bir fizyolojik mekanizmadır. Yeni yumurtadan çıkan larvalarda immun sistemin gelişimi esnasında antijenle uyarılara karşı etkin lenfosit hücreleri ve antikor üretimi kapasitesi sınırlıdır. Bu nedenle genç balıkların hastalıklara karşı dirençleri zayıftır (5-9).

Yüksek vertebralıların yavruları, annelerinden gelen pasif immunité ile donatılmış bir savunma sistemine sahiptir. Memelilerde bu immunitenin transferi, hem intrauterin yaşam sırasında plasenta aracılığı ve yumurta sıvısı ile hem de fetusun doğumdan sonra neonetal dönemde bağırsaklarına doğru klostrum akmasıyla başarılmaktadır. Bu pasif immunité; immun yeteneğin tamamen olgunlaşmadığı periyotta yeni doğmuş yavruların korunması için hayati önem taşır (5-8). Balıklarda maternal immunitenin transferi hakkında bilgi oldukça sınırlıdır. Özellikle maternal immunitenin transferi ile patojenlere karşı genç balıkların korunması ile ilgili araştırmalar çok azdır (6). Patojenlere karşı korunmak

için yavru balıklara pasif immunitenin transfer olup olmadığı ve ne kadar koruma oluşturduğu oldukça önemlidir (5,7,8). Bazı balıkların embriyo ve genç larva dönemlerinde maternal orijinli humoral maddelerin savunmada rol oynayabildikleri belirtilmektedir (5-7,9,10). C-reaktif protein benzeri presipitinler ve lektin benzeri aglutininleri içeren spesifik olmayan savunma faktörlerinin pek çoğu balık yumurtalarında tespit edilmiştir. Sazan ve pisi balıklarının yumurtasında immunoglobulin (Ig) bulunmuştur. Salmonidlerde ise immunoglobulinler görülmemiştir (9).

Çalışmada ovovivipar üreme özelliği gösteren anaç dişi lepistes balıklarına *Aeromonas hydrophila* bakterini enjekte edilerek lepistes yavrularında antikör transferi ve bu yavrulara virulent patojen ile eprüvasyon uygulanarak koruma immunitenin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Denemede 40 adet dişi, 20 adet erkek anaç lepistes balığı (*Poecilia reticulata*) kullanılmıştır. Araştırmanın başlangıcında kullanılan anaç balıklar paraziter, fungal ve bakteriyel açılardan incelenmiş ve mikrobiyolojik olarak patojen etken taşımadıkları tespit edilmiştir.

Denemede anaç balıklar, immunizasyon grubu ve immunize edilmeyen kontrol grubu için iki farklı akvaryuma erkek dişi oranı 1:2 olacak şekilde 30'ar adet konulmuştur. Yavru balıkların eprüvasyon uygulamasında ise 14'er adetten toplam 28 adet yavru balığın stoklandığı iki ayrı akvaryum kullanılmıştır. Akvaryumlarda daha önceden dinlendirilmiş çeşme suyu, otomatik ısıtıcılarla 26 °C'de sabit kalacak şekilde ısıtılarak ve hava motoru ile oksijen takviye edilerek kullanılmıştır. Balıklar deneme süresince Pınar Yem ve Pazarlama A.Ş.'den temin edilen 0,3-0,5 mm çapında ekstrude granül yem ile beslenmiştir.

Araştırmada Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Ana Bilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarında Japon balıklarından izole edilen *A. hydrophila* suşu kullanılmıştır. Suş Trypticase Soy Agarda (TSA) 22 °C'de 48 saat inkübe edilerek gençleştirilmiştir. *A. hydrophila* suşuna Gram boyama, hareketlilik, sitokrom oksidaz, O/F testleri yapılmış (11) ve ayrıca API 20E test sistemleri (Biomerieux- 20 100) kullanılarak biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir (12).

*A. hydrophila* suşu % 0,3'lük formaldehit ile 1 saat

oda sıcaklığında 24 saat + 4 °C'de inaktive edilmiştir. Elde edilen bu bakterin, koloni sayımı ile 10<sup>8</sup> cfu/ml olarak spektrofotometre (Shimadzu) ile 600 nm de 0,690 olarak belirlenmiştir (13).

İmmunizasyon için anaç dişi balıklar MS 222 ile bayıltılmış ve bakterin (sterilite kontrolü yapılmış) insülin enjektörü ile 0,1 ml intraperitoneal (i.p.) yolla verilmiştir.

İmmunize anaç ve kontrol grubu dişi anaçtan elde edilen 10'ar adet yavru balık 10 hafta boyunca, her hafta örnek alınarak fosfat buffer saline (PBS) içinde İKA marka homojenizatör ile homojenize edildikten sonra 6000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı antikör tespiti için -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

*A. hydrophila* antijeni ile immunize edilen anaç dişi balıkların 4. hafta elde edilen 1 günlük yavruları ile immunize edilmeyen (kontrol grubu) anaçlardan elde edilen 1 günlük 14'er adet yavru lepistes balıklarına koloni sayım metodu ile belirlenen 1 x 10<sup>7</sup> cfu/ml *A. hydrophila* patojeni 5 dakika banyo yolu ile eprüvasyon uygulanmıştır (13). Balıklarda enfeksiyon sonucu oluşan ölüm 15 gün süre ile günlük olarak kaydedilmiştir. Balıklardaki nispi koruma yüzdesi (Relative percentage protection, RPP) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (9,14).

$$RPP = \left( 1 - \frac{\text{İmmunize balık grubundaki mortalite (\%)}}{\text{Kontrol grubundaki mortalite (\%)}} \right) \times 100$$

Mikroaglutinasyon testi Roberson (15) tarafından bildirilen metoda göre yapılmıştır. Testte % 0,3'lük formaldehit ile inaktive edilmiş ve yoğunluğu 10<sup>8</sup> cfu/ml'ye ayarlanmış antijen kullanılmıştır. Alınan serumlardan 1/4'ten başlayarak iki katlı dilüsyonlar hazırlanmıştır.

İmmunodiffüzyon testinin uygulanması Ingram (16) tarafından bildirilen metoda göre yapılmıştır. Bu amaçla 1 g Noble Agar, 0,01 g NaN<sub>3</sub> (Sodyum azid), pH'sı 7,4 olan 100 ml PBS içinde hazırlanarak kaynayıcaya kadar ısıtılmış ve test ortamı olarak kullanılmıştır. Test antijeni olarak sonike edilen eriyik *A. hydrophila* antijen kullanılmıştır.

Dişi balıkların ovaryumlarından alınan doku örnekleri % 10'luk bufferlı formaldehit içerisinde tespit edildikten sonra rutin doku takip aşamalarından geçirilerek hazırlanan parafin bloklardan 5 µm inceliğinde alınan kesitler Hematoxylin-Eosin boyama yöntemi ile boyanmıştır (17,18).

## Bulgular

### Üreme Dönemindeki Anaç Balıklarda Histolojik Bulgular

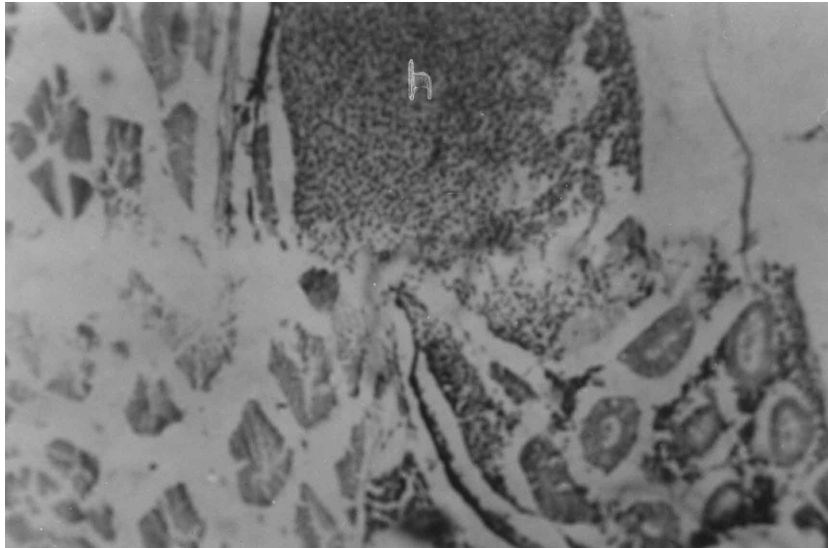
Dişi anaç balıkların gonadlarından alınan histolojik kesitler incelendiğinde yumurtalarda gelişen embriyolarda posterior böbrekte distal tübüller arasında melanin pigmentlerinin olduğu gözlenirken, larvada ilk kan üretim merkezlerinden olan anterior böbrekte hemapoietik dokunun geliştiği tespit edilmiştir (Şekil 1).

### *Aeromonas hydrophila* Suşu Re-izolatının Biyokimyasal özellikleri

*A. hydrophila* suşu TSA'da krem renkli koloniler oluşturmuştur. Çubuk şekilli, Gram negatif bu bakteriler hareketli, sitokrom oksidaz pozitif ve fermantatif özellik göstermiştir. API 20 E test sistemi sonuçları Tablo'da verilmiştir.

### İmmunize anaç Dişi Lepistes Balıkların ve İmmunize Yavru Balıkların Mikroaglutinasyon Test Sonuçları

*A. hydrophila* bakterini ile immunize edilen anaç lepestes balıklarından alınan haftalık örneklerde lam aglutinasyon testi yapılmış ve immunizasyondan sonra 2. haftadan itibaren 10. haftaya kadar aglutinasyon antikorlarının varlığı beyaz çökeleklerin görülmesi ile tespit edilmiştir (Şekil 2). İmmunize anaç balıklardan mikroaglutinasyon testinde 1. haftada aglutinasyon oluşmadığı, 2. haftada 1/8 dilüsyonda, 3. haftada 1/16 dilüsyonda, 4. ve 7. haftalarda 1/32, 8. ve 9. haftalarda 1/16 ve 10. haftada ise 1/8 dilüsyonda aglutinasyon gözlenmiştir. İmmunize yavruların vücut sıvılarından yapılan mikroaglutinasyon test sonuçlarına göre 1. hafta aglutinasyon oluşmadığı, 2. hafta 1/4, 3. hafta 1/16, 4. hafta 1/32, 5-7. haftalarda 1/16, 8. haftada 1/4, 9 ve 10. haftalarda 1/2 dilüsyonda aglutinasyon tespit edilmiştir (Şekil 3).

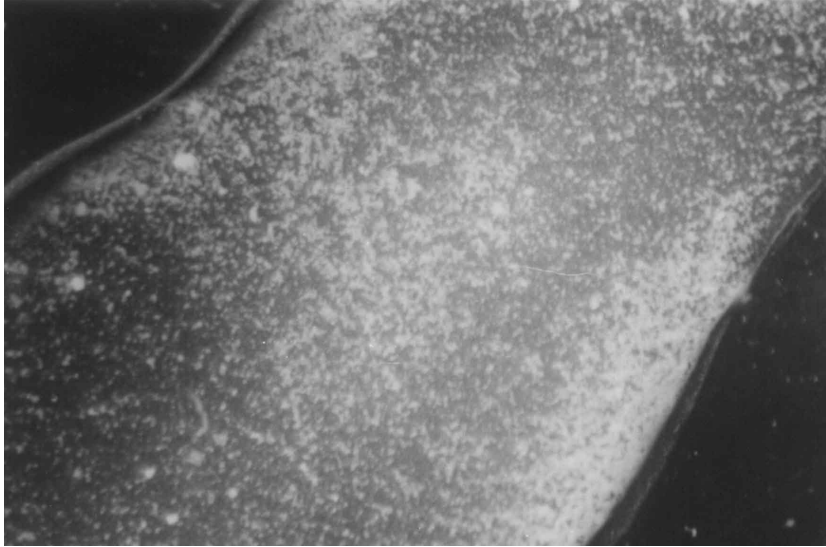


Şekil 1. Anaç Lepistes balıkları (*P. reticulata*) embriyolarının anterior böbreklerinde şekillenen hemapoietik doku (h) H+E X 40.

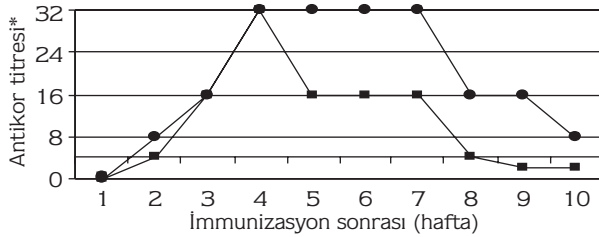
Tablo. A. *hydrophila* suşunun API 20 E Test Sistemi sonuçları.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-

1.ONPGβ-galaktosidaz, 2. ADH : Arjinin dihidrolaz, 3. LDC: Lizin dekarboksilaz, 4. ODC : Ornitin dekarboksilaz 5. CT: sitrat üretimi 6. H2S üretimi, 7. Üreaz üretimi 8. DA:Triptofande aminaz 9.IND: indol, 10. VP : Vogesproskauer reaksiyonu, 11. GEL : jelatin hidrolizi, 12. Glukoz, 13. Mannitol, 14. İnositol, 15. Sorbitol, 16. Rhamnoz, 17. Sakkaroz, 18. Melibiyoz, 19. Amygdalin, 20. Arabinoz



Şekil 2. *A. hydrophila* bakterini ile immunize lepidostichus balıklarında (*P. reticulata*) lam aglutinasyonda oluşan beyaz çökelekler.



Şekil 3. *A. hydrophila* bakterini ile immunize lepidostichus balıkları (*P. reticulata*) anaç (●) ve yavrularında (■) haftalık mikroaglutinasyon test sonuçları.

\* 1/4 den başlayarak 1/32 ye kadar iki katlı dilüsyon aralığı

### İmmunodiffüzyon Test Sonuçları

İmmunize dişi anaç lepidostichus ve bunlardan elde edilen yavruların immunizasyondan 3 hafta sonraki doku sıvıları ile eriyik *A. hydrophila* antijenine karşı presipitin çizgileri tespit edilmiştir (Şekil 4).

### İmmunize ve Kontrol Grubu Lepistes Yavrularında *A. hydrophila* ile Eprüvasyon Sonrası Koruyucu İmmunitenin Kontrolü

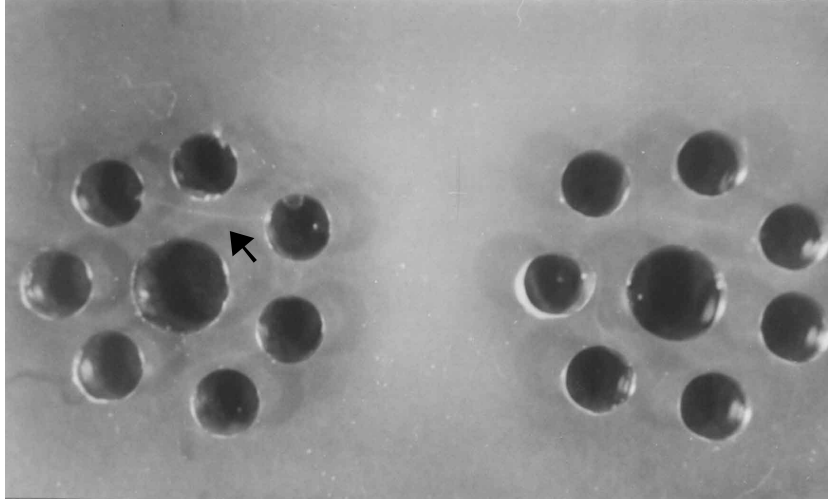
*A. hydrophila* antijeni ile immunize edilen anaç dişi balıkların 4. hafta elde edilen yavruları ile immunize edilmeyen 14 yavru balığa  $1 \times 10^7$  cfu/ml *A. hydrophila* patojeni ile banyo yolu ile eprüvasyon uygulanmıştır. İmmunize anaç balıktan elde edilen yavrulardan 2 adet, kontrol grubu yavru balıklarda 6 adet spesifik ölüm tespit

edilmiştir. İmmunize yavrularda mortalite % 14 iken kontrol grubunda % 43 olarak belirlenmiştir. Relatif koruma yüzdesi % 67 olarak saptanmıştır.

### Tartışma

Balıklarda antikor üreticisi böbrekler, lenfosit ve plazma hücreleri bakımından zengin hemopoietik dokuya sahiptir (19,20). Vivipar ve ovipar türlerin lenfoid organlarının farklılaşmaları sitolojik olarak incelenmiş timus ve pronefrozun vivipar türlerde ovipar türlere göre daha erken geliştiği, ayrıca vivipar türlerin embriyolarının immunolojik olarak yeterli seviyeye ulaşmalarının ovaryum içerisinde gerçekleştiği bildirilmiştir (5). Bly (5) ovaryum içerisindeki embriyonun immunolojik olarak verilen antijene karşı bir tepki verdiğini kaydetmektedir. Araştırmamızda, lepidostichusların böbreklerindeki hemopoietik dokuların gonadlarda iken geliştikleri tespit edilmiştir. Bu sonuç yavruların maternal immunitenin yanı sıra korumada ve antikor üretiminde immunolojik katkılarının olabileceğini göstermektedir.

Araştırmamızda, yavrularda en yüksek antikor titresi 4. haftada (1/32) tespit edilmiştir. *A. hydrophila*'nın Eğirdir suşu ile immunize edilen lepidostichuslardan elde ettiğimiz humoral immunité sonuçları Takahashi Kawahara (10)'nın sonuçlarını desteklemiştir. Takahashi Kawahara (10) immunize anaçlardan elde edilen lepidostichus



Şekil 4. İmmunize lepistes balıklarının (*P. reticulata*) doku sıvıları ile eriyik *A. hydrophila* antijenine karşı oluşan presipitin antikor çizgileri.

balıklarının 1 günlük yavrularında da maternal immunité transferini aglutinasyon ve presipitasyon antikorlarının varlığı ile tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda maternal immunitenin kontrolü eprüvasyon uygulaması ile belirlenmiştir. Eprüvasyon sonrası kontrol grubu ile immunize yavruların mortalite değerleri karşılaştırıldığında immunize yavrularda koruyucu immunitenin geliştiği ve relatif koruma yüzdesi % 67 olarak saptanmıştır. Mor ve Avtalion (7) tilapia balıklarında (*Oreochromis aereus*) anaç dişilerden embriyoya antikor transferini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yumurtlama sezonundan birkaç hafta önce dişi anaçların aşılmasının, embriyo ve larvalarını, immun sistemleri olgunlaşmaya kadar hayatlarının ilk dönemlerinde hastalıklara karşı koruduğu sonucuna varmışlardır (7).

Kawahara ve ark. (6), *A. salmonicida* toksitesi giderilen ekstrasellüler ürünleri ile *Salvelinus leucomaenis* anaçlarının immunizasyonun dan sonra bunlardan elde edilen yavrulara ve kontrol grubuna *A. salmonicida* patojeni ile eprüve edilen balıklarda kümülatif mortalite

oranının kontrol grubu yavrularında (% 28), immunize yavrulardan (% 4) daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar *Salvelinus leucomaenis* balıklarında maternal immunitenin *A. salmonicida* patojenine karşı direnç sağladığını bildirmişlerdir.

Bazı balık türlerinde yumurta ve genç bireylere maternal Ig'lerin transferinin varlığı nedeniyle anaç dişilerin aşılması ile genç larva ve yavruların pasif olarak immun hale getirilebilmesi ve maternal orijinli spesifik korunma mekanizmasının etkisi önem arz etmektedir (6,7).

Mevcut çalışmada, immunize anaçlardan yeni doğmuş lepistes yavrularında aglutinasyon ve presipitasyon antikorlarının varlığı, maternal immunitenin lepistes balıklarında transfer olduğu sonucuna varılmıştır. Maternal orijinli pasif immunitenin bu balıklarda mevcut olduğu ve koruma sağladığı da belirlenmiştir.

Bu sonuç, lepisteslerde anaç balıktan yavruya antikor aktarımından faydalanarak, yapılacak aşı uygulamaları ile yavru döneminde meydana gelen kayıpların azaltılabileceğini göstermektedir

## Kaynaklar

1. Andrews, C.,Baensch,U.: Tropical Aquarium Fish. Tetra Press, Germany. 1993.
2. Axelrod, H.R.: Breeding Aquarium Fishes a Complete Introduction. T.F.H Publications. Boston.1995.
3. Albaz, A.: Akvaryum Tekniği ve Balıkları. Acargil Matbaası , İzmir. 1984.
4. Geldiay, R.: Akvaryum (Kuruluşu-Malzemesi-Bitkileri-Balıkları ve Bakımı), Bilgehan Basımevi, Bornava İzmir. 1985.



5. Bly, E.: The Ontogeny of Immunity in Teleost Fishes with Particular Reference to Foeto-maternal Relationships. PhD Dissertation. The British Library Document Supply Center Boston Spa. Wetherby. West Yorkshire United Kingdom.1984.
6. Kawahara, E., Inorimori, T., Urano, S., Namura, S., Takahashi, Y.: Transfer of maternal immunity of white spotted char (*Salvelinus leucomaenis*) against frunculosis. Nippon Suisan Gakkaishi.1993; 59: 567.
7. Mor, A., Avtalion, R. R.: Transfer of antibody activity from immunized mother to embryo in tilapias. J. Fish Biol., 1990; 37: 249-255.
8. Arda, M.: Neonatal Bağışıklık. In: Arda, M. Minbay, A., Aydin, N., Akay, Ö., İzgür, M., Diker, S., Eds. İmmunoloji. Medisan Yayınevi. Ankara, 1994; 113-119.
9. Ellis, A.E.: Ontogeny of the Immune System in Teleost Fish. In: Ellis, A. E., Ed. Fish Vaccination. Academic Press Ltd. London,1988; 20-32.
10. Takahashi, Y., Kawahara, E.: Maternal immunity in new born fry of the ovoviviparus guppy, Nippon Suisan Gakkaishi, 1987; 53: 721-725.
11. Aoki, T.: Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*) In: Woo, P.T.K., and Bruno, D.W., Eds. Fish Diseases and Disorders. Vol. 3 Viral Bacterial and Fungal Infections. CABI Publish, UK, 1999; 427-455.
12. Austin, B., Austin, D.A.: Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish. Third (Revised) Edition. Praxis Publishing Chichester UK. 1999.
13. Stevenson, R.M.W.: Vaccination Against *Aeromonas hydrophila* In: Ellis, A.E., Ed. Fish Vaccination. Academic Press Ltd. London 1988; 112-124.
14. Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R., Raa, J.: Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisia* cell walls. J. Fish Dis., 1990; 13: 391-400.
15. Roberson, B.S.: Bacterial Agglutination. In: Stolen, J., Ed. Techniques in fish immunology. SOS Publication, USA. 1993; 81-87.
16. Ingram, G.A.: Diffusion in Gel Techniques. In : Stolen, J., Ed. Techniques in Fish Immunology. SOS Publication, USA. 1993; 45-57.
17. Presnell, J.K., Schreiberman, M.P.: Animal Tissue Techniques. John Hopkins Universty Pres. Baltimore & London. 1997.
18. Bancroft, J.D., Stevens, A., Turner, D.R.: Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, New York. 1996.
19. Ellis, A.E: The Immunology of Teleosts. In: Roberts, R.J., Ed. Fish Pathology. Bailliere Tindall, London. 1989; 135-153.
20. Tatner, M.F.: Natural Changes in the Immun System of Fish. In: Iwama, G., Nakanishi, T., Eds. The Fish Immun System Organism, Pathogen and Environment. Academic Pres, London,1996; 255-289.