

**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**PATOLOJİ (VETERİNER)**  
**DOKTORA PROGRAMI**

**AEROMONAS VERONİİ İLE**  
**DOĞAL ENFEKTE LEVREKLERDE**  
**PATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL**  
**BULGULAR**

**EMRE BERKE**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Nihat TOPLU**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-21028 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2022**

## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenim sürecinin her aşamasında ve bu çalışmanın ortaya konmasında bana yardımcı olan, ilgi ve uyarıları ile bilgilerini paylaşarak yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nihat TOPLU'ya emekleri ve yardımları için teşekkür ederim. Doktora eğitimi boyunca katkıları ve önerilerini esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Recai TUNCA, Prof. Dr. Şule Yurdağül ÖZSOY, Prof. Dr. Hamdi AVCI ve Öğretim Üyesi Dr. Tuğrul EPİKMEN'e ve Araştırma Görevlisi Dr. Emrah İPEK'e teşekkür ederim. Doktora tez çalışmam sürecinde bütün laboratuvar uygulamalarında yardımlarını benden esirgemeyen Araştırma Görevlisi Dr. Ayşe Nur AKKOÇ'a ayrıca teşekkür ederim. Diğer yandan, bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyon aşamalarında laboratuvar, bilgi ve deneyimlerini bu tez çalışmasına aktaran Prof. Dr. Halil BIYIK ve Dr. Öğretim Üyesi Bahadır TÖRÜN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamda kullanılan numunelerin sağlanmasında yardımcı olan tüm veteriner hekim meslektaşlarıma, sektör yönetici ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm doktora öğrenim dönemi boyunca çalışmalarımın desteğini eksik etmeyen değerli yöneticilerim Anıl KAYA, Aykan Bora ŞEN ve çalışma arkadaşım Serdar REÇBER'e katkı ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan, her koşulda desteklerini ve güvenlerini hissettiğim sevgili aileme de ayrıca teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
RESİMLER DİZİNİ .....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Etiyoloji .....	5
2.2. Epizootiyoloji .....	6
2.3. Patogenez.....	10
2.4. Bulgular .....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Gereç.....	21
3.2. Yöntem .....	21
3.3. İmmunohistokimya.....	27
3.3.1. İmmunohistokimya İçin Antiserum Üretimi .....	27
3.3.2. Serum Aglütinasyon Testi .....	28
3.3.3. İmmunohistokimyasal Metot.....	29
3.4. Histopatolojik İnceleme.....	30

3.5. Ziehl-Neelsen Boyama .....	30
3.6. Brown-Hopps Boyama .....	31
4. BULGULAR .....	32
4.1. Nekropsi Bulguları .....	32
4.2. Bakteriyolojik Bulgular .....	35
4.3. Histopatolojik Bulgular .....	42
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular .....	59
5. TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	72
KAYNAKLAR.....	74
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	84
ÖZ GEÇMİŞ.....	85

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Act</b>	: Aerolizin ilişkili toksin
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b>bp</b>	: Baz çifti
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b>bv</b>	: Biyovar
<b>C3b</b>	: Komplement komponent 3
<b>CA</b>	: Kolanik Asit
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>HE</b>	: Hematoksilen Eozin boyama
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>HE</b>	: Hematoksilen Eozin
<b>IL-6</b>	: İnterlökin 6
<b>IL-8</b>	: İnterlökin 8
<b>LSAB</b>	: Labeled Streptavidin-Biotin Metot
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu</math>M</b>	: Mikromol
<b>mA</b>	: Miliamper
<b>MAPK</b>	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
<b>MAS</b>	: Motil Aeromonas Septisemi
<b>mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür

<b>NF-κB</b>	: Nükleer Faktör-KappaB
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu salin
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PNAG</b>	: Poli β-1,6-N-asetil-D-glukozamin
<b>rpm</b>	: Devir/dakika
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>spp</b>	: Çeşitli Türleri
<b>sp</b>	: Türleri
<b>subsp</b>	: Alt Türleri
<b>T3SS</b>	: Tip 3 Sekresyon Sistemi
<b>T6SS</b>	: Tip 6 Sekresyon Sistemi
<b>TLR5</b>	: Toll Benzeri Reseptör
<b>TNF-a</b>	: Tümör Nekroz Faktörü a
<b>TCBS</b>	: Tiyosülfat-Sitrat-Safra-Sükroz Agar
<b>TSA</b>	: Triptik Soy Agar
<b>V</b>	: Volt

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Aeromonas enfeksiyonlarında patojenik faktörler.....	11
Şekil 2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> ve <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da polar flagellar genlerin genetik dizilişi.....	16
Şekil 3. Olgu no 1 - 12 ile levrekten Türkiye'de izole edilen ve Yunanistan'da izole edilen izolatların 16srRNA sekansları baz alınarak Mega11 programı ile Maximum Composite Likelihood Methoduna göre 1000 bootstrap çoğaltması ile hazırlanmış filogenetik sınıflandırması.....	42



## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Açık denizde yüzer kafeslerde çipura ve levrek yetiştiriciliği.....	3
<b>Resim 2. (a)</b> 3 kere PBS ile yıkanıp 6.500 rpm'de santrifüj edildikten sonra elde edilen inaktif bakteriler, <b>(b)</b> %1'lik formol solüsyonuna alınan bakteri kolonileri ile hazırlanan solüsyon. ....	28
<b>Resim 3.</b> Serum aglütinasyon testi.....	29
<b>Resim 4.</b> Deri üzerinde yaklaşık 2 cm çapında ülserli bölge. Olgu no: 6. ....	32
<b>Resim 5.</b> Dalakta çok sayıda granülomlar. Olgu no: 17. ....	34
<b>Resim 6.</b> Böbrekte çok sayıda granülomlar. Olgu no: 13. ....	34
<b>Resim 7.</b> Kalp üzerinde granülomlar. Olgu no: 6. ....	35
<b>Resim 8.</b> Gram boyamada, Gram negatif, çubuk şekilli bakteri morfolojisi. ....	36
<b>Resim 9. (a) ve (b)</b> Çok sayıda makrofaj kümelenmelerinden oluşan I. evre granülom. Kranial böbrek, olgu no:4, HE. ....	44
<b>Resim 10. (a) ve (b)</b> Makrofajlar arasında tek tük lenfositleri de içeren II. Evre granülom. Karaciğer, olgu no: 18, HE. ....	48
<b>Resim 11. (a) ve (b)</b> Granülomun merkezindeki makrofajların nekroze olmaya başladığı III. evre granülom. Karaciğer, olgu no: 6, HE. ....	49
<b>Resim 12.</b> IV. evre granülomları içeren konglemere granülom yapısı. Dalak, olgu no: 17, HE. ....	51
<b>Resim 13. (a) ve (b)</b> Ortada kazeifiye nekroz odağını çevreleyen sağlam makrofaj hattı ve en dışta bağdoku kapsülü. IV. evre granülom. Kranial böbrek, olgu no: 13, HE. ....	53
<b>Resim 14.</b> Nonpurulent interstisyel nefritis ve II. evre granülom morfolojisi. Kaudal böbrek, olgu no: 6, HE. ....	54
<b>Resim 15.</b> Küçük büyüklü ve birbirine neredeyse bitişik şekilde şekillenmiş IV. evre granülomlar. Deri, olgu no:19, HE. ....	55
<b>Resim 16.</b> Lenfosit, makrofaj hücre infiltrasyonları ile karakterize fibrinli perikarditis. Kalp, olgu no: 13, HE. ....	56
<b>Resim 17.</b> Meninkste şekillenen IV. evre granülom. Beyin, olgu no: 14. HE. ....	57
<b>Resim 18.</b> III. Evre granülom. Gonad, olgu no: 5, dişi, HE. ....	58
<b>Resim 19.</b> Kazeifiye nekroz alanı içeren IV. Evre granülomlar. Gonad, olgu no: 19, dişi, HE. ....	58

- Resim 20.** Bir granülomda çoğunluğu makrofaj sitoplazmalarında ve daha nadir olarak da nekrotik içerikte immunpozitif reaksiyonlar. Dalak, olgu no: 13, LSAB.....60
- Resim 21.** Yeni şekillenmekte olan granülomlarda ve infiltre makrofajların sitoplazmalarında immunpozitif reaksiyonlar. Kranial böbrek, olgu no: 9. LSAB. ....60
- Resim 22.** Bir granülomun merkezinde makrofajlarda ve nekrotik içerikte serbest halde bakteriyel antijen pozitif reaksiyonlar ile granülom çevresinde tek tük makrofajlardaki immunpozitiflik. Karaciğer, olgu no: 18, LSAB.....61
- Resim 23.** (a) ve (b) Bir granülomda makrofajlarda ve nekrotik içerikte immun pozitif reaksiyonlar. Solungaç, olgu no: 19., LSAB.....62
- Resim 24.** Konglemere granülomlardaki immunpozitif reaksiyonlar. Deri, olgu no: 19, LSAB. ....64
- Resim 25.** Kas katmanındaki granülomlardaki immunpozitif reaksiyonlar. Kas, olgu no: 14, LSAB. ....64
- Resim 26.** V. Evre granülomdaki immunpozitif reaksiyonlar. Kaudal böbrek, olgu no: 6, LSAB. ....65

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Ülkemizde 2014-2020 yılları arasında üretilen balık miktarları (FEAP, 2021). .....	2
<b>Tablo 2.</b> Dünyada 2014-2020 yılları arasında üretilen levrek miktarları (FEAP, 2021). .....	2
<b>Tablo 3.</b> Levreklerde granülomlarla seyreden hastalıkların bazı morfolojik ve biyokimyasal farklılıkları.....	4
<b>Tablo 4.</b> Farklı balık türlerinden izole edilen Aeromonas türleri. ....	8
<b>Tablo 5.</b> Çalışma olgularını oluşturan hayvanlara ait bilgiler. ....	22
<b>Tablo 6.</b> DNA izolasyonu için kullanılan materyal bilgileri. ....	23
<b>Tablo 7.</b> PCR reaksiyonu için kullanılan materyal bilgileri. ....	24
<b>Tablo 8.</b> PCR reaksiyonu için kullanılan mastermix bilgileri .....	24
<b>Tablo 9.</b> PCR reaksiyonu için kullanılan primer bilgileri.....	24
<b>Tablo 10.</b> PCR reaksiyonu koşulları.....	24
<b>Tablo 11.</b> PCR clean-up reaksiyonu için kullanılan materyal bilgileri.....	25
<b>Tablo 12.</b> PCR clean-up reaksiyonu için kullanılan mastermix bilgileri.....	25
<b>Tablo 13.</b> PCR clean-up reaksiyonu koşulları. ....	25
<b>Tablo 14.</b> DNA dizileme için kullanılan mastermix bilgileri. ....	26
<b>Tablo 15.</b> DNA dizileme reaksiyon koşulları. ....	26
<b>Tablo 16.</b> Tüm izolatlarda görülen ortak fenotipik özellikler.....	37
<b>Tablo 17.</b> API 20E biyokimyasal test sonuçları. ....	38
<b>Tablo 18.</b> VITEK-2 biyokimyasal test sonuçları.....	39
<b>Tablo 19.</b> 16S rRNA sekans datalarının BLASTN 2.13.0+ programında değerlendirilmesi. ....	41
<b>Tablo 20.</b> Olgulara göre granülom görülen organlar. ....	45

## ÖZET

### AEROMONAS VERONİİ İLE DOĞAL ENFEKTE LEVREKLERDE PATOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

**Berke E. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Patoloji (Veteriner) Doktora Tezi, Aydın, 2022.**

**Amaç:** Bu araştırma *Aeromonas veronii* ile doğal enfekte levreklerde, makroskopik, histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak enfeksiyonunun nasıl bir yayılım, yoğunluk gösterdiğini araştırmak amacı ile yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada; *Aeromonas veronii* ile enfekte 22 adet levrek makroskopik, bakteriyolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Histopatolojik incelemelerde rutin HE boyamanın yanı sıra, Ziehl-Neelsen ve Brown-Hopps boyamalar yapılmıştır. İmmunohistokimya için Yeni Zelanda Albino tavşanı kullanılarak poliklonal antikor üretilmiş olup, bakteriyolojik incelemede ise sekans analizleri, API 20E ve VITEK-2 analizleri uygulanmıştır.

**Bulgular:** Elde edilen bakterilerin sekans dataları gen bankasında eşleştirildiğinde bakterilerin *Aeromonas veronii* ile %96-98 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği görülmüştür. Histopatolojik olarak ise granülomlar en dikkat çekici bulgu olmuştur. İmmunohistokimyasal veriler bakterinin granülomlarda çoğunlukla makrofaj sitoplazmalarında yer aldığını ve yeni generasyonlarını bu hücrelerde şekillendirdiğini göstermektedir.

**Sonuç:** Nekropsi ve histopatolojik bulguların ayırıcı tanıda yetersiz kalması, bakteriyolojik kültürü takiben kimyasal ve moleküler metodların ise uzun bir sürece yayılması tanıda gecikmelere yol açabileceği sonucunu doğurmuştur. Bu yüzden immunohistokimyasal metodların da tanıya eklenmesi gerektiği sonucu doğmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Aeromonas veronii*, Bakteriyoloji, Histopatoloji, İmmunohistokimya, Levrek

## ABSTRACT

### PATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FINDINGS OF NATURALLY INFECTED EUROPEAN SEA BASS BY AEROMONAS VERONII

**Berke E. Aydin Adnan Menderes University Institute of Medical Sciences Pathology (Veterinary) Department PhD Thesis, 2022.**

**Objective:** This study was carried out to investigate the extent and intensity of the macroscopic, histopathological and immunohistochemical infection in naturally infected sea bass with *Aeromonas veronii*.

**Material and Methods:** In this study; 22 European sea bass infected with *Aeromonas veronii* were examined macroscopically, bacteriologically, histopathologically and immunohistochemically. Ziehl-Neelsen and Brown-Hopps stainings were performed in addition to routine HE staining in histopathological examinations. Polyclonal antibody was produced using New Zealand Albino rabbit for immunohistochemistry, and sequence analyzes, API 20E and VITEK-2 analyzes were applied in bacteriological examination.

**Results:** When the sequence data of the obtained bacteria were matched in the gene bank, it was observed that the bacteria showed similarity with *Aeromonas veronii* at rates varying between 96-98%. Histopathologically, granulomas were the most striking finding. Immunohistochemical data show that bacteria are mostly located in macrophage cytoplasm in granulomas and form new generations in these cells.

**Conclusions:** The inadequacy of necropsy and histopathological findings in the differential diagnosis, and the spread of chemical and molecular methods over a long period of time following bacteriological culture have resulted in delays in diagnosis. Therefore, it was concluded that immunohistochemical methods should be added to the diagnosis.

**Key words:** *Aeromonas veronii*, Bacteriology, Histopathology, Immunohistochemistry, European Sea Bass

# 1. GİRİŞ

Türkiye balık üretiminde yıllık 310.800 ton ile Avrupa'da Norveç'ten sonra ikinci sırada yer almaktadır (Resim 1). Bu üretimin 95.000 tonunu Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*) oluşturmaktadır (Tablo 1) (The Federation of European Aquaculture Producers [FEAP], 2021). Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*), Akdeniz su ürünleri yetiştiriciliğinde ekonomik olarak önemli bir türdür (Cardia ve Lovatelli, 2007) ve bu balık türünün en büyük üreticisi Türkiye olup bunu Yunanistan, Fransa ve İspanya takip etmektedir (Tablo 2) (FEAP, 2021).

Bulaşıcı hastalıklar, sadece balık kayıplarıyla ilgili doğrudan finansal maliyetler yoluyla değil, aynı zamanda hastalık yönetimi uygulamalarıyla ilgili dolaylı maliyetler ve ürün değerinin amortismanı yoluyla da kültür balıkçılığı endüstrilerini tehdit etmektedir. Potansiyel hastalık ajanları arasında bakteriyel patojenler en sık karşılaşılanlardır (Lafferty ve diğerleri., 2015; Meyer, 1991).

Akdeniz havzasında tanımlanan yeni patojenlerin sayısı zamanla hızla artmıştır ve *Aeromonas* türleri, deniz balıklarındaki en yaygın bulaşıcı hastalıklardan biri olarak ön plana çıkmaktadır (Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021).

*Aeromonas* cinsi (*Aeromonadaceae* familyası, *Gammaproteobacteria* sınıfı), su ortamlarında otokton olarak kabul edilen ve son zamanlarda önemi artan patojenler olarak kabul edilmekle birlikte balıklar ve insanlar da dahil olmak üzere birçok hayvan türünde çok sayıda hastalığa neden olan bakterileri içermektedir (Sreedharan ve diğerleri, 2013). *Aeromonadlar* olarak adlandırılan bu bakteriler suda serbest olarak yaşayabilirler, çeşitli su hayvanlarında sindirim sisteminde yaşayan ve patojenik etki göstermeyen ya da önemli patojenler olarak iki gruba ayrılırlar (Hanson ve diğerleri, 2019).

Balıklarda *Aeromonas* cinsi bakterilerin neden olduğu hastalığa *Motil Aeromonas Septisemi* (MAS) denir. Bu patojenler aynı zamanda amfibilerde, sürüngenlerde, kuşlarda ve insanlar dahil memelilerde önemli bir hastalık nedenidir. Hareketli *Aeromonadlar*, tüm tatlı su ve acı su balık türlerini enfekte eder ve balık kültürü operasyonlarında önemli ekonomik hasara neden olur (Hanson ve diğerleri, 2019).

Levreklerde *Aeromonas veronii* ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen klinik bulgulara göre, hastalıktan etkilenen ana organlar dalak, karaciğer ve böbrek olarak

bulunmuştur (Smyrli ve diğeri, 2017). Dalakta, organın yüzeyi boyunca çok sayıda beyaz nodül ve büyüme tespit edilmiş olup, ilerlemiş vakalarda, böbrek parankiminde büyük ölçüde görülebilen yaygın nekroz varlığı ile böbreğin de büyüdüğü bildirilmiştir. Karaciğerde nekrotik odaklar ve yaygın kanamalar gözlenmiştir (Smyrli ve diğeri, 2017; Dinçtürk ve Tanırkul, 2021). Karında şişkinlik, baş ve ağız çevresinde özellikle üst ve alt çenede kanamalar, operkulum, vücudun ventral tarafında ve anüs çevresinde ülseratif lezyonlar tespit edilmiştir (Dinçtürk ve Tanırkul, 2021).

**Tablo 1.** Ülkemizde 2014-2020 yılları arasında üretilen balık miktarları (FEAP, 2021).

Üretim Miktarları (Ton)							
Balık Türü	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Alabalık	107.533	101.550	100.300	100.500	110.000	95.000	95.000
Levrek	74.653	77.000	72.342	84.000	75.000	105.000	95.000
Çipura	41.873	48.000	67.612	72.000	83.000	99.000	110.000
Türk Somonu	4.812	5.450	5.000	7.000	11.000	8.000	7.500
Granyöz	3.281	2.000	2.500			3.300	3.300
<b>Toplam Üretim</b>	<b>232.152</b>	<b>234.000</b>	<b>247.754</b>	<b>263.500</b>	<b>279.000</b>	<b>310.300</b>	<b>310.800</b>

**Tablo 2.** Dünyada 2014-2020 yılları arasında üretilen levrek miktarları (FEAP, 2021).

Üretim Miktarları (Ton)							
Ülke	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Türkiye	74.653	77.000	72.342	84.000	75.000	105.000	95.000
Yunanistan	42.000	45.000	46.000	44.000	45.500	55.200	52.000
İspanya	17.376	21.324	23.445	21.269	22.460	27.335	22.886
İtalya	6.500	6.450	6.800	5.600	7.300	7.000	7.400
Hırvatistan	3.215	4.075	5.310	5.616	6.220	6.089	6.637
Fransa	2.021	1.980	1.928	1.945	1.433	2.123	2.100
Kıbrıs	1.817	1.725	1.442	1.500	1.500	2.836	2.500
Portekiz	400	297	427	701	200	882	500
<b>Toplam Üretim</b>	<b>147.982</b>	<b>157.851</b>	<b>157.694</b>	<b>164.631</b>	<b>159.613</b>	<b>206.465</b>	<b>189.023</b>



**Resim 1.** Açık denizde yüzer kafeslerde çipura ve levrek yetiştiriciliği.

Levreklerde yapılan histopatolojik incelemelerde ise kronik granümatöz inflamasyon ile karakterize sistemik bir enfeksiyon dikkati çekmiştir. İncelenen böbrek, karaciğer, dalak ve kas dokularının tümünde lezyonlar görülmüştür. Birkaç lezyon nekrotik ve kalsifiye olurken, granülomların sıklıkla çubuk şekilli bakteri odaklarını içerdiği, deri lezyonlarında kazeöz nekroz belirginken, karaciğerde sıklıkla iyi sınırlı nekrotik lezyonlar bulunduğu ve bakterilerin böbrekte granümatöz olmayan alanlarda da gözlendiği bildirilmiştir (Smyrli ve diğerleri, 2017).

Levreklerde granülomlarla seyreden diğer hastalıklar *Fotobakteriyozis* ve *Mikobakteriyum* enfeksiyonlarıdır. Bu bakteriler arasındaki bazı morfolojik ve biyokimyasal farklılıklar Tablo 3'te özetlenmiştir.

*Fotobakteriyozis* ya da 'balık pastörellozisi', *Vibrionaceae* ailesinin bir üyesi olan, Gram negatif ve halofilik bakteri *Photobacterium damsela subsp. piscisida* tarafından meydana gelmektedir (Osorio ve diğerleri., 2000). Bakteri hareketsiz, Gram negatif, bipolar çubuk şeklinde, oksidaz ve katalaz pozitif, fermentatiftir ancak oksidasyon fermentasyonu (O/F) glukoz ortamında gaz üretimi yoktur ve vibriostatik ajan 0/129'a duyarlıdır (Magarinos ve diğerleri., 1996). *Fotobakteriyozis*, geniş konakçı yelpazesi, yüksek ölüm oranı ve her yerde bulunan dağılımı nedeniyle dünya çapında kültür balıkçılığında en tehlikeli bakteriyel hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir (Barnes ve diğerleri., 2005). Farklı dokularda ve fagositlerin içinde bulunan bakteriler hastalığın akut ve kronik formlarını meydana getirirler. Akut formda multifokal nekrozlar karaciğer, dalak ve böbrekte meydana gelir ve bakteriler,

fagositler, kılcal damarlar ve intersitisyumda birikim gösterirler. Kronik lezyonlar iç organlarda, yaklaşık 0.3-0.5 mm çaplı beyaz tüberküllerin varlığı ile karakterizedir (Magarinos ve diğerleri., 1996).

*Mikobakteriyozis* veya "*balık tüberkülozu*", tüm dünyada teleost balıkları etkileyen kronik progresif bir hastalıktır. Etken, zayıf Gram pozitif, aerobik, aside dirençli ve hareketsiz ve çubuk şeklindedir. *Mycobacterium marinum*, tatlı su, acı su ve tuzlu su ortamlarında balıkları enfekte ettiği bilinen belki de en yaygın izole edilen türdür. Hasta balıklarda deride eritem ve ülserler görülür. Nekropside dalak ve kranial böbrekte granülomlar görülür. Bu granülomların Ziehl-Neelsen boyanması sonucu aside dirençli bakteriler kolayca tespit edilebilir (Ravid-Peretz ve diğerleri, 2019).

**Tablo 3.** Levreklerde granülomlarla seyreden hastalıkların bazı morfolojik ve biyokimyasal farklılıkları.

	Gram Boyama	Şekil	Motilite	Oksidaz	Katalaz	Referans
<i>Aeromonas veronii</i>	Negatif	Çubuk	Hareketli	Pozitif	Pozitif	Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021
<i>Photobacterium damsela subsp. piscisida</i>	Negatif	Bipolar Çubuk	Hareketsiz	Pozitif	Pozitif	Magarinos ve diğerleri., 1996
<i>Mycobacterium marinum</i>	Pozitif	Çubuk	Hareketsiz			Ravid-Peretz ve diğerleri, 2019

*Aeromonas veronii*, Ege Denizi'nin her iki yakasında (Batı/Doğu) levreklerde görülen tüm *Aeromonas* enfeksiyonları vakalarında en yaygın türdür (Smyrli ve diğerleri, 2017). Hastalığın son yıllarda, su sıcaklığının 18°C altında olduğu dönemler hariç tüm yıl boyunca (Mart – Aralık) izole edilmesi bölge için ciddi problem oluşturmaktadır (Smyrli ve diğerleri, 2019). *Aeromonas veronii*'nin neden olduğu hastalıktan dolayı levreklerde yüksek morbidite ve mortalite oluşturmaktadır (Smyrli ve diğerleri, 2017).

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Etiyoloji

*Aeromonas* cinsi (*Aeromonadaceae* familyası, *Gammaproteobacteria* sınıfı), su ortamlarında otokton olarak kabul edilen ve son zamanlarda önemi artan patojenler olarak kabul edilmekle birlikte balıklar ve insanlar da dahil olmak üzere birçok hayvan türünde çok sayıda hastalığa neden olan bakterileri içermektedir (Sreedharan ve diğerleri, 2013). *Aeromonad*'lar olarak adlandırılan bu bakteriler suda serbest olarak yaşayabilirler, çeşitli su hayvanlarında sindirim sisteminde yaşayan ve patojenik etki göstermeyen ya da önemli patojenler olarak iki gruba ayrılırlar (Hanson ve diğerleri, 2019).

1891 yılına ait olduğu düşünülen ilk izolatlar, *Bacillus hydrophilus fuscus* (günümüzde *Aeromonas hydrophila*) olarak adlandırılmıştır (Fernández-Bravo ve Figueras, 2020). Bu cins 1965 yılında *Vibrio* ve *Plesiomonas* cinsleri ile *Vibrionaceae* familyasına dahil edilmiştir. 1986 yılında Colwell ve diğerleri *Aeromonas*'ın farklı bir filogenetik dal oluşturduğunu ve böylece *Aeromonadaceae* ailesini oluşturduğunu göstermiştir (Tanaka ve diğerleri, 2012). 1970'lerin ortalarında, cinsin türleri, farklı özelliklerine göre iki gruba ayrılmıştır: Mezofilik grup (Optimal üreme 35-37°C) insanlarda çeşitli enfeksiyonlardan sorumlu olan *Aeromonas hydrophila* olarak tanımlanırken psikrofilik grup (Optimal üreme 22-28°C) ise balık hastalıklarıyla bağlantılı ve *Aeromonas salmonicida* olarak isimlendirilmiştir (Tanaka ve diğerleri, 2012; Tanaka ve diğerleri, 2017).

*Aeromonas* türleri balıklarda genel olarak hemorajik septisemi, yüzgeç nekrozu, yumuşak doku nekrozu ve furunküloza neden olurlar (Aberoum ve Jooyandeh, 2010). Bu türler arasından *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* ve *Aeromonas veronii* zoonotik özelliğe sahip motil *Aeromonas*'lardandır (Tekedar ve diğerleri, 2019). İnsanlarda ise motil *Aeromonas* türleri yumuşak doku yara enfeksiyonları, diyare ve ölümcül hemorajik septisemilere neden olabilirler (Han ve diğerleri, 2007).

2016 yılında yapılan bir çalışmada, *Aeromonas* cinsinin 31 tür içerdiği, bunlar arasında *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas veronii bivar sobria* ve *veronii* ve *Aeromonas encheleia* türlerinin hareketli ve balıklarda hastalığa neden olduğu belirtilmiştir (Stratev ve Odeyemi,

2017). Günümüzde ise *Aeromonas* cinsinde 1943'ten beri tanımlanmış ve yayımlanmış olan 36 türden bahsedilmektedir: *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas aquatica*, *Aeromonas aquatilis*, *Aeromonas australiensis*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas bivalvium*, *Aeromonas cavernicola*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas crassostreae*, *Aeromonas dhakensis*, *Aeromonas diversa*, *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas enterica*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas finlandiensis*, *Aeromonas fluvialis*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas intestinalis*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas media*, *Aeromonas molluscorum*, *Aeromonas lacus*, *Aeromonas lusitana*, *Aeromonas piscicola*, *Aeromonas popo\_i*, *Aeromonas rivipollensis*, *Aeromonas rivuli*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas sanarellii*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas simiae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas taiwanensis*, *Aeromonas tecta*, *Aeromonas trota*, ve *Aeromonas veronii* (Fernández-Bravo ve Figueras, 2020).

Tatlı su balıklarında *Aeromonas* türleri hastalık oluşturan fırsatçı patojenlerdir (Van der Marel ve diğerleri, 2008). Tatlı su süs balıklarında yapılan bir çalışmada, *Aeromonas veronii*'nin hastalık salgınlarının olumsuz çevresel koşullarla birlikte meydana geldiği görülmüştür. Hastalık için başlıca predispoze faktörlerin stres, sıcaklık şoku, düşük oksijen seviyesi, yüksek amonyak ve olumsuz su kalitesi koşulları olduğu bildirilmiştir (Sreedharan ve diğerleri, 2013).

*Aeromonas veronii*; *Aeromonas veronii* bv. *veronii* ve *Aeromonas veronii* bv. *sobria* olmak üzere iki biyovara ayrılmıştır. Her iki tür de Gram negatif, çubuk şeklinde, mezofilik, hareketli bakterilerdir (Janda ve Abbott, 2010). *Aeromonas veronii* bv. *sobria*'nın eskülin hidrolizi ve ornitin dekarboksilaz için negatif, *Aeromonas veronii* bv. *veronii*'nin ise bu reaksiyonlar için pozitif olduğu bildirilmiştir (Altwegg ve diğerleri, 1990; Austin ve diğerleri, 1996). Ayrıca, *Aeromonas veronii* bv. *veronii* arginin dihidrolaz için negatiftir, salisin'den asit üretir ve tartarat kullanır (Abbott ve diğerleri, 2003).

## 2.2. Epizootiyoloji

*Aeromonas* cinsi, çok sayıda ekosisteme geniş bir şekilde dağılmıştır. Çeşitli su ortamlarında yaygın olarak bulunur (Janda ve Abbott, 2010; Salvat ve Ashbolt, 2019). Ayrıca çevresel ve klinik örneklerden de izole edilmiştir (Janda ve Abbott, 2010; Pessoa ve diğerleri, 2019). *Aeromonas*'lar esasen mikrobiyal biyosferde her yerde bulunur. Bakteriyel ekosistemlerin bulunduğu hemen hemen her çevresel nişten izole edilebilirler. Bunlar

arasında, sucul ortamlar, balıklar, yiyecekler, evcil hayvanlar, omurgasız türler, kuşlar, keneler ve böcekler ile doğal topraklar bulunur. *Aeromonas*'ların bulunabileceği ortamların çok geniş olması sonucu, insanlar ve diğer canlılar bu bakterilere kolaylıkla maruz kalabilmektedir (Janda ve Abbott, 2010).

Su ortamındaki *Aeromonas*'lara yüzey suları, yeraltı suları, içilebilir ve şişelenmiş sular, deniz suyu ve sulama sularında rastlanmıştır (Janda ve Abbott, 2010; Salvat ve Ashbolt, 2019; Monfort ve Baleux, 1990). *Aeromonas*'ın atık sudaki insidansı yüksektir (McLellan ve diğerleri, 2010) ve sudaki bakteri konsantrasyonunun karasal atık sularla bağlantılı olabileceği görülmüştür (Araujo ve diğerleri, 1990). Atık su arıtma tesislerinde suyu geri kazanmak için yapılan geleneksel arıtmaların, *Aeromonas* konsantrasyonunu çoğunlukla azaltmadığı belirlenmiştir (Salvat ve Ashbolt, 2019). Geleneksel arıtmalarla birlikte, kimyasal (ozon, klorlama) ve fiziksel (ultraviyole radyasyon) tedaviler gibi ek tedaviler yapılırsa, *Aeromonas*'ın tamamen ortadan kalktığı bildirilmiştir (Latif-Eugenín ve diğerleri, 2016). Diğer bir doğal tedavi yöntemi ise lagünlemedir. Lagünleme, atık suları sığ havuzlarda veya lagünlerde geçici olarak depolayarak *Aeromonas* seviyelerinin azalmasını sağlayan bir arıtma işlemidir (Boussaid ve diğerleri, 1991). Geri kazanılan su, mikrobiyolojik kalitesine bağlı olarak sulama suyu olarak kullanılabilir (Latif-Eugenín ve diğerleri, 2016). *Aeromonas* içeren sulama suyu ile sulanan meyve ve sebzelerde kontaminasyon riski vardır (Latif-Eugenín ve diğerleri, 2016) ve bu da insanlarda enfeksiyona neden olabilir (Fernández-Bravo ve Figueras, 2020).

Salmonid balık türlerinden genellikle *Aeromonas salmonicida* ve *Aeromonas hydrophila* türleri izole edilmektedir (Beaz-Hidalgo ve diğerleri, 2009; Beaz-Hidalgo ve diğerleri, 2010). Diğer balık türlerinden izole edilen *Aeromonas* türleri ise Tablo 4'te özetlenmiştir.

İspanya'da 2012 yılının Mayıs ve Haziran aylarında levreklerde iki adet *Aeromonas salmonicida* salgını bildirilmiştir. Salgından etkilenen balıklar  $9 \pm 1.0$  gram olarak tartılmış ve salgınların görüldüğü dönemde su sıcaklığı  $16 - 17^{\circ}\text{C}$  arasında olduğu ölçülmüştür. Salgından etkilenen kafeslerde kümülatif mortalitenin %3.8 olduğu bildirilmiştir (Fernández-Álvarez ve diğerleri, 2016).

Çin'de *Aeromonas sobria* ile enfekte yavru (50 gram) tilapyalarda (*Oreochromis niloticus*) su sıcaklığının  $25^{\circ}\text{C}$  olduğu dönemde %85'e varan oranlarda mortaliteler görülmüştür (Li ve Cai, 2010).

Ülkemizde ise Karadeniz bölgesinde 2002 Haziran ayında su sıcaklığı 16°C'ye ulaştığında 5-6 gramlık levreklerde ve 2002 Temmuz ayında 100 gramlık levreklerde iki farklı *Aeromonas salmonicida* salgını bildirilmiştir. Her iki salgında da kümülatif mortalite %20'ye ulaşmıştır (Demircan ve diğerleri, 2005) (Tablo 4).

**Tablo 4.** Farklı balık türlerinden izole edilen *Aeromonas* türleri.

<b>Aeromonas türü</b>	<b>Balık türleri</b>	<b>Referans</b>
<i>A. allosaccharophila</i>	Yılan balığı	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (a); Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Esteve ve diğerleri, 2009; Yi ve diğerleri, 2013
<i>A. bestiarum</i>	Sazan	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (a); Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Esteve ve diğerleri, 2009; Yi ve diğerleri, 2013
<i>A. caviae</i>	Yılan balığı	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (a); Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Esteve ve diğerleri, 2009; Yi ve diğerleri, 2013
<i>A. dhakensis</i>	Yılan balığı	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (a); Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Esteve ve diğerleri, 2009; Yi ve diğerleri, 2013
<i>A. encheleia</i>	Sazan	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (a); Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Esteve ve diğerleri, 2009; Yi ve diğerleri, 2013
<i>A. hydrophila</i>	Salmonidler, Tilapya, Yılan balığı, Sazan, Ayu balığı, Yayın balığı, Ringa, Akvaryum balıkları, Altın parlaticı,	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Van der Marel ve diğerleri, 2008; Beaz-Hidalgo ve diğerleri, 2009; Beaz-Hidalgo ve diğerleri, 2010; Esteve ve diğerleri, 2009; Yi ve diğerleri, 2013; Stratev ve Odeyemi, 2017
<i>A. jandaei</i>	Yılan balığı	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (a); Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Esteve ve diğerleri, 2009; Yi ve diğerleri, 2013
<i>A. media</i>	Yılan balığı	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (a); Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Esteve ve diğerleri, 2009; Yi ve diğerleri, 2013

Tablo 4. Farklı balık türlerinden izole edilen *Aeromonas* türleri (devam).

<i>A. piscicola</i>	Salmonidler	Beaz-Hidalgo ve diğerleri, 2009; Beaz-Hidalgo ve diğerleri, 2010
<i>A. salmonicida</i>	Salmonidler, Levrek	Demircan ve diğerleri, 2005; Beaz-Hidalgo ve diğerleri, 2009; Beaz-Hidalgo ve diğerleri, 2010; Fernández-Álvarez ve diğerleri, 2016
<i>A. schubertii</i>	Yılan balığı	Chen ve diğerleri, 2012
<i>A. sobria</i>	Tilapya, Sazan	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (a); Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Li ve Cai, 2011; Esteve ve diğerleri, 2009; Yi ve diğerleri, 2013
<i>A. trota</i>	Yılan balığı	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (a); Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Li ve Cai, 2011; Esteve ve diğerleri, 2009; Yi ve diğerleri, 2013
<i>A. veronii</i>	Levrek, Tilapya, Yılan balığı, Sazan, Yayın balığı, Mersin balığı, Ayu balığı, Akvaryum balıkları	Martinez-Murcia ve diğerleri, 1992; Esteve ve diğerleri, 1995 (a); Esteve ve diğerleri, 1995 (b); Ma ve diğerleri, 2009; Nawaz ve diğerleri, 2010; Cai ve diğerleri, 2012; Esteve ve diğerleri, 2009; Sreedharan ve diğerleri, 2013; Yi ve diğerleri, 2013; Hassan ve diğerleri, 2017; Smyrli ve diğerleri, 2017; Takeuchi ve diğerleri, 2018; Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021

*Aeromonas* türlerinden *Aeromonas veronii*'nin virülans açısından en geniş konakçı aralığına sahip olduğu görülmektedir (Janda ve Abbott, 2010; Silver ve diğerleri, 2011). Bu türler içinde yetiştiriciliği yapılan; Afrika keskin dişli yayın balığı (*Clarias gariepinus*) (Rahman ve diğerleri, 2002), kanal yayın balıkları (*Ictalurus punctatus*) (Zhu ve diğerleri., 2016), yılanbaşlar (*Ophiocephalus argus*) (Zheng ve diğerleri, 2012), Çin uzun burunlu yayın balığı (*Leiocassis longirostris*) (Cai ve diğerleri, 2012), tilapya (*Oreochromis niloticus*) (Hassan ve diğerleri, 2017), sazan (*Cyprinus carpio*) (Yu ve diğerleri, 2010), Sibirya mersin balığı (*Acipenser baerii*) ve Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*) (Smyrli ve diğerleri, 2017; Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021) bulunmaktadır.

Kore'de *Aeromonas veronii* ile enfekte sazanlarda (*Cyprinus carpio*) salgınlar Mayıs ayında ve su sıcaklığının 20-23°C arasında olduğu dönemlerde görülmüştür. Salgından

etkilenen balıkların ağırlıkları  $83.6 \pm 3.9$  g olarak bildirilmiştir. Günlük mortalitenin %2'ye ulaştığı görülmüştür (Yu ve diğerleri, 2010).

Çin'de *Aeromonas veronii* *bv. veronii* ile enfekte yayın balıklarında (*Leiocassis longirostris* Günther) yapılan çalışmada hastalığın %70 mortalite oluşturduğu bildirilmiştir. (Cai ve diğerleri, 2012).

Yunanistan'da *Aeromonas veronii* *bv. sobria* ile enfekte levrekler incelendiğinde hastalığın ilk olarak 2008 yılında ve büyük balıklarda (250 – 400 gram) görüldüğü bildirilmiştir. Hastalığın görüldüğü dönemde mortalite ve klinik bulguların su sıcaklığının 18°C üzerinde seyrettiği zamanlarda oluştuğu ve en yüksek mortalitenin yaz aylarında su sıcaklığının pik yaptığı Haziran–Temmuz aylarına (24 - 26°C) denk geldiği bildirilmiştir. Günlük mortalitenin <%0.5 olduğu ancak kümülatif mortalitenin 3-4 aylık dönemin sonunda 17–20%'ye vardığı belirtilmiştir (Smyrli ve diğerleri, 2017). Sonraki çalışmalarda hastalığın 50 gramın altındaki balıklarda da görülmeye başladığı ve su sıcaklığının 21°C üzerine çıktığı dönemlerde salgınların oluştuğu bildirilmiştir. Salgınların çıktığı dönemlerde eğer antibiyotik tedavisi uygulanmazsa mortalitenin %50 üzerine ulaştığı ayrıca birbirlerine çok yakın konumda yetiştirilen çipura (*Sparus aurata*), mercan (*Pagrus pagrus*), sivriburun karagöz (*Diplodus puntazzo*) gibi balıklarda hastalığın görülmediği tespit edilmiştir (Smyrli ve diğerleri, 2019).

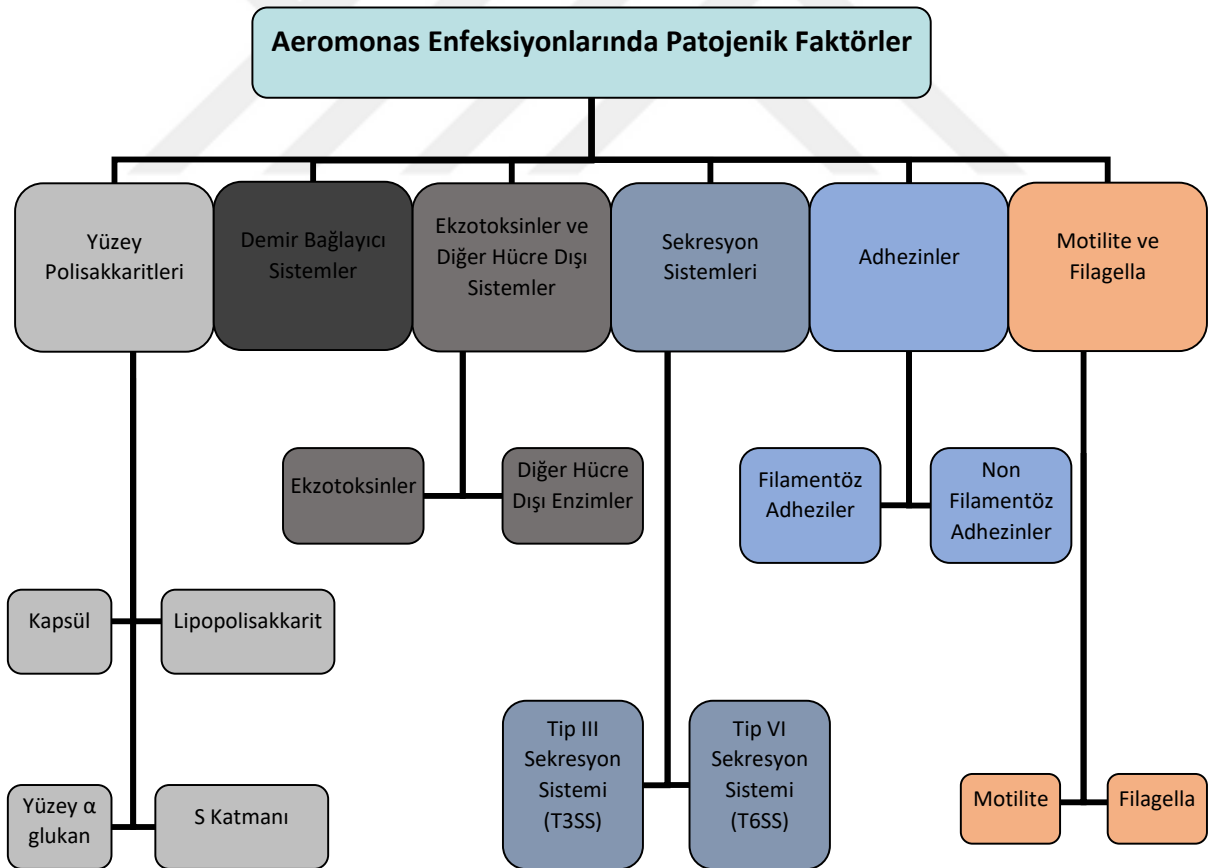
Ülkemizde levreklerde ilk *Aeromonas veronii* vakaları 2017 – 2019 yılları arasında Kuzey Ege'de bir çiftlikten alınan numunelerden bildirilmiştir. Hasta balıkların 250 – 350 gram aralığında olduğu ve hastalığın Mayıs (19°C) –Kasım (20°C) ayları arasında görüldüğü kayıtlara geçmiştir (Dinçtürk ve Tanrıku, 2021).

### 2.3. Patogenez

Hareketli *Aeromonas*'lar, çevrede ve enfekte bir konakçıda iş birliği içinde etkileşime girmelerine izin veren karmaşık kimyasal iletişim yöntemlerine sahiptir. Ayrıca çevredeki değişiklikleri algılayabilir ve bu değişikliklere tepki verebilirler. *Aeromonas*'lar genellikle bitki örtüsü ve diğer doğal ya da insan yapımı yüzeyler üzerinde bir biyofilm oluşturur. Bu biyofilmler, onları çevresel saldırılara ve hafif dezenfektanlara karşı dirençli kılan bir matrise gömülü bakterilerden oluşur. Bu durum patojen için doğal bir rezervuar sağlar ve bir balık bu

yüzeye sürterse, yüzeydeki biyofilmde bulunan bakteriler balığa tutunur ve balığın yüzey savunmasında bir kırılma sağlar. Bakteri, konakta bir patojen olarak hareket ederken, konağın bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olan çeşitli virülans faktörlerini salgılar. Ayrıca balık dokularını parçalayan ve bakteriye besin sağlayan proteazlar gibi bazı enzimler salgırlar. Balık enfeksiyona yenik düşerse, bakteri karkasta çoğalmaya devam ederek sayısını artırır. Ölü balıklar ayrıca, bulaşmaya yardımcı olan leş yiyen balıkları, kuşları, süruingenleri ve memelileri enfekte etmek için rezervuar işlevi görebilir(Hanson ve diğlerleri, 2019).

*Aeromonas* ile ilişkili ana patojenik faktörler, yüzey polisakkaritleri (kapsül, lipopolisakkarit ve glukan), S katmanları, demir bağlama sistemleri, eksotoksinler ve hücre dışı enzimler, salgı sistemleri, fimbria ve diğler filamentli olmayan adezinler, hareketlilik ve kamçıldır (Şekil 1) (Tomas, 2012).



Şekil 1. *Aeromonas* enfeksiyonlarında patojenik faktörler (Tomas, 2012 uyarlanmıştır).

Kapsül, genellikle bakteri hücresinin dış zarını kaplayan polisakkaritlerden oluşan bir yapıdır (Roberts, 1996). Kapsüller fagositozu önledikleri, diğer bakterilerle ve konak dokuyula etkileşimi destekledikleri ve hidrofobik toksinlere karşı bir bariyer görevi gördükleri için birçok patojenin ana virülans faktörü olarak tanımlanmaktadır (Merino ve Tomás, 2015). Mezofilik *Aeromonas* türleri, glikozdan zengin ortamlarda kapsül üretebilirler (Martinez ve diğerleri, 1995).

Lipopolisakkarit, Gram negatif bakterilere özgü bir yüzey glikokonjugatı ve lokal yangından yaygın sepsise kadar doğal immun yanıtların anahtar bir göstergesidir. Gram negatif bakteriler, periplazmik bir boşlukla ayrılmış iki zar tabakasına sahiptir: birincisi iç veya plazma zarı, ikincisi ise dış zardır. Lipopolisakkarit, dış zarın dış yaprağının önemli bir bileşenidir ve lipid A, çekirdek oligosakkarit ve O'ya özgü polisakkarit veya O antijeninden oluşur (Whitfield ve Valvano, 1993). *Aeromonas*'tan elde edilen lipopolisakkaritler, esas olarak 1 ila 50'den fazla tekrarlayan oligosakkarit birimi içeren S-formu lipopolisakkarit moleküllerinin yüksek heterojen karışımlarıdır ve O-spesifik zincirden yoksun R-formu moleküllerinin her zaman değişen oranlarını içerir. Klinik olarak önemli birçok Gram negatif bakteri bu tip lipopolisakkaritleri sentezler. Lipopolisakkaritler, şeker kısmının uzunluğu arttıkça hidrofobikliği azalan amfipatik moleküllerdir (Caroff ve Karibian, 2003). *Aeromonas* türlerinin biyolojik aktiviteleriyle ilgili olarak, diğer Gram negatif bakterilerde olduğu gibi, lipid A, her ikisi de T mitojenden bağımsız bir mekanizma ile B hücresi poliklonal aktivasyonunu ve immunoglobulin M'ye yanıtı indükler (Marrison 1983). S formu lipopolisakkarit, bakterileri immun olmayan serumun bakterisit etkilerinden korur. Komplement bileşeni C3b, zardan uzakta olan ve komplement saldırı kompleksini oluşturamayan uzun O antijen zincirlerine bağlanmasından dolayı hücre parçalanmasını önler (Alberti ve diğerleri, 1996).

*Aeromonas* yüzey glukun üretimini hücre yapışmasında önemli bir rolü oynayabilir, ancak biyofilm oluşumunda açıkça rolü vardır (Merino ve diğerleri, 2012). Bazı *Escherichia coli* ekzopolisakkaritleri (özellikle CA ve PNAG) (Agladze ve diğerleri, 2005) çeşitli protein, lipid ve polisakkarit bileşenlerini bir arada tutarak “çimento” görevi gören biyofilmlerin ayrılmaz bileşenleridir (Sutherland, 2001). Benzer bir rol, *Aeromonas* yüzey  $\alpha$ -glukan polisakkaritinde de görülmektedir (Tomas, 2012).

S-katmanları, patojenite ile ilgili bir dizi olası fonksiyonla ilişkilendirilmektedir. Hücre yüzeyinde bulunmasından dolayı, yapışma, komplemente ve fagositler tarafından saldırıya karşı koruma, antijenik özellikler, hidrolitik ekzoenzimler için sabitleme bölgesi,

bakteriyofaj reseptörü gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda önemli bir rol oynar (Beveridge ve diğerleri, 1997). *Aeromonas*'ın S tabakası, tüm bakteri hücrelerini kaplayacak şekilde bir baskın yüzey antijenini oluşturan tetragonal kompleks oluşturup tek bir proteinin alt birimlerinin otomatik olarak birleştirilmesinden oluşur (Chu ve diğerleri, 1991). *Aeromonas* S-tabakası alt birimlerinin salgılanması, plazma zarı boyunca yer değiştirecek bir sinyal peptidinin yanı sıra, tip II salgılama sisteminin bileşenlerine homolog olan, farklı spesifik proteinlerin, periplazmadan transfer edilecek olan dış tarafa bölünmesini içerir (Tomas, 2012).

Çok sayıda ortam, mikrobiyal büyüme için optimum olduğu düşünülen 1 µM'den daha az demir içerir. Serbest demirin az miktarda bulunması, bakteri üremesini ve patojeniteyi daha zor hale getirir, ancak bitirmez. *Aeromonas* suşlarında demir elde etmek için iki yüksek afinite mekanizması bilinmektedir: siderofora bağımlı ve siderofordan bağımsız mekanizmalar (Telford ve Raymond, 1998). Sideroforlar, demir iyonlarına karşı yüksek afinite ve özgüllük ile fonksiyonel gruplar sunan düşük moleküler ağırlıklı peptitlerdir. Bu peptitler, metali bakteri metabolizmasına dahil etmek için hücre ile ilişkili bir aparatın yanı sıra spesifik hücre zarına bağlı reseptörlere ihtiyaç duyar. Mezofilik *Aeromonas*'lar, enterobactin veya amonabactin sideroforları sentezler, ancak asla ikisini birden sentezlemez. Amonabactin sadece *Aeromonas* türlerinde bilinirken enterobactin farklı Gram negatif bakterilerde de bulunur (Massad ve diğerleri, 1994).

*Aeromonas* türlerinin çok çeşitli ekzotoksinler ürettiği açıklanmıştır. *Aeromonas* türlerinde sitotoksik ve sitotonik olmak üzere iki ana tip enterotoksin tanımlanmıştır. Sitolitik enterotoksinler olarak da bilinen sitotoksik enterotoksinler, ince bağırsağın kriptlerinin ve villuslarının dejenerasyonunu tetikler ve bunları üreten suşlar genellikle ishalleri hastalardan izole edilir. Bu toksinler hemoliz, sitotoksikite ve enterotoksikiteye neden olabilir (Asao ve diğerleri, 1984; Chopra ve Houston, 1999). Act, *Aeromonas hydrophila*'nın ana virülans faktörü olan hemolitik, sitotoksik ve enterotoksik aktivitelerinden sorumlu olan, aerolizinle ilişkili gözenek oluşturucu bir toksindir. *Aeromonas* türleri, farklı moleküler ağırlıklar ve choleric antitoksine karşı değişken reaktivite gösteren sitotonik enterotoksinler üretir (Chakraborty ve diğerleri, 1984; Potomsky ve diğerleri, 1987). Sitotoksik hemolitik enterotoksinlere ek olarak, *Aeromonas* türleri enterotoksik özellikleri olmayan, α-hemolizinler ve β-hemolizinler adında başka hemolizin sınıflarını da üretirler. α-hemolizinler, durağan büyüme fazında sentezlenir ve geri dönüşümlü sitotoksik etkilere ve eritrosit lizisine yol açar (Thelestam ve Ljungh, 1981). β-hemolizinler ise genellikle üstel büyüme fazında sentezlenir. Termostabildirler (56°C'de 5 dakika) ve ozmotik lizise ve eritrositlerin tamamen yok

edilmesine yol açan gözenek oluşturan toksinlerdir (Tomas, 2012; Thelestam ve Ljungh, 1981).

*Aeromonas* türleri proteazlar, lipazlar, amilazlar, kitinazlar, nükleazlar ve jelatinazlar dahil olmak üzere çok çeşitli hücre dışı enzimler salgılar. Patojenitedeki rolleri henüz belirlenmemiş olsa da, çevresel değişikliklere uyum sağlamak için büyük bir potansiyeli temsil ederler. Hücre dışı proteazlar, *Aeromonas*'ın farklı habitatlarda kalmasını sağlayan ve diğer organizmalarla ekolojik etkileşimleri kolaylaştıran metabolik çok yönlülüğe katkıda bulunur. Genel olarak, proteazlar, konakçı dokuya doğrudan hasar vererek veya toksinlerin proteolitik aktivasyonu yoluyla istilayı teşvik eden patojeniteye katkıda bulunabilirler. *Aeromonas spp*'de üç farklı proteaz türü tanımlanmıştır: sıcaklığa karşı kararsız bir serin-proteaz ve iki metalloproteaz. Lipazlar veya triaçilgliserol hidrolazlar, çok çeşitli bakteriler tarafından üretilir. İnsan lökositleri ile etkileşime girerek veya lipolitik aktivite ile üretilen serbest yağ asitleri yoluyla çeşitli bağışıklık sistemi fonksiyonlarını etkileyerek besin sağlayabilir ve virülans faktörleri oluşturabilirler (Tomas, 2012).

**Sekresyon Sistemleri:** Gram negatif bakterilerin sitoplazmik membranında ince peptidoglikan tabakası ve lipopolisakkarit içeren bir dış tabakası vardır. Sitoplazmik zar ile dış zar arasında periplazmik boşluk adı verilen bir boşluk vardır. Proteinleri hücre yüzeyine veya hücre dışı boşluğa taşımak için Gram negatif bakteriler farklı sekresyon sistemleri geliştirmiştir: sekresyon sistemleri tip I, II, III, IV, V ve VI (Kostakioti ve diğerleri, 2005). Bu sınıflandırma, proteinlerin dış zar boyunca taşınmasına dayanır ve taşıma mekanizmasının moleküler doğasına ve katalize edilen reaksiyonlara atıfta bulunur (Tomas, 2012).

**Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS)** ilk olarak *Yersinia spp.* patojenik suşlarında tanımlanmıştır ve sıklıkla patojeniteye dahil olan bakteri proteinlerini doğrudan bakteri sitoplazmasından bakteri zarfının iç ve dış zarı boyunca ya dış ortama ya da doğrudan ökaryotik hücrelere taşıyan karmaşık bir çok bileşenli sistemden oluşur (Michiels ve diğerleri, 1990). T3SS, üç farklı protein türü içerir: (a) enjeksiyonlar olarak adlandırılan ve iğne benzeri yapılar oluşturan yapısal bileşenler, (b) efektörler olarak adlandırılan salgı substratları; (c) taşıma sırasında yapısal ve efektör proteinlere yardımcı olan ve koruyan şaperonlar. Enjeksiyonlar, hücre yüzeyinden uzanan ve kamçı bazal gövdelerine benzeyen bazal yapılarla zarfa bağlanan ince ve sert içi boş iğnelerle iğne benzeri bir yapı oluşturmak üzere bir araya gelen yaklaşık 20 farklı proteinden oluşur. Bu yapı genellikle konak hücrelerle temas üzerine indüklenir ve efektörlerin ökaryotik sitozole translokasyonuna izin verir (Galán ve Collmer, 1999).

Tip VI Sekresyon Sistemi (T6SS), Pukatzki ve diğeri tarafından tanımlanmıştır ve yine konak hücrelere translokasyon efektörlerinin amacına hizmet eden faj kuyruğu-(spike) benzeri bir enjeksiyon oluşturduğu görülmektedir (Pukatzki ve diğeri, 2006; Pukatzki ve diğeri, 2007). Bu sistemin makromoleküler yapısı henüz bilinmemektedir ve T6SS sistemlerinin efektörleri nasıl bir araya getirdiği veya dağıttığı bilinmiyor (Tomas, 2012).

Adhezinler: Bakterilerin konakçının mukozasına yapışma ve kolonize etme kapasitesi, enfeksiyon sürecinde kritik bir adımdır. Bakterilerin ökaryotik hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanmasına izin veren iki sınıf adezin *Aeromonas*'ta tanımlanmıştır: iplikçi yapılarla bağlantılı olanlar ve dış zarın proteinleri veya diğeri yapılarla bağlantılı olanlar (Burke ve diğeri, 1984).

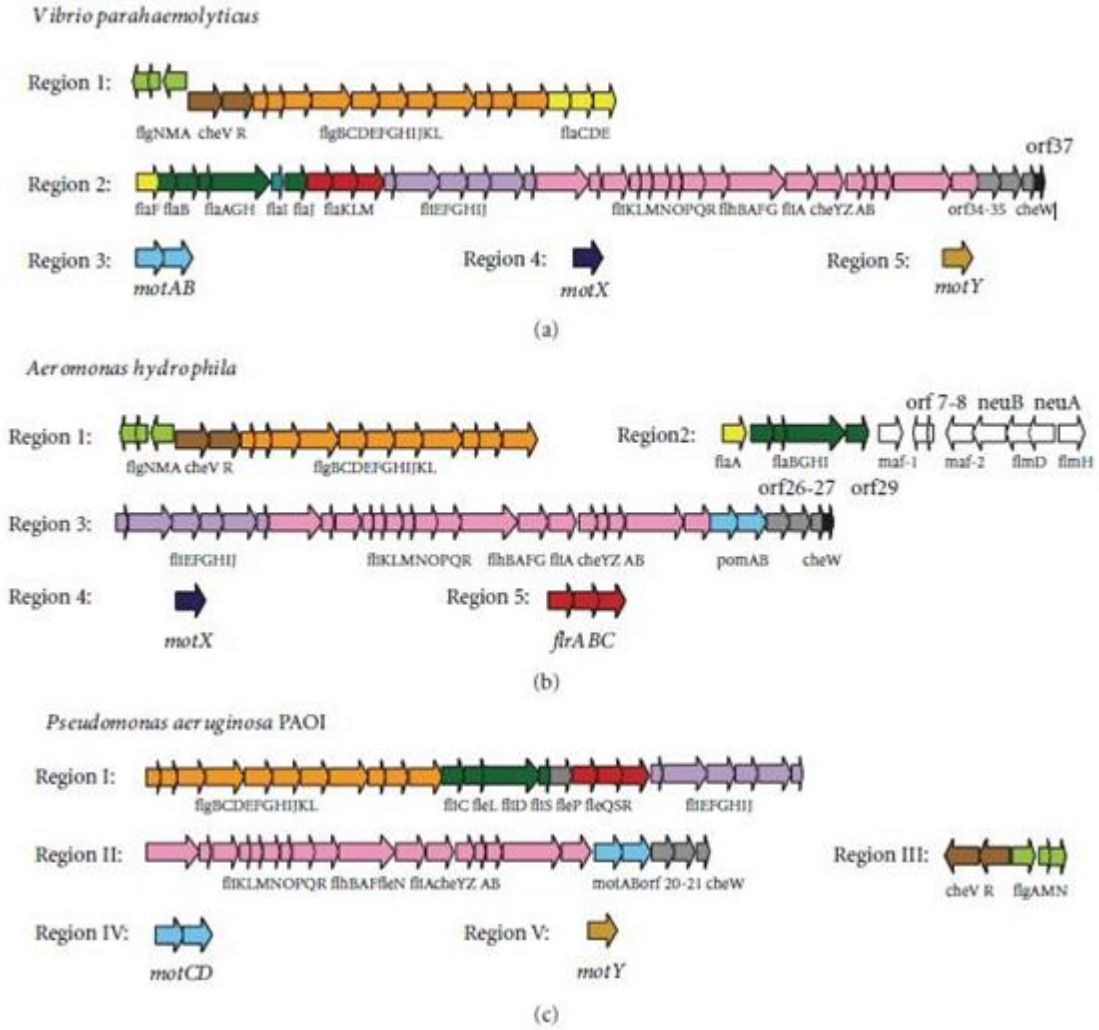
Filamentöz Adhezinler; Fimbria/pili, pilin olarak bilinen alt birimler tarafından oluşturulan bakteri yüzeyindeki filamentli yapılardır. Pili genellikle yapışma organelleri olarak tanımlansa da faj bağlanması, DNA transferi, biyofilm oluşumu, hücre agregasyonu, konak hücre istilası ve motilite gibi diğeri işlevlerde rol oynarlar. Mezofilik *Aeromonas*'ın klinik ve çevresel izolatlarında, morfolojilerine göre iki farklı fimbria türü bulunmuştur: bakteri hücresinde çok sayıda bulunabilen kısa, sert fimbria ve daha küçük sayılarda bulunabilen uzun, dalgalı fimbrialar (Kirov ve diğeri, 1995).

Non Filamentöz Adhezinler; *Aeromonas spp.* yüzeyinde, S-tabaka monomerleri, lipopolisakarit ve farklı dış zar proteinleri gibi adezin olarak kabul edilen başka makromoleküller de vardır. Dış zar proteinleri arasında, porinlerin, bakterileri eritrositler ve muhtemelen insan bağırsak hücreleri gibi karbonhidrattan zengin yüzeylere bağlayan lektin tipi adezinler gibi davrandıkları bildirilmiştir (Quinn ve diğeri, 1994).

Motilite ve Filagella: Bakterilerde kayma, yüzme, kaynaşma, kayma, seğirme gibi farklı hareket türleri bulunmaktadır. *Aeromonas* gibi tek kutuplu kamçılı bakterilerde, saat yönünün tersine dönüş hücreyi bir koşuda ileri doğru iterken, saat yönünde dönüş hücreyi rastgele bir yeniden yönlendirme ile geriye doğru itmektir. Mezofilik *Aeromonas* türlerinin %60'ında sürü halinde hareket etme (kaynaşma) gözlenmektedir (Tomas, 2012).

Prokaryotiklerde flagellum, yapısal olarak, filament ve kancadan oluşan bir dış parçaya ve bazal gövde olarak adlandırılan bakteri yüzeyine gömülü bir iç parçaya bölünmüştür (McCarter, 2001). Flagellar motor rotor ve stator olmak üzere iki alt yapıya bölünmüştür. Rotor, flagella bazal gövdesinin tabanında C halka yapısını oluşturan FliM, FliN ve FliG proteinlerinden oluşur. Stator ise ve MS halkasını çevreleyen, proton veya sodyum iyon

kanallarını oluşturan ve iyon akışını flagella dönüşüne bağlayan zara gömülü proteinlerden oluşur (Berg, 2003). *Vibrio spp.*, mezofilik *Aeromonas* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi polar flagellalı bakterilerde, genler en az beş kromozomal bölgede dağılır, ancak çoğunluğu ikisinde bulunur (Şekil 2) (McCarter, 2001; Terashima ve diğerleri, 2006).



**Şekil 2.** *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas hydrophila* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da polar flagellar genlerin genetik dizilişi (Tomas, 2012).

Patojenik bakterilerin kamçıları, konağın mukozasında kolonizasyonu ve istilayı sağlar. Bakteriler mukozaya ulaştığında kamçı yapısı motilite, adezyon ve invazyon için gerekli hale gelir. Bu motilite, kemotaksi ile birleştiğinde, patojenlerin mukozanın hedef dokusuna ulaşmasına izin verir. Hareketlilik ve flagella varlığı, genellikle kalıcı enfeksiyonlarla birlikte seyreden biyofilm oluşumu ile de ilişkilidir. Mukoza kolonizasyonu, esas olarak mukozanın spesifik hücreleri tarafından uyarılan bir proinflamatuvar yanıtı veya indüklenebilir doğal

immün yanıtı teşvik eder. Memelilerde TLR5, D1 hakimiyeti tarafından flagellin tanıma ile ilişkilendirilir (Hayashi ve diğerleri, 2001). TLR5, NF-κB (nükleer faktör-kappaB) ve MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) bağımlı proinflamatuvar genlerin transkripsiyonunu uyarır. Farelerde flagellinlerin sistemik enjeksiyonu, TNF-a (Tümör Nekroz Faktörü a), IL-6 (İnterlökin 6) ve nitrik oksit gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indükler. *Escherichia coli*, *Salmonella enterica sv. typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın epitel hücrelerinde flagellinler, nötrofilleri ve makrofajları enfeksiyon bölgesine çekmek için gerekli kemokin olan IL-8'in salgılanmasını uyarır (Lilehoj ve diğerleri, 2002). Ek olarak, flagellin proteininin glikozilasyonunun, *Pseudomonas aeruginosa* flagellin'in proinflamatuvar etkisinde bir rol oynadığı gösterilmiştir. Glikosile edilmemiş flagellin ile uyarılan A549 hücrelerinden IL-8 salımı, doğal tip flagellin ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Verma ve diğerleri, 2005). *Aeromonas*'larda polar ve lateral flagella için benzer patojenik mekanizmalar gözlemlenmiştir (Canals ve diğerleri, 2006a; Canals ve diğerleri, 2006b).

Balıklarda *Aeromonas* cinsi bakterilerin neden olduğu hastalığa *Motil Aeromonas Septisemi* (MAS) denir. MAS salgınlarının çoğu, balığın enfeksiyonlarla savaşıma yeteneğini zayıflatan çevresel bir durumla ilişkilidir. Bu bakteriler su ortamında serbest yüzen bakteriler olarak, biyofilmlerde ve sıklıkla hayvanın mide-bağırsak kanalında yaşadıklarından, bağırsıklığı zayıflamış bir balıktan kolaylıkla yararlanabilirler. *Aeromonas* enfeksiyonlarına zemin oluşturan faktörler arasında sıcaklık stresi, su kalitesi koşulları, yetersiz beslenme faktörleri, yaralanma ve başka bir bakteri, virus, parazit veya mantar ile enfeksiyon yer alır. Bu nedenle, ilişkili koşulları birleştiren *Aeromonas*'lar, balık yetiştiriciliğinde hastalık salgınlarına katkıda bulunan en yaygın patojenler arasındadır. Çoğu zaman birincil enfeksiyonlar, bakteri yaralanma bölgesine girdiğinde veya balığı kaplayan mukus bariyerini kırdığında başlar. Bakteri daha sonra proteolitik enzimlerin salınması nedeniyle cilt, kas ve bağ dokusunun parçalanmasıyla karakterize lokalize bir enfeksiyon oluşturabilir. Bunlar genellikle derin ülserler, pul kaybı, yüzgeç erozyonu veya apseler olarak kendini gösterir. Bakteriler daha sonra sistemik enfeksiyonlara neden olmak için bu lokalize enfeksiyonlardan yayılabilir (septisemi veya bakteriyemi). *Aeromonas*'lar ayrıca balığı bağırsak veya solungaçlardan istila ederek sistemik bir enfeksiyona neden olabilir. Predispoze faktöre bağlı olarak, hızla artan mortalite meydana gelebilir, ancak predispoze faktör düzeltilenirse kayıplar genellikle nispeten hızlı bir şekilde azalır (Hanson ve diğerleri, 2019).

## 2.4. Bulgular

İnsanlarda *Aeromonas* enfeksiyonları genelde havalarda sıcak olduğu dönemlerde görülür. Bulaşmalar genellikle su, toprak, yiyecek veya insan gastrointestinal sisteminden kaynaklanmaktadır. İnsanlarda hastalık dört kategoride incelenmektedir:

- Enfekte su veya toprakla bulaşabilen ve yara enfeksiyonları veya sellülit ile seyreden enfeksiyonlar.
- Organizmaların bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde veya çeşitli diğer önemli hastalıkları olan bireylerde vücuda yayıldığı (septisemi) genel bir enfeksiyon.
- Gastroenteritis (diyare).
- Gastroenteritis (ishal hastalığı), menenjitis, peritonitis veya otitis gibi ekstraintestinal enfeksiyonlar ya da göz veya idrar yolu gibi spesifik bölgelerin yangısı (Altwegg ve diğerleri, 1990).

*Motil Aeromonas Septisemi*'de çoğu zaman birincil enfeksiyonlar, bakteri bir yaralanma bölgesine girdiğinde veya balığı kaplayan mukus bariyerini kırdığında başlar. Bakteri daha sonra proteolitik enzimlerin salınması nedeniyle cilt, kas ve bağ dokusunun parçalanmasıyla karakterize lokalize bir enfeksiyon oluşturabilir. Bunlar genellikle derin ülserler, pul kaybı, yüzgeç erozyonu veya apseler olarak kendini gösterir. Bakteriler daha sonra sistemik enfeksiyonlara neden olmak için bu lokalize enfeksiyonlardan yayılabilir (septisemi veya bakteriyemi). *Aeromonas*'lar ayrıca balığı bağırsak veya solungaçlardan istila ederek sistemik bir enfeksiyona neden olabilir. Septisemili balıklarda genellikle ciltte, gözlerde ve yüzgeçlerde kanamalar (kırmızı alanlar veya lekeler), şişkin bir karın, pul ceplerinde ödem nedeniyle genişleyen pullar (damlalık) ve/veya kırmızı, iltihaplı anüs bulunur. Kas ve viseral doku kırmızı renktedir ve vücut boşluğu genellikle çok kanlı sıvı içerir (Hanson ve diğerleri, 2019).

*Aeromonas salmonicida* ile enfekte levreklerde peteşiyel kanamalar 5-6 gramlık balıkların yüzgeç diplerinde görülürken, 100 gramlık balıkların vücut yüzeyinde tespit edilmiştir. Nekropside böbrek, karaciğer ve dalakta krem-beyaz renginde lezyonlar görülmüştür. Dalağın normalden büyük olduğu, solungaç ve karaciğerin ise solgun olduğu gözlemlenmiştir. Histopatolojik incelemede karaciğerde bakteri kümeleri ile birlikte yangısal hücrelerle çevrili birkaç büyük nekroz odağı, dalakta nekroz alanları, böbrekte çok sayıda ve

yangısal hücrelerin eşlik ettiği büyük nekroz alanları tespit edilmiştir (Demircan ve diğerleri, 2005). Ayrıca 10 gramlık levreklerde oluşan bir salgında dış bakıda hiçbir klinik bulgu tespit edilmezken nekropside tespit edilen tek bulgu splenomegalidir. İlerleyen yaşlarda ise deri ve kas tabakasında ülserler tespit edilmiştir (Fernández-Álvarez ve diğerleri, 2016).

*Aeromonas veronii* *bv. veronii* ile enfekte yayın balıklarının (*Leiocassis longirostris* Günther) derisinde açık ülserler, yem alımında azalma, karaciğerde makroskopik olarak görülebilen ve dağınık halde bulunan kanama odakları görülmüştür (Cai ve diğerleri, 2012).

*Aeromonas veronii* ile enfekte sazanlarda (*Cyprinus carpio*) abdominal şişkinlik ve deride ülserler tespit edilmiştir. Nekropsilerinde enteritis, karaciğerde hafif konjesyon ve dalak ve böbreğin boyutlarının normalden büyük olduğu bildirilmiştir. Histopatolojik incelemede karaciğerde hepatosellüler vakuoler dejenerasyon ve sinuzoidlerde konjesyon ile birlikte, hepatositlerde bakteri invazyonu tespit edilmemiştir. Pankreaslarda kanama ve pankreas hücrelerinde vakuoler dejenerasyon ve atrofi görülmüştür. Dalakta hemoraji ve konjesyon ile çok sayıda bakteri kümeleri görülmüştür. Böbrekte bakteri kümeleri ile birlikte, nekrotize böbrek tubulleri ve glomerüler yıkımlanma ile hematopoietik dokuda çoklu hemorajik odaklar tespit edilmiştir. Bağırsaklarda submukozal tabakada kanama ve barsak epitel tabakasında dökülme olduğu bildirilmiştir. Deride subkutan ve kas içine bakteri invazyonu ile birlikte kanama olduğu görülmüş ve bazı kas liflerinde nekroz tespit edilmiştir (Yu ve diğerleri, 2010).

Japonya'da *Aeromonas veronii* *bv. sobria* ile enfekte ayu balıklarında (*Plecoglossus altivelis*) alt çene ve vücut yüzeyinde kanamalar ile birlikte ventral yüzgecin dibinde ve anüste hiperemiler görülmüştür (Takeuchi ve diğerleri, 2008).

Çin'de *Aeromonas sobria* ile enfekte yavru tilapyalarda (*Oreochromis niloticus*) görülen başlıca klinik bulgular; kuyruk nekrozu, asites, abdominal şişme, yem alımının azalması ve karaciğerde makroskopik olarak görülebilen dağınık halde noktasal kanamalar olarak belirtilmiştir. Enfeksiyonun ilk başta deride kararma ile başlayıp, kuyruğun erozyonu ve tamamen nekrozu ile seyrettiği görülmüştür (Li ve Cai, 2011).

*Aeromonas veronii* ile enfekte akvaryum balıklarının yüzeye yakın yüzdüğü, vücudunda peteşiyel kanamalar, hemorajik septisemi, karında şişkinlik, kuyruk ve yüzgeçlerde nekroz görülmüştür. Nekropside karın boşluğunda sarımsı asidik bir sıvı olduğu dikkat çekmiştir (Sreedharan ve diğerleri, 2013).

*Aeromonas veronii* bv. *sobria* ile enfekte levreklerde anoreksi, su yüzeyinde yavaş yüzme hareketleri, deri renginin normalden daha koyu olması ve ekzoftalmus kafes üzerinden gözlemlenebilen klinik bulgulardır. Solungaçlar solgun renkte, balıkların çoğunluğunun deri, yüzgeçler ve kan serumlarının sarımsı renkte olduğu bir ikterik görünüm gözlemlenmektedir. Epidermal lezyonlar nadiren yüzeysel olarak görünmektedir ve daha çok alttaki kaslara kadar uzanan ülserler vardır. Kafada, ağız ve çenede kanamalar ile yüzgeçlerde ve operkulumda kızarıklık da balıkta görülen klinik bulgulardır. Nekropside ise hastalıktan etkilenen ana organların dalak, böbrek ve karaciğer olduğu tespit edilmiştir. Dalakta büyüme ve üzerinde çok sayıda beyazımsı nodüller belirlenmiştir. İlerlemiş vakalarda böbrek parenkiminin tamamen nekroze olduğu görülmüştür. Karaciğerde nekroz ve diffuz hemorajiler bildirilmiştir (Smyrli ve diğerleri 2017, Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021).

*Aeromonas veronii* bv. *sobria* ile enfekte levreklerde yapılan histopatolojik incelemelerde ise kronik granülomatöz yangı ile seyreden sistemik bir enfeksiyon karakteristiği görülmüştür. Bu lezyonlar dalak, böbrek, karaciğer ve kas dokusunda tespit edilmiştir. Bazı lezyonlar nekrotik ve kalsifiye olurken, granülomların sıklıkla çubuk şekilli bakteri odaklarını içerdiği görülmüştür. Deri lezyonlarında kazeöz nekroz belirginken, karaciğerde sıklıkla iyi sınırlı nekrotik lezyonlar bulunmuştur. Karaciğerde granülom, hücreler arasında serbest halde eritrositler, vakuolar dejenerasyon, nekrotik doku ve ayrıca fibröz bağ dokusunda bakteri kolonileri gözlenmiştir. Bakteriler böbrekte granülomatöz olmayan alanlarda da gözlenmiştir. Dalakta ise lenfositik hücre infiltrasyonları fark edilmiştir. Solungaç epitelinde lamellar epitel hipertrofisi ve hiperplazi ile dejeneratif değişikliklerle bulunmuştur. Ayrıca özellikle subendokardiyal hücrelerde dejenerasyon ve lenfosit hücre infiltrasyonu belirlenmiştir (Smyrli ve diğerleri 2017, Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021).

Sunulan doktora tez çalışmasında, balık çiftliklerinde yıl boyunca gözlenen ve günlük düşük ancak kümülatifte %15-20 mortalite oranına ulaşabilen, *Aeromonas veronii* ile doğal enfekte levreklerde bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyon, nekropsi, histopatolojik ve incelemeler gerçekleştirilmiştir. İmmunohistokimyasal metodun hastalığın tanısındaki yerinin yanında, patogenezi ile ilişkin veriler elde edilmeye çalışılmıştır.

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereç

#### 3.1.1. Hayvan ve Doku

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, 2020-2021 yılları arasında rutin incelemeye giren, *Aeromonas veronii* enfeksiyonu şüphesi ile ölmüş 22 adet balığın sistemik nekropsileri gerçekleştirilmiş ve elde edilen materyaller tespit edilerek, rutin takip işlemleri sonunda parafinde bloklanıp arşivlenmiştir. Bu hayvanlara ait gramaj ve geldiği yer ile ilgili bilgiler laboratuvarında incelenme sırasına göre dizilip olgu numaraları oluşturularak Tablo 5'te sunulmuştur.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Bakteri İzolasyonu

%1,5 NaCl ilave edilmiş tryptic soy agara (TSA, MERCK) ve kanlı agara (Columbia Agar, Liofilchem) ekim yapılan petripler Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Bakteriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında 24°C'de 3 gün inkübe edildi. Agarlar 3 gün süre ile 24 saatlik periyotlarda kontrol edildi. Primer izolasyondan sonra tipik kolonileri saflaştırmak için üç kez %1,5 NaCl ilave edilmiş tryptic soy agara (TSA, MERCK) ve kanlı agara (Columbia Agar, Liofilchem) pasaj yapıldı. Sadece *Aeromonas veronii* şüpheli üreme gösteren agarlar çalışma için seçildi.

#### 3.2.2. Bakterilerin Fenotipik İdentifikasyonu

Bakterilerin koloni morfolojileri %1,5 NaCl ilave edilmiş tryptic soy agara (TSA, MERCK) ve kanlı agara (Columbia Agar, Liofilchem) ekim yapılarak kontrol edildi. Gram boyama üreticinin direktifleri doğrultusunda Gram boyama kiti (Gram Staining Kit 111885,

MERCK) kullanılarak yapıldı. Motilite standart prosedürler uygulanarak kontrol edildi (Austin ve diğerleri, 2007). Oksidaz testi, oksidaz test kiti (Oxidase Test Stick 88029N, Liofilchem) kullanılarak, katalaz testi, katalaz reaktifi (CHEMBİO, CB6525.0100) kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Üreme testleri Tiyosülfat-Sitrat-Safra-Sükroz Agar (TCBS, Sigma-Aldrich), Aeromonas Agar (Liofilchem), %1,5 NaCl ilave edilmiş tryptic soy agar (TSA, MERCK) ve kanlı agara (Columbia Agar, Liofilchem) ekimler yapılarak 24°C’de 3 gün inkübe edildikten sonra yapıldı. Bakterinin biyokimyasal özellikleri API 20E test kitleri ile VITEK-2 (BioMerieux S.A., France) cihazı kullanılarak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda belirlendi. Bakterinin hemolitik aktivitesi kanlı agara (Columbia Agar, Liofilchem) ekim yapıp 24°C’de 3 gün, pigment oluşumu ise %1,5 NaCl ilave edilmiş tryptic soy agarda (TSA, MERCK) 24°C’de 3 gün inkübe edildikten sonra kontrol edildi.

**Tablo 5.** Çalışma olgularını oluşturan hayvanlara ait bilgiler.

Olgu No	Gramaj(gr)	Şehir	Tarih	Su Sıcaklığı
1	355	Aydın	11/05/2020	20°C
2	324	Aydın	11/05/2020	20°C
3	327	Aydın	11/05/2020	20°C
4	342	İzmir	05/08/2020	22°C
5	351	İzmir	05/08/2020	22°C
6	333	Aydın	12/08/2020	24°C
7	412	Aydın	12/08/2020	24°C
8	46	Muğla	14/08/2020	26°C
9	59	Muğla	14/08/2020	26°C
10	246	Muğla	27/08/2020	26°C
11	113	Muğla	16/12/2020	19°C
12	147	Muğla	16/12/2020	19°C
13	308	Muğla	16/06/2021	22°C
14	2250	Muğla	07/07/2021	24°C
15	2140	Muğla	07/07/2021	24°C
16	1876	Muğla	07/07/2021	24°C
17	312	Aydın	28/07/2021	24°C
18	155	Muğla	07/10/2021	23°C

Tablo 5. Çalışma olgularını oluşturan hayvanlara ait bilgiler (devam).

19	176	İzmir	12/10/2021	20°C
20	76	İzmir	04/11/2021	21°C
21	83	İzmir	04/11/2021	21°C
22	88	İzmir	23/11/2021	21°C

### 3.2.3. Moleküler Teşhis

Bakterilerin moleküler identifikasyonu 16srRNA gen amplifikasyonu ile gerçekleştirildi ve sırasıyla aşağıdaki yöntemler uygulandı.

DNA izolasyonu için aşağıda (Tablo 6) markası, adı ve katalog numarası verilen materyaller kullanıldı.

Tablo 6. DNA izolasyonu için kullanılan materyal bilgileri.

Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
GeneAll	Cell SV mini	106-101
NZY	Lysozyme	MB16201

DNA izolasyonu için bakteri örneği 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine alındı. 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek örnek çöktürüldü. 180 µl lizozim enzim solüsyonu tüplere eklenerek, kit protokolüne göre lizozim solüsyonu hazırlandı. 1 ml lizozim solüsyonu için; 30 mg NZY lizozim tartılarak kit içeriğinde bulunan GP buffer içerisinde çözdürüldü. Karışım 37°C'de 30 dk bekletildi. Lizat üzerine 20 µl RNase A eklenerek karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 dk bekletildi. 20 µl Proteinase K solüsyonu (20mg/ml) ve 200 µl Buffer BL tüpe eklendi. 56°C'de 30 dk ve daha sonra 70°C'de tekrar 30 dk inkübe edildi. Lizat üzerine 200 µl absolut etanol eklenerek pulse-vortex metodu ile karıştırıldı. Tüm karışım Type-G spin kolana aktarılıp ve santrifüj edildi (13000 rpm, 1 dk). Santrifüj sonrasında kolondan geçen kısım atıldı. Kolon üzerine 600 µl Buffer BW eklenerek santrifüj edildi (13000 rpm, 1 dk.). Kolon üzerine 700 µl Buffer TW eklenerek santrifüje tabi tutuldu (13000 rpm, 1 dk.). Kolonda herhangi bir yıkama solüsyonu artığı kalmaması için kolon boş bir şekilde en yüksek rpmde 1 dk santrifüj edildi (14000 rpm, 1 dk). Kolon yeni bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne

alınarak üzerine 200 µl Buffer AE eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilip, sonra santrifüj edildi (14000 rpm, 1 dk.). Elde edilen DNA örneği -20°C’de saklandı.

DNA izolasyonu sonrasında PCR aşamasına geçildi. PCR reaksiyonu Applied Biosystems™ ProFlex termalcycler cihazında gerçekleştirildi. PCR reaksiyonu için kullanılan kitin markası, adı ve katalog numarası aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 7- 10).

**Tablo 7.** PCR reaksiyonu için kullanılan materyal bilgileri.

Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
WizPure™	PCR 2X Master	W1401

**Tablo 8.** PCR reaksiyonu için kullanılan mastermix bilgileri

MasterMix Bileşenleri	Hacim
PCR 2X MasterMix	10 µl
Forward Primer	0.5 µl
Reverse Primer	0.5 µl
Template DNA	2 µl
Su	7 µl
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo 9.** PCR reaksiyonu için kullanılan primer bilgileri.

Primer Adı	Primer Dizisi	Sentezleyen Firma
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Ella Biotech
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Ella Biotech

**Tablo 10.** PCR reaksiyonu koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Cycle
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1
Denatüre	95	30 saniye	
Sertleştirme	52	45 saniye	3
Genişletme	72	1 dakika	
Final Genişletme	72	5 dakika	1

PCR sonrasında 27F-907R bölgelerinin PCR ürünlerine %1.5'lik agaroz jel kullanılarak elektroforez uygulandı (110V, 150mA, 45 dk.). PCR ürünlerinin büyüklüğünün 900 bp civarında olduğu gözlemlendi. Ladder olarak GENESTA GA-100 1 kp ladder kullanıldı.

PCR reaksiyonundan sonra clean-up aşamasına geçildi. PCR clean-up aşamasında kullanılan materyaller aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 11- 13).

**Tablo 11.** PCR clean-up reaksiyonu için kullanılan materyal bilgileri.

Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
Thermo	ExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents	75001.200.UL

**Tablo 12.** PCR clean-up reaksiyonu için kullanılan mastermix bilgileri.

MasterMix Bileşenleri	Hacim
PCR ürünü	10 µl
ExoSAP-IT	4 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>14 µl</b>

**Tablo 13.** PCR clean-up reaksiyonu koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Cycle
İnkübasyon 1	37	4 dakika	1
İnkübasyon 2	80	1 dakika	1
Soğutma	4		1

PCR clean-up işleminden sonra DNA dizileme aşamasına geçildi. Dizileme reaksiyonu için kullanılan mastermix bilgileri tablo 14'te belirtilmiştir.

**Tablo 14.** DNA dizileme için kullanılan mastermix bilgileri.

MasterMix Bileşenleri	Hacim
PCR ürünü	5 µl
Primer (Forward veya Reverse)	1 µl
Florasana işaretli Dye Terminatör	1 µl
5X Sekans Buffer	4 µl
Su	2 µl
<b>Toplam</b>	<b>13 µl</b>

Dizileme reaksiyonunda PCR reaksiyonunda kullanılan primerler kullanıldı. Mastermix hazırlandıktan sonra dizileme reaksiyonuna geçildi. Dizileme için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 15). Dizileme reaksiyonu Applied Biosystems™ ProFlex termalcycler cihazında gerçekleştirildi.

**Tablo 15.** DNA dizileme reaksiyon koşulları.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Cycle
İlk Denatürasyon	95	30 dakika	1
Denatüre	95	10 saniye	
Sertleştirme	50	5 saniye	30
Genişletme	60	4 dakika	
Soğutma	4		1

DNA dizileme reaksiyonu bittikten sonra dizileme ürünü saflaştırma aşamasına geçildi. Saflaştırma işlemi Sephadex ile jel filtreleme metodu kullanılarak gerçekleştirildi. 6 gr Sefadex tartılıp üzerine 80 ml saf su eklendi ve vortekslendi. Kolonlara 850 – 900 µl hazırlanan Sefadex solüsyonundan koyuldu. 4600 rpm’de 2 dakika santrifüj edilip kolon hazırlandı. Sekans PCR ürününün hepsi kolona koyuldu ve 4800 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Alt tüpte kalan sıvı saflaştırılmış dizileme ürünü olarak saklandı.

DNA dizileme ürünü saflaştırma işleminden sonra DNA dizi analizi işlemine geçildi. Bu işlem kapiller elektroforez yöntemi kullanılarak ABI 3130XL cihazında gerçekleştirildi. 20 µl saflaştırılan dizileme ürünü 96 well plate kuyucuklarına eklendikten sonra üzerine 5 µl formamid konulup kapiller elektroforez işlemi başlatıldı. Sonuçlar cihazdan elde edilen

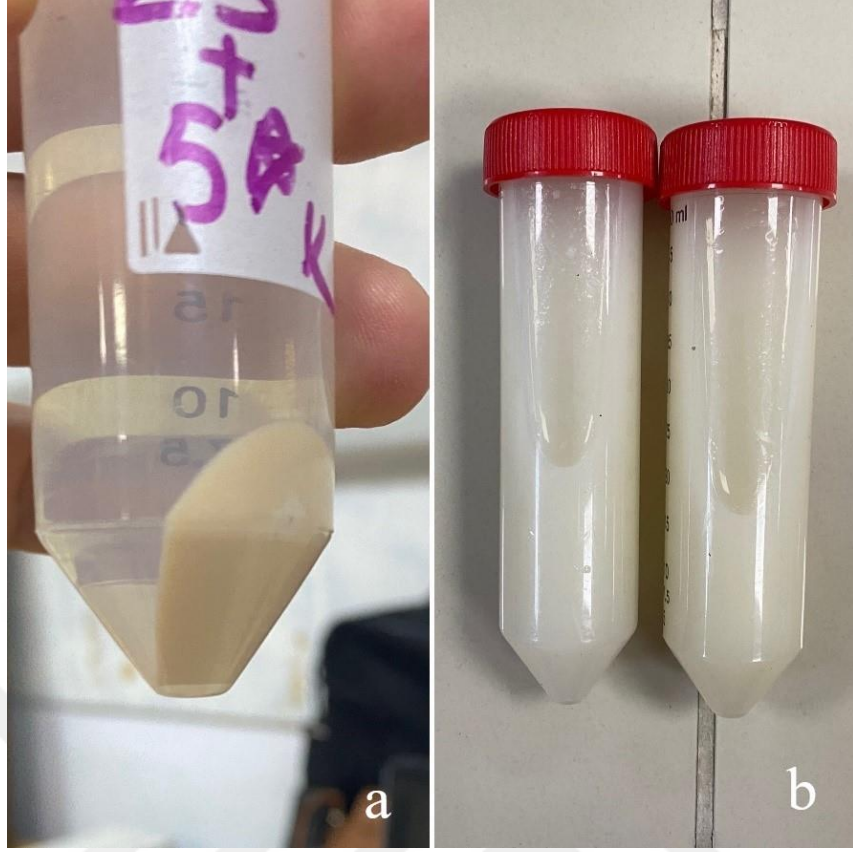
elektroferogramlara göre değerlendirildi. Sekansı yapılmış DNA verileri BLASTN 2.13.0+ programı kullanılarak GenBank veri tabanı ile eşleştirildi. Filogenetik sınıflandırma, neighbor-joining yöntemi ile MEGA11 programında yapıldı.

### **3.3. İmmunohistokimya**

#### **3.3.1. İmmunohistokimya İçin Antiserum Üretimi**

Çalışmanın immunohistokimya kısmında antiserumundan faydalanmak üzere 1 adet, yaklaşık 4-5 kg ağırlığında erişkin Yeni Zelanda albino tavşan kullanıldı. Çalışma süresince bakımı Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Deney Hayvanları Yetiřtirme ve Deneysel Araştırma Ünitesi'nde yapıldı. Deneme öncesinde çalışmaya alınan tavşan, fiziksel muayene sonucunda herhangi bir sağlık problemi bulunmadığına karar verildikten sonra çalışmaya dahil edildi. Deneme süresince tavşanın ad libitum olarak yeme ve suya erişimi sağlandı.

%1'lik formaldehit solüsyonu içerisine alınan bakteriler vortekslenerek +40°C'de 24 saat bekletildi. Sonrasında +40°C'de 6.500 rpm'de santrifüj edilen solüsyondan bakteriler toplanarak PBS ile 3 kez yıkayıp 6.500 rpm'de santrifüj edildi ve son santrifüj işleminden sonra inaktif bakteriler toplandı (Resim 2).



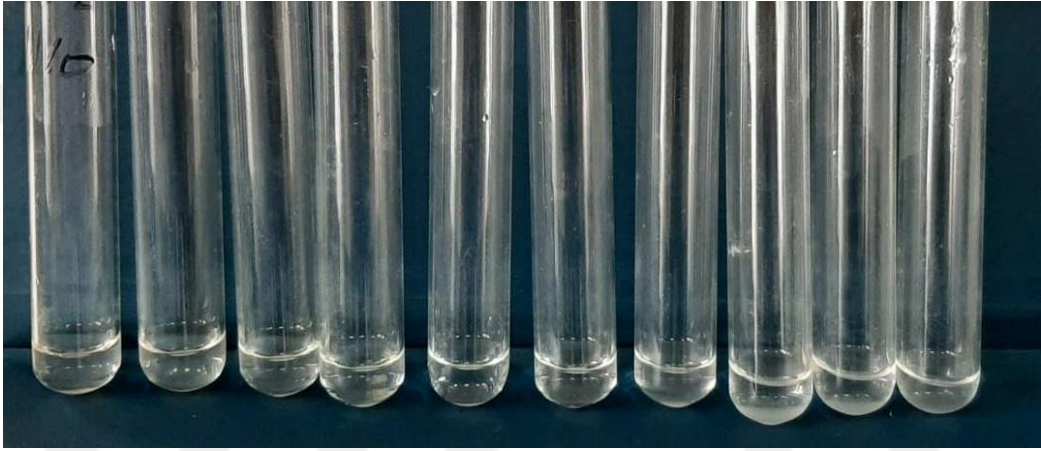
**Resim 2. (a)** 3 kere PBS ile yıkanıp 6.500 rpm'de santrifüj edildikten sonra elde edilen inaktif bakteriler, **(b)** %1'lik formol solüsyonuna alınan bakteri kolonileri ile hazırlanan solüsyon.

25–100 µg antijen, PBS ile sulandırılarak hazırlanan solüsyon 1:1 oranında Complete Freund's adjuvant ile karıştırıldı ve elde edilen karışım subkutan yolla, her enjeksiyon yaklaşık 40–50 µL içeren, 4-5 farklı bölgeden toplamda 200 µL olacak şekilde ilk enjeksiyon yapıldı. İlk enjeksiyondan 14 gün sonra Incomplete Freund's adjuvant ile hazırlanan booster doz yine aynı yolla enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan 10 gün sonra tavşanların kulak venasından 30 ml kan alınarak serum elde edildi. Elde edilen antiserum dokulardaki lezyonların immunohistokimyasal boyamasında kullanıldı (Greenfield, 2020).

### 3.3.2. Serum Aglütinasyon Testi

Tavşanlardan elde edilen serumlar, kontrol serumları ve antijen oda sıcaklığına (20-22°C) gelene kadar bekletildi. Serum dilüsyonu için 10 adet aglütinasyon tüpü alınarak, birinci tüpe 0,8ml, ikinci ve diğer tüplere 0,5ml %0,5 fenollü fizyolojik tuzlu su (FFTS)

kondu. Birinci tüpteki FFTS üzerine 0,2ml muayene edilecek serum ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra 1. tüpten 0,5ml alındı ve ikinci tüpe kondu, karıştırıldıktan sonra 0,5ml'si diğer tüpe aktarıldı. Bu sulandırma ve karıştırma işlemi son tüpe kadar devam etti. Son tüpten 0,5ml alınıp atıldı. Bu şekilde serum dilüsyonları 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80... şeklinde oldu. Her tüpe 0,5ml üretmiş olduğumuz *Aeromonas veronii* antijeni ilave edildi ve tüpler sallanarak iyice karıştırıldı. Serum-antijen karışımı oranları 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160... şeklinde hazırlandı. Tüpler 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve 17-24 saat sonra sonuçlar okundu (Resim 3).



**Resim 3.** Serum aglütinasyon testi.

### 3.3.3. İmmunohistokimyasal Metot

Poly-L-lysine kaplı lamlara alınan 0,5 mikron kalınlığındaki kesitler, bakteriye ilişkin antikor kullanılarak etkenin tespiti için immunohistokimyasal metotlarda kullanıldı. Alınan seri parafin kesitler, Labeled Streptavidin-Biotin (LSAB) metodunun öngördüğü şekilde ve ilgili firmanın önerileri doğrultusunda takip edildi. Kesitler, deparafinizasyon ve dehidrasyondan sonra antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması amacı ile, sitrat buffer solüsyonunda (pH 6.0) su banyosu (95°C, 30 dk) ile işleme tabi tutuldu. Dokulardaki endojen peroksit aktivitesini önlemek için, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in metanoldeki (%3) çözeltisinde 15 dakika bekletildi ve spesifik olmayan antijenik bağlanmaları engellemek için %5'lik keçi serumunda 5 dakika tutuldu. Çalışmada kullanılacak primer antikor (Anti-*Aeromonas* spp.) etkenin dokulardaki dağılımı ve hücre lokalizasyonlarını belirlemek için kullanıldı. Primer antikor uygulamasını takiben dokular sırasıyla, biotinlenmiş tavşan anti-*Aeromonas*

immunoglobulin G ile 15 dakika inkübe edildi. Ardından tüm kesitler PBS ile üç defa yıkayıp peroksidaz bağı streptavidin ile bir saat süreyle inkübe edildi. Devamında tüm kesitler PBS ile üç defa yıkandı. Doku kesitlerine, renk ortaya çıkarıcı substrat olarak, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (0.5 mg DAB/ml) ve 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) kromojen solüsyonu, 3 dakika süreyle uygulandı. Arka plan boyaması Mayer's Hematoksilen ile 5 saniye boyama ve sonrasında da 5 dakika süreyle musluk suyunda yıkanarak yapıldı. Dehidrasyonu takiben, kesitler immunmount ile kaplanarak ve ışık mikroskopunda incelenerek değerlendirildi.

### **3.4. Histopatolojik İnceleme**

%10' luk tamponlu formalin solüsyonuna maksimum 48 saat olacak şekilde tespit edilmek üzere alınan organ kesitleri, 6-8 saat süre ile akan çeşme suyu ile yıkandı. Otomatik doku takip cihazında (Leica TP 1020) bilinen yöntemlerle alkol (70°, 80°, 90°, 96° ve 100°) ve ksilol serilerinde işlem gördükten sonra parafinde bloklandı ve bu bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitlerin tamamı (Mikrotom, Leica RM 2135), hematoksilen ve eozin (HE) ile boyandı. Dokular ayrıca Ziehl-Neelsen ile boyandı.

Hematoksilen ve eozin boyama amacı ile alınan kesitler önce ksilolde deparafinize edildi, ardından absöüt, %96 'lık, %80'lik ve %70'lik alkollerden geçilip rehidre edildikten sonra Mayer's hematoksilen ile boyandı. Kesitler akan musluk suyu ile yıkayıp asit alkolle muamele edilerek boyanın fazlası giderildi. Distile suda yıkama işlemini takiben, kesitler eozin ile boyayıp seri alkollerden ve ksilolden geçirilerek entellan ile kapatıldı.

### **3.5. Ziehl-Neelsen Boyama**

Doku takip işlemini takiben alınan seri kesitler Ziehl-Neelsen boyamaya tabi tutuldu. Isıtma, deparafinizasyon ve rehidrasyon işleminden sonra kesitler filtre edilmiş karbol fuksin solüsyonunda 30 dk bekletildi. Akarsuda temiz su akana kadar yıkanan kesitler dekolorizasyon için %1'lik asit alkol solüsyonundan geçirildi. Distile su ile yıkamanın ardından metilen mavisi çalışma solüsyonuna daldırılıp çıkarıldı. Kesitler akarsuda yıkandıktan sonra dehidre edilip ksilolden geçirildi ve entellan ile kapatıldı.

### 3.6. Brown-Hopps Boyama

Doku takip işlemini takiben alınan seri kesitler aynı modifiye Gram boyama Brown-Hopps yöntemi ile boyandı. Deparafinizasyon ve rehidrasyon işleminden sonra kesitler kristal viyolede 2 dk bekletilip distile suda yıkandı. Ardından Gram iyodinde 5 dk tutulduktan sonra fazla iyodinin uzaklaşması için distile sudan geçirildi. Aseton ile dekolorizasyonu yapıldıktan sonra yıkanıp bazik fuksinin çalışma solüsyonunda 5 dk bekletilen kesitler distile su ile yıkandı ve devamında Gallego solüsyonunda 5 dk tutuldu. Kesitler distile su ile yıkanıp 3'er kez asetona daldırılıp çıkarıldı ve ardından pikrik asit-aseton solüsyonunda 3 kez hızlıca daldırma işlemi yapıldı. Son asetonu takiben ksilolden geçirildi ve entellan ile kapatıldı.

## 4. BULGULAR

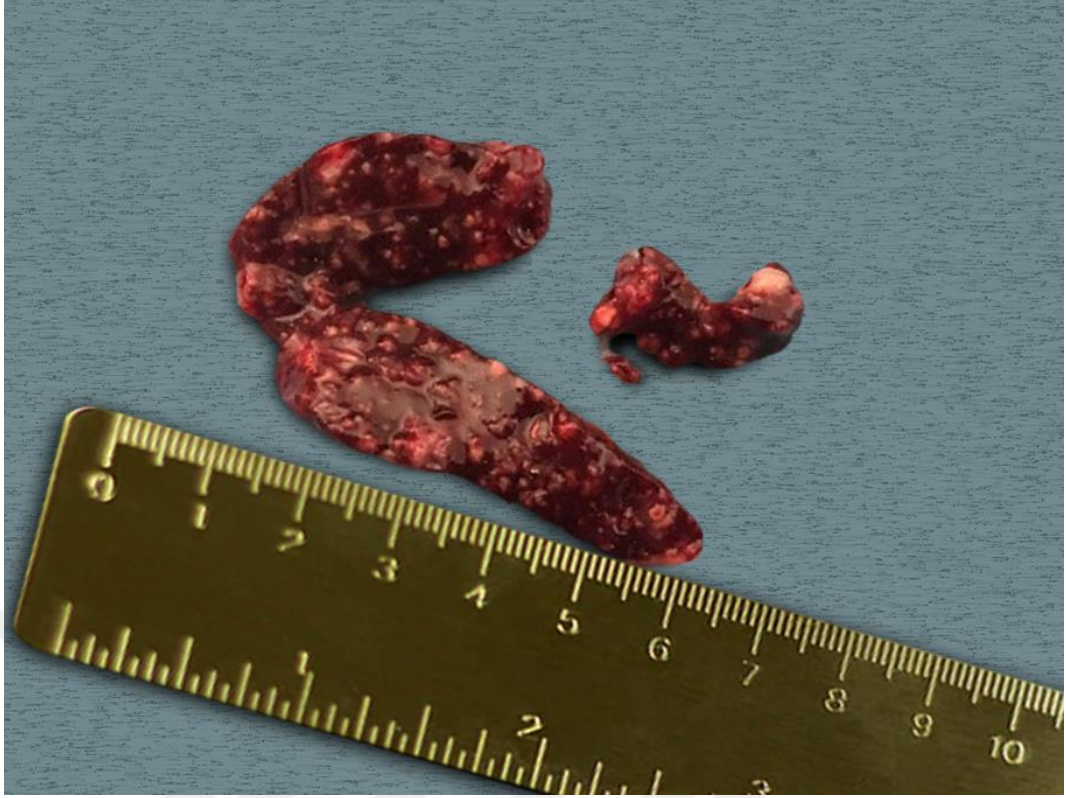
### 4.1. Nekropsi Bulguları

Makroskobik olarak incelenen balıkların operkulumlarında 0,1-0,5cm. çaplarında ve sayıları 1-3 adet arasında değişen kanama odakları görüldü (13 Olgu, tüm olguların %59'u, olgu no; 1-5, 9, 12-17, 19). Deri üzerinde peteşiyel kanama odakları gözlemlendi ve bu odakların yerleşim olarak lateral çizgi üzerinde (4 Olgu, tüm olguların %18'i, olgu no; 4, 8, 13, 17), pelvik yüzgeçlerin dip kısımlarında (4 Olgu, tüm olguların %18'i, olgu no; 4, 9, 21, 22), lateral çizginin ventralinde (3 Olgu, tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 5, 9, 17), pedinkul bölgesinde (5 Olgu, tüm olguların %22,7'si, olgu no; 5, 10, 14-16) ve pektoral yüzgeçlerin deriye bitişik kısımlarında (5 Olgu, tüm olguların %22,7'si, olgu no; 5, 8, 9, 21, 22) olduğu belirlendi. Deride tek taraflı olarak bulunan ve çapları 2 cm'ye kadar ulaşan ülserler altı olguda (Tüm olguların %27,2'si, olgu no; 1, 2, 6, 14, 17, 19) gözlemlendi (Resim 4). Bazı olgularda anüste ödemle ilişkili şişkinlik ve hiperemi kaydedildi (7 Olgu, tüm olguların %31,8'i, olgu no; 2, 4, 8, 9, 17 – 19). Solungaçlarda solgunluk (9 Olgu, tüm olguların %40,9'u, olgu no; 1, 2, 7, 8, 13, 14, 18, 19, 22), hemoraji (4 Olgu, tüm olguların %18'i, olgu no; 1, 4, 6, 14) ve ekimotik kanamalar diğer göze çarpan bulgulardı (4 Olgu, tüm olguların %18'i, olgu no; 3, 6, 13, 20).

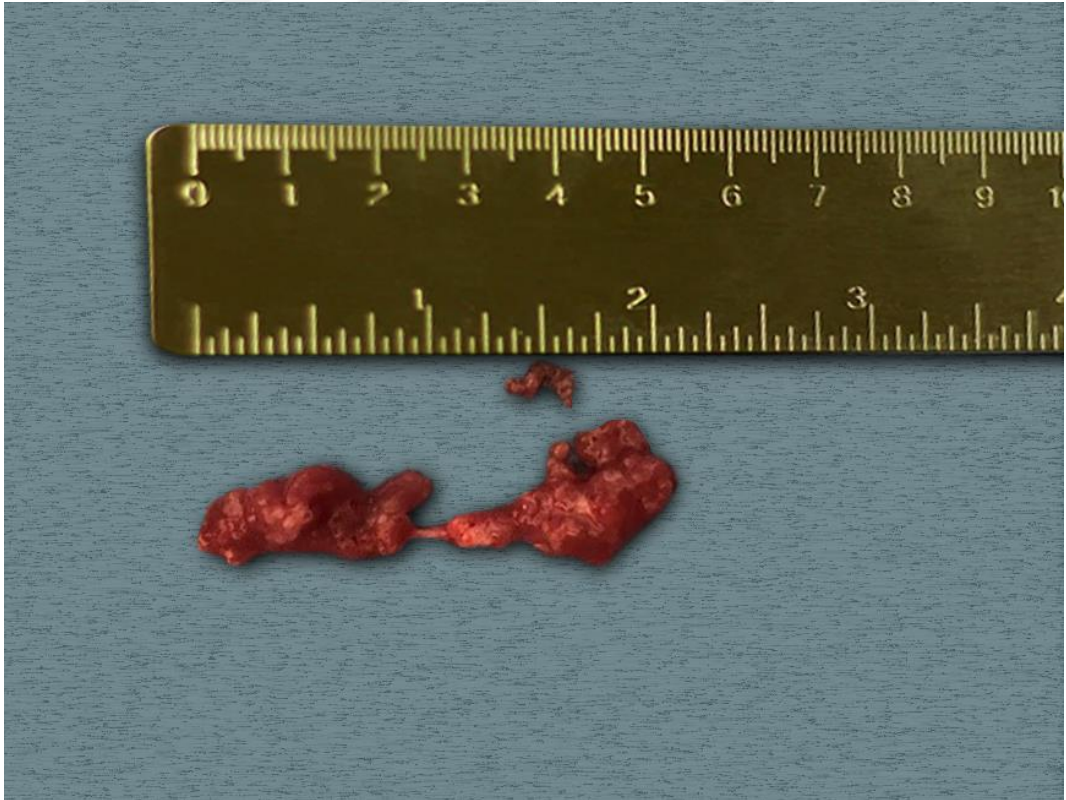


**Resim 4.** Deri üzerinde yaklaşık 2 cm çapında ülserli bölge. Olgu no: 6.

İç organlarda; hastalıktan en çok etkilenen organların karaciğer, dalak ve böbrek olduğu tespit edildi. Hastalık için en karakteristik bulgu olan granülomların görülme sıklığı böbrek, dalak ve karaciğer olarak sıralandı. Bu granülomlar boz-beyaz renkte, makroskopik olarak görülebilen ve 0,05-0,2 mm çaplarında ve genelde toplu iğne başı büyüklüğünden daha küçük bir morfolojiye sahipti (Resim 5). Hastalıktan etkilenen tüm olguların karaciğerinde boyutları 0,1mm ile 1,5 cm arasında değişen fokal hemorajiler ile bir olguda da solgun renkte geniş nekroz odağı (1 Olgu, tüm olguların %4,5'i, olgu no; 14) görülmekteydi ve 6 olguda (Tüm olguların %27,2'si, olgu no; 3, 4, 14-16, 19) granülom makroskopik muayeneye yansımıştı. Splenomegali tüm olgularda görülürken, dalaktaki granülomlar 17 olguda (Tüm olguların %77,2'si, olgu no; 1-4, 7, 9, 10, 12, 14-22) dikkati çekti. Böbrekte benzer yapıdaki granülomlar 18 olguda (Tüm olguların %81,8'i, olgu no; 1-4, 6, 7, 9, 10, 13-22) dikkati çekerken, kranial böbrekteki lokalizasyonu daha ağırlıklı olduğu kaydedildi (Resim 6). Bazı olgularda hava kesesinin normalden daha şişkin olduğu gözlemlendi (5 Olgu, tüm olguların %22,7'si, olgu no; 8, 9, 14, 17, 19). Dört olgunun (Tüm olguların %18'i, olgu no; 3, 5, 8, 18) kalbin ventrikül bölgesinde dalaktakine benzer boyut ve görünümde granülomlar gözlemlendi (Resim 7). Bağırsaklarda dilatasyon ve sıvı içerik gözlemlendi (3 Olgu, tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 5, 8, 19). Gonadlarda üç olguda (Tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 4, 14, 19) hemoraji ve iki olguda da (tüm olguların %9'u, olgu no; 14, 19) normalden büyük bir görünüm sergilediği ve makroskopik olarak da granülomların varlığı dikkati çekti.



**Resim 5.** Dalakta çok sayıda granülomlar. Olgu no: 17.



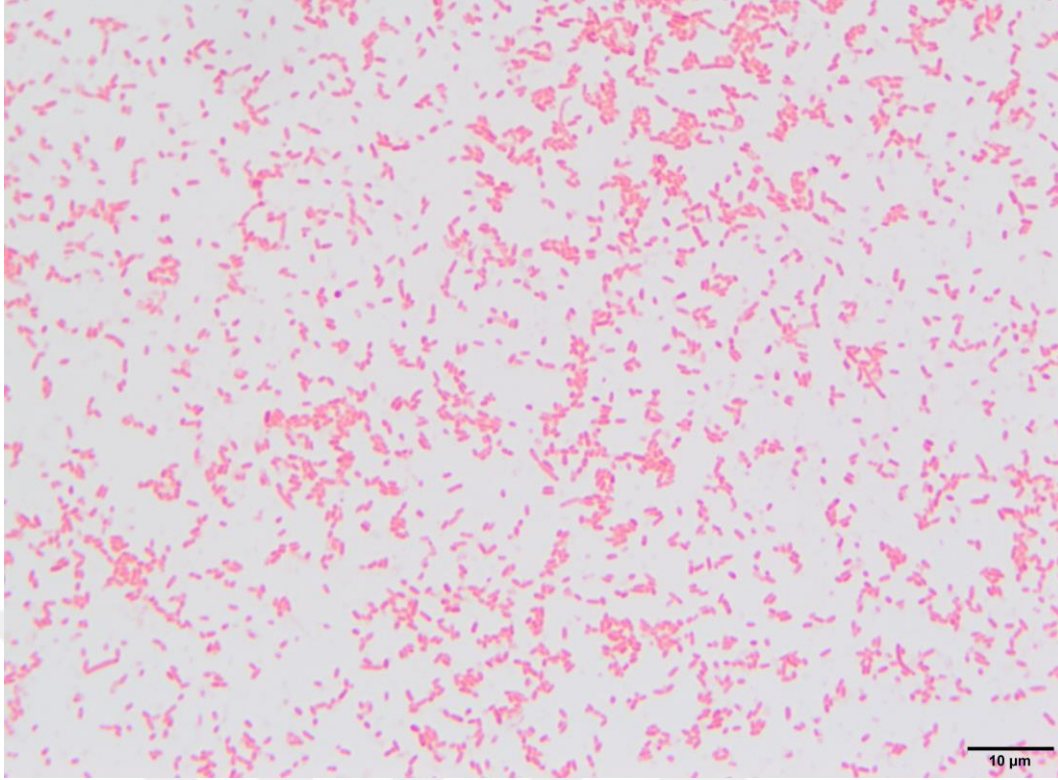
**Resim 6.** Böbrekte çok sayıda granülomlar. Olgu no: 13.



**Resim 7.** Kalp üzerinde granülomlar. Olgu no: 6.

#### **4.2. Bakteriyolojik Bulgular**

Kanlı agar ve TSA'da düzgün kenarlı yuvarlak koloniler 24°C'de 48 saatlik inkübasyonun sonunda tespit edildi. Koloniler beyaz-grimsi bir renkte tespit edildi. Tüm izolatlar Gram negatif ve çubuk şekilli idi (Resim 8). İzolatların tümünde oksidaz ve katalaz pozitif tespit edildi. Motilite tüm izolatlarda pozitif tespit edildi. Mueller Hinton agarda 24°C'de 72 saatlik inkübasyonun sonunda pigmentasyon hiçbir izolatta görülmedi. Kanlı agarda tüm izolatların hemoliz oluşturduğu tespit edildi.



**Resim 8.** Gram boyamada, Gram negatif, çubuk şekilli bakteri morfolojisi.

%1,5 NaCl ilave edilmiş olan TSA agarda tüm izolatlar 24°C’de 48 saatte üreme gösterdiler, TCBS agarda 24°C’de 72 saatin sonunda hiçbir izolatta üreme tespit edilmedi. Aeromonas agarda da 24°C’de 48 saatte üremelerin olduğu tespit edildi. Kanlı agarda 24°C’de 48 saatte üreme tespit edilirken, bakterinin hemolitik aktivitesi en belirgin olarak bu besiyerinde tespit edildi (Tablo 16).

**Tablo 16.** Tüm izolatlarda görülen ortak fenotipik özellikler.

	<b>Özellik</b>
Gram Boyama	Negatif
Koloni Morfolojisi	Düzgün kenarlı, Yuvarlak, Beyaz-Gri renkli
Bakteri Morfolojisi	Çubuk Şeklinde
Hemolitik Aktivite	Pozitif
Motilite	Pozitif
Pigment Oluşumu	Negatif
Oksidaz	Pozitif
Katalaz	Pozitif
% 1,5 NaCl içeren TSA'da Üreme	Pozitif
Aeromonas Agarda Üreme	Pozitif
TCBS'de Üreme	Negatif
Kanlı Agarda Üreme	Pozitif

API 20E Biyokimyasal testleri olgu no; 6, 10, 13, 14, 17, 18'e uygulandı (Tablo 17). API 20E biyokimyasal test sonuçlarına göre tüm izolatlarda arjinin dihisrolaz (ADH), lizin dekarboksilaz (LDC), ornitin dekarboksilaz (ODC), sitrat kullanımı (CIT), H<sub>2</sub>S üretimi (H<sub>2</sub>S), üreaz (URE), inositol fermentasyonu/oksidasyonu (INO), sorbitol fermentasyonu/oksidasyonu (SOR), ramnoz fermentasyonu/oksidasyonu (RHA), sükroz fermentasyonu oksidasyonu (SAC), melibioz fermentasyonu/oksidasyonu (MEL), amigdalin fermentasyonu/oksidasyonu (AMY), arabinoz fermentasyonu/oksidasyonu (ARA) negatif olarak tespit edilirken tüm izolatlarda indol üretimi (IND), asetoin üretimi (VP), jelatinaz (GEL), glukoz fermentasyonu/oksidasyonu (GLU), mannitol fermentasyonu/oksidasyonu (MAN) pozitif olarak bulundu. Beta galaktosidaz (ONPG) olgu no 10'da negatif olarak tespit edilirken, olgu no 6, 13, 14, 17, 18'de pozitif olarak bulundu. Triptofan deaminaz (TDA) ise olgu no 10'da pozitif olarak bulunurken, olgu no 6, 13, 14, 17, 18'de negatif olarak tespit edildi.

**Tablo 17.** API 20E biyokimyasal test sonuçları.

Test	Kısaltma	Olgu No					
		6	10	13	14	17	18
Beta galaktosidaz	ONPG	+	-	+	+	+	+
Arjinin dihidrolaz	ADH	-	-	-	-	-	-
Lizin dekarboksilaz	LDC	+	+	+	+	+	+
Ornitin dekarboksilaz	ODC	+	+	+	+	+	+
Sitrat kullanımı	CIT	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S Üretimi	H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-
Üreaz	URE	-	-	-	-	-	-
Triptofan deaminaz	TDA	-	+	-	-	-	-
İndol üretimi	IND	+	+	+	+	+	+
Asetoin üretimi	VP	+	+	+	+	+	+
Jelatinaz	GEL	+	+	+	+	+	+
Glukoz fermentasyon/oksidasyonu	GLU	+	+	+	+	+	+
Mannitol fermentasyon/oksidasyonu	MAN	+	+	+	+	+	+
İnositol fermentasyon/oksidasyonu	INO	-	-	-	-	-	-
Sorbitol fermentasyon/oksidasyonu	SOR	-	-	-	-	-	-
Ramnoz fermentasyon/oksidasyonu	RHA	-	-	-	-	-	-
Sükroz fermentasyon/oksidasyonu	SAC	-	-	-	-	-	-
Melibioz fermentasyon/oksidasyonu	MEL	-	-	-	-	-	-
Amigdalin fermentasyon/oksidasyonu	AMY	-	-	-	-	-	-
Arabinoz fermentasyon/oksidasyonu	ARA	-	-	-	-	-	-

VITEK-2 cihazı ile biyokimyasal parametrelerin belirlenmesi işlemi olgu no; 6, 10, 13, 14, 17, 18'e uygulandı. Buna göre API 20E testinde olduğu gibi beta galaktosidaz (BGAL) olgu no 10'da negatif olarak tespit edilirken, olgu no 6, 13, 14, 17, 18'de pozitif olarak bulundu. Diğer parametreler açısından izolatlar arasında bir farklılık tespit edilmedi. Detaylı sonuçlar Tablo 18'de verilmiştir.

**Tablo 18.** VITEK-2 biyokimyasal test sonuçları.

Test	Kısaltma	Olgu No					
		6	10	13	14	17	18
Ala-Phe-Pro-Arilamidaz	APPA	-	-	-	-	-	-
Adonitol	ADO	-	-	-	-	-	-
L-Pirolidonil-Arilamidaz	PyrA	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	IARL	-	-	-	-	-	-
D-Sellobiyoz	dCEL	-	-	-	-	-	-
Beta-Galaktosidaz	BGAL	+	-	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S üretimi	H2S	-	-	-	-	-	-
Beta-N-Asetil-Glukozaminidaz	BNAG	+	+	+	+	+	+
Glutamil Arilamidaz pNA	AGLTp	-	-	-	-	-	-
D-Glukoz	dGLU	+	+	+	+	+	+
Gamma-Glutamil-Transferaz	GGT	-	-	-	-	-	-
Fermantasyon / Glukoz	OFF	+	+	+	+	+	+
Beta-Glukosidaz	BGLU	-	-	-	-	-	-
D-Maltoz	dMAL	+	+	+	+	+	+
D-Mannitol	dMAN	+	+	+	+	+	+
D-Mannoz	dMNE	+	+	+	+	+	+
Beta-Zilosidaz	BXYL	-	-	-	-	-	-
Beta-Alanin arilamidaz pNA	BAIap	-	-	-	-	-	-
L-Prolin Arilamidaz	ProA	+	+	+	+	+	+
Lipaz	LİP	-	-	-	-	-	-
Palatinoz	PLE	-	-	-	-	-	-
Tirosin Arilamidaz	TyrA	+	+	+	+	+	+
Üreaz	URE	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	dSOR	-	-	-	-	-	-
Sakkaroz/Sükroz	SAC	-	-	-	-	-	-
D-Tagatoz	dTAG	-	-	-	-	-	-
D-Trehaloz	dTRE	+	+	+	+	+	+
Sitrat (Sodyum)	CIT	-	-	-	-	-	-
Malonat	MNT	-	-	-	-	-	-
5-Keto-D-Gluconate	5KG	-	-	-	-	-	-
L-Laktat Alkalinleşmesi	ILATk	-	-	-	-	-	-

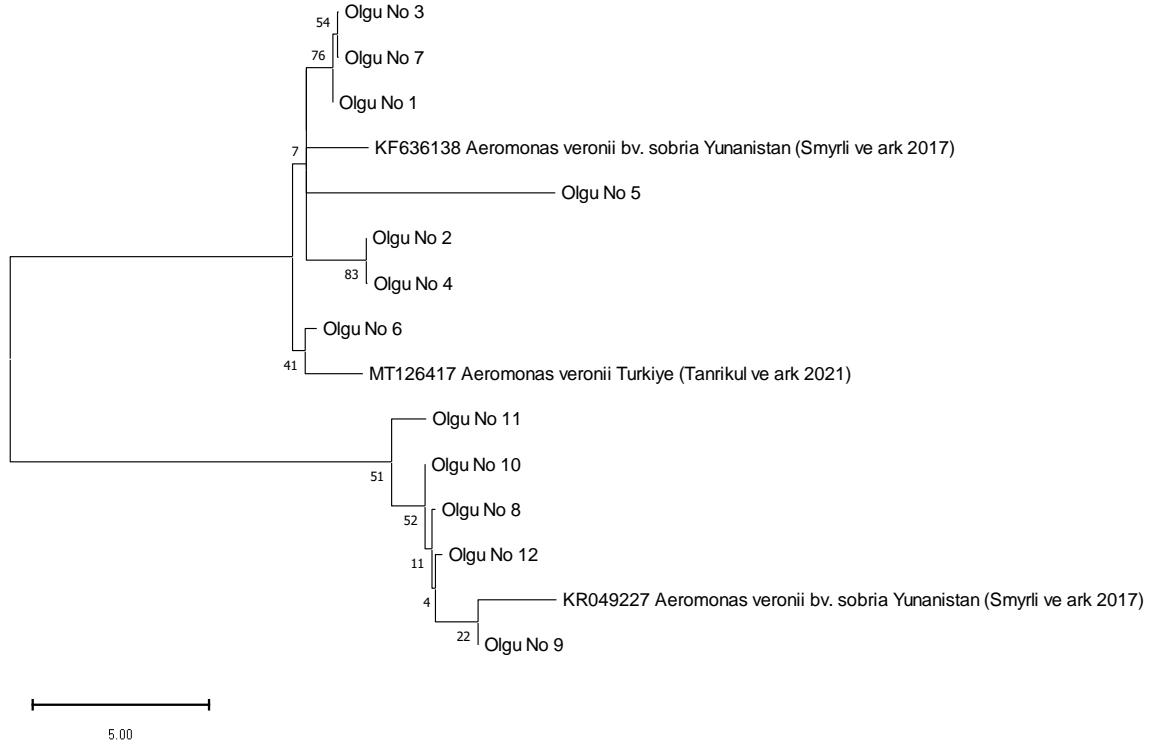
Tablo 18. VITEK-2 biyokimyasal test sonuçları (devam).

Alfa-Glukosidaz	AGLU	-	-	-	-	-	-
Sukkinat Alkalinizasyonu	SUCT	+	+	+	+	+	+
Beta-N-Asetil-Galaktozaminidaz	NAGA	+	+	+	+	+	+
Alfa-Galaktosidaz	AGAL	-	-	-	-	-	-
Fosfataz	PHOS	-	-	-	-	-	-
Glisin Arilamidaz	GlyA	-	-	-	-	-	-
Ornitin Dekarboksilaz	ODC	+	+	+	+	+	+
Lisin Dekarboksilaz	LDC	+	+	+	+	+	+
L-Histidin Asimilasyonu	IHISa	-	-	-	-	-	-
Koumarat	CMT	+	+	+	+	+	+
Beta-Glukuronidaz	BGUR	-	-	-	-	-	-
O/129 Direnç (comp.vibrio.)	O129R	+	+	+	+	+	+
Glu-Gli-Arg-Arilamidaz	GGAA	-	-	-	-	-	-
L-Malat Özümlenme	IMLTa	-	-	-	-	-	-
Ellman	ELLM	+	+	+	+	+	+
L-Laktat Asimilasyonu	ILATa	-	-	-	-	-	-

Çalışmadaki tüm izolatların 16S rRNA sekans sonuçları BLASTN 2.13.0+ veritabanında incelendiğinde *Aeromonas veronii* ile %96 – 98 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği görüldü. İzolatların benzerlik yüzdeleri ve benzerlik gösterdiği izolat numaraları Tablo 19’da belirtilmiştir.

**Tablo 19.** 16S rRNA sekans datalarının BLASTN 2.13.0+ programında değerlendirilmesi.

<b>Olgu No</b>	<b>Benzerlik Gösterdiği Tür</b>	<b>Benzerlik Oranı</b>
1	<i>Aeromonas veronii</i>	%97
2	<i>Aeromonas veronii</i>	%98
3	<i>Aeromonas veronii</i>	%98
4	<i>Aeromonas veronii</i>	%97
5	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%97
6	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%98
7	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%98
8	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%98
9	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%98
10	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%97
11	<i>Aeromonas veronii</i>	%97
12	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%98
13	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%96
14	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%96
15	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%98
16	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%96
17	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%96
18	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%97
19	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%96
20	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%97
21	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%97
22	<i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i>	%98



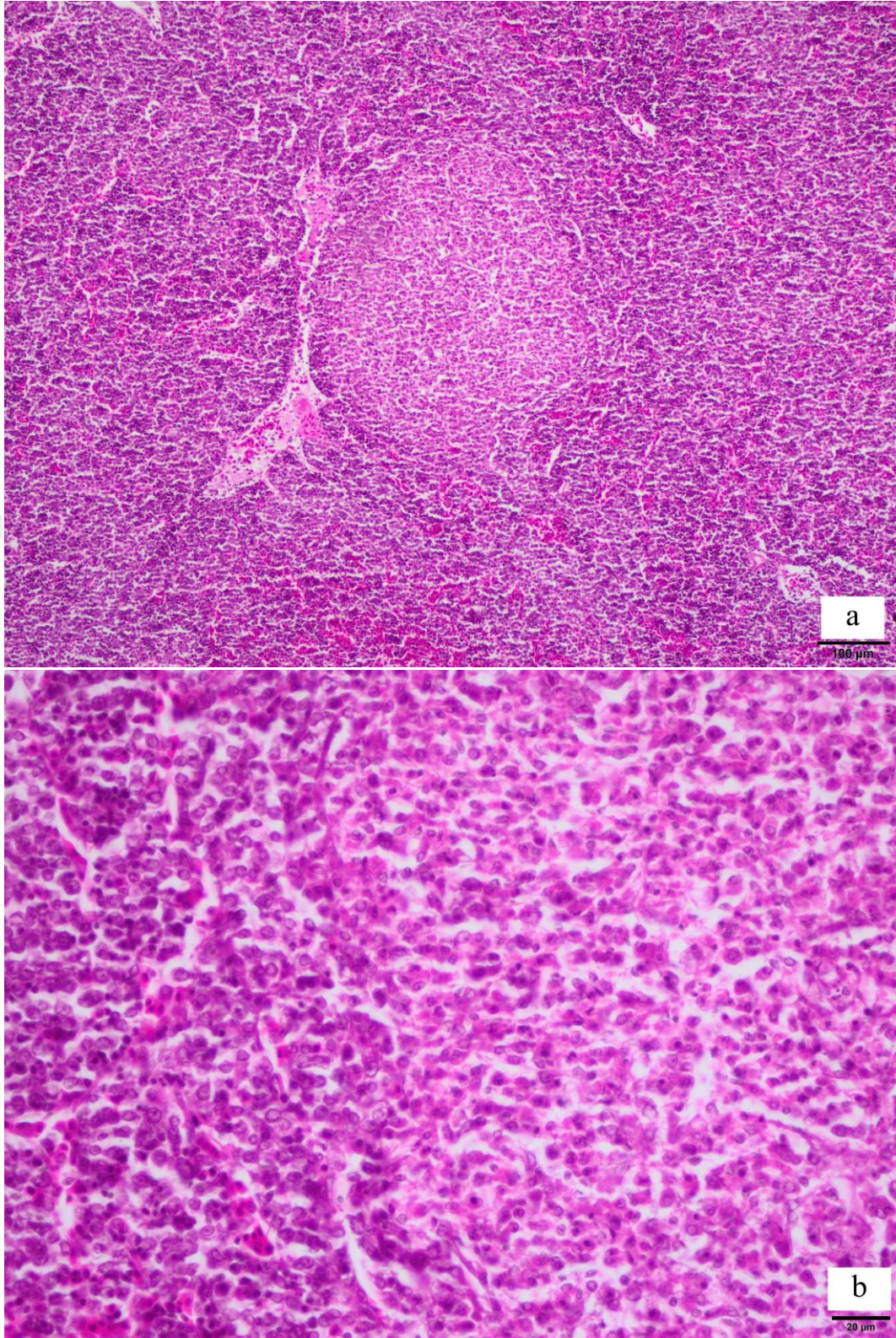
**Şekil 3.** Olgu no 1 - 12 ile levrekten Türkiye’de izole edilen (Dinçtürk ve Tanrikul, 2021) ve Yunanistan’da izole edilen (Smyrli ve diğerleri, 2017) izolatların 16srRNA sekansları baz alınarak Mega11 programı ile Maximum Composite Likelihood Methoduna göre 1000 bootstrap çoğaltması ile hazırlanmış filogenetik sınıflandırması.

### 4.3. Histopatolojik Bulgular

Sunulan tez çalışmasında *Aeromonas veronii*’ye ilişkin doğal enfeksiyonda en çarpıcı bulgu başta dalak, böbrekler, karaciğer ve deri olmak üzere daha nadir olarak diğer dokularda gözlenen granülomlardı. Histopatolojik olarak bu granülomların gelişimleri semikantitatif olarak 5 evrede tanımlandı. I. evre granülomda sağlam makrofajlar (10-20’li hücre grupları) küçük odaklar halinde epitelooid bir küme oluşturacak şekilde yığılım göstermiş ve kapsül yapısı içermemekteydiler (Resim 7 a ve b). II. evre granülomlar ise dejenere-sağlam çoklu makrofaj hücre gurubundan oluşan ve geniş bir alanı kaplayan, fibröz kapsül oluşumu belli-belirsiz olan genç granülomlardan oluşmakta idi. Bu granülomlarda özellikle dejenere makrofajların sitoplazmalarında bakteri içeriği HE boyamada da farkedilmekteydi. III. evre granülomların ise, hayali bir görünümde koagülasyon nekrozuna uğramış makrofajlar (şişkin ve koyu eozinofilik sitoplazma, karyolizis/karyoreksis ve hayali bir silüet) ve bunu kuşatan sağlam makrofajlardan oluşan yangısal bir kuşak ve fibröz doku ile kapsüllendiği göze çarptı.

Nekrotik hücrelerden bazılarının bakteri içerdiği de gözlemlendi. IV. evre granülomların ise, III. evredeki nekrotik makrofajların tamamen yıkılmalarıyla kazeifiye nekrotik bir içeriğe dönüştüğü gözlemlendi. Hatta bu evredeki bazı granülomlardaki yangısal hat makrofajların da tamamen kazeifiye nekrotik içeriğe katılarak, granülomun direkt olarak fibröz doku ile kapsüllendiği gözlemlendi. V. evredeki granülomlarda ise kapsülü oluşturan fibrositler kazeifiye nekroz alanını dolduracak şekilde proliferasyon gösterdi ve granülomun sklerotik bir görünüm aldığı dikkati çekti. Bu evredeki bazı granülomlarda kazeifiye alanın fibrosit proliferasyonlarıyla tamamen doldurulduğu gözlemlendi.

Granülomların yoğunlukları ise semikantitatif olarak, her organ için doku kesitinin tamamında 1 ila 3 adet granülom görülmesi durumunda hafif, 3 ila 5 adet arasında granülom görülmesi durumunda orta ve 5'ten fazla granülom görülmesi durumunda şiddetli olarak değerlendirildi.



**Resim 9.** (a) ve (b) Çok sayıda makrofaj kümelenmelerinden oluşan I. evre granülom. Kraniyal böbrek, olgu no:4, HE.

Granülomların sayı ve dağılımları hafif, orta şiddette ve şiddetli olarak üç kategoride değerlendirildi. Tablo 20’de granülomların organlar ve olgulara göre değişimleri özetlenmiştir.

**Tablo 20.** Olgulara göre granülom görülen organlar.

Olgu No	Makroskopik Granülom Görülen Organlar	Histopatolojik				
		Karaciğer	Dalak	Kraniyal Böbrek	Kaudal Böbrek	Diğer
1	DI, Bb	I (Ş), II (Ş), III (H).	I (Ş), II (Ş), III (H), IV (H).	I (Ş), II (Ş), III (O), IV (O).	I (O), II (O).	Dr IV.
2	DI, Bb		I (Ş), II (Ş), III (O), IV (H).	I (Ş), II (Ş), III (Ş), IV (O).	I (O), II (O).	Dr IV, KI III.
3	DI, Bb, KI, KC	III (Ş), IV (Ş).	IV (Ş), V (Ş).	III (Ş), IV (Ş).	III (O), IV (O).	Dr IV, KI III.
4	KC, DI, Bb	I (Ş), II (Ş), III (H), IV (H).	I (Ş), II (Ş).	I (Ş), II (Ş), III (Ş).	I (H), II (H).	
5	KI		III (H), IV (H).	I (H), II (H), III (H), IV (H).	III (Ş), IV (Ş).	KI III, Gon III.
6	Bb	I (Ş), II (Ş), III (O), IV (H).	I (Ş), II (Ş), III (H).	I (H), II (H).	I (H), II (H).	Dr IV.
7	DI, Bb	I (H), II (H).	III (Ş), IV (Ş), V (Ş).	III (Ş), IV (Ş), V (O).	III (O), IV (O).	
8	KI		I (H), II (H).	I (H), II (H).		KI III.
9	Bb, DI	I (Ş), II (O).	IV (H).	I (O), II (O), III (Ş), IV (Ş), V (Ş).	III (O), IV (O), V (O).	
10	DI, Bb	I (H), II (H).	I (O), II (O).	V (Ş).	I (O), II (O), III (O).	
11			I (O), II (O), III (Ş).			
12	DI	I (H), II (H).	III (O), IV (Ş).	III (O).		
13	Bb	I (Ş), II (Ş), III (Ş), IV (O).	V (H).	III (O), IV (O).	I (H), II (H).	

Tablo 20. Olgulara göre granülom görülen organlar (devam).

14	KC, Dl, Bb, Gon	I (§), II (§), III (§), IV (O).	III (§), IV (§), V (§).	V (§).	III (H), IV (H), V (H).	Dr IV Bey IV, Gon IV.
15	KC, Dl, Bb	I (§), II (§), III (§), IV (O).	I (O), II (O), III (§), IV (§), V (§).	III (§), IV (§).	I (O), II (O), III (§), IV (§).	Dr IV, Sol IV.
16	KC, Dl, Bb, Gon	I (§), II (§), III (§), IV (O).	III (§), IV (§), V (§).	III (§), IV (§), V (§).	III (H), IV (H), V (H).	Dr IV, Sol IV, Gon IV.
17	Dl, Bb	IV (§)	IV (§), V (§)	III (§), IV (§)		Dr IV
18	Dl, Bb, Kl	I (§), II (§), III (O), IV (O)	IV (H), V (H)	I (§), II (§), III (O), IV (O)	I (O), II (O)	Kl III,
19	KC, Dl, Bb, Gon	I (§), II (§), III (§), IV (§)	III (O), IV (§), V (§)	III (§), IV (§), V (§)	III (O), IV (O)	Dr IV. Sol II, IV. Gon IV.
20	Bb, Dl	I (§), II (O).	IV (H).	I (O), II (O), III (§), IV (§), V (§).	III (O), IV (O), V (O).	
21	Dl, Bb	I (§), II (§), III (H).	I (§), II (§), III (H).	I (§), II (§).	I (O), II (O).	
22	Dl, Bb.	I (H), II (H).	I (O), II (O).	IV (§).	I (O), II (O).	

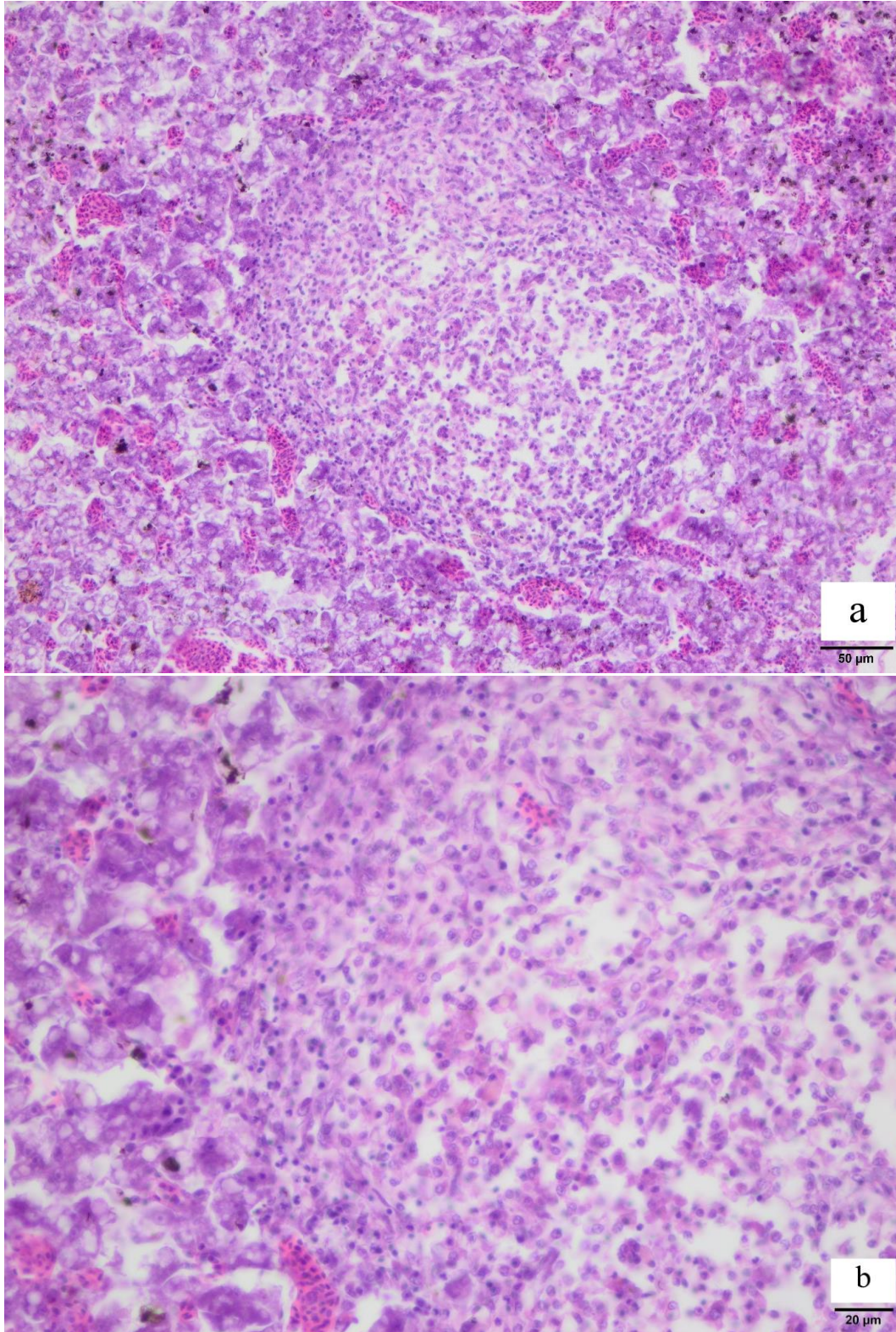
**KC:** Karaciğer, **Dl:** Dalak, **Bb:** Böbrek, **Kl:** Kalp, **Dr:** Deri, **Sol:** Solungaç, **Bey:** Beyin, **Gon:** Gonad. **I:** I. evre granülomlar, **II:** II. evre granülomlar, **III:** III. evre granülomlar, **IV:** IV. evre granülomlar, **V:** V. evre granülomlar. **H:** Hafif şiddette granülom yoğunluğu, **O:** Orta düzeyde granülom yoğunluğu, **§:** Şiddetli granülom yoğunluğu.

Karaciğerde tüm olgularda yağlanma tespit edildi. Yağlanmanın şiddeti, hepatositlerde az miktarda görülecek şekilde olanlar hafif (3 Olgu, tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 5, 8, 10), bazılarında hepatositlerin neredeyse tamamını kapsayacak şekilde olanlar ise şiddetli olarak tanımlandı (19 Olgu, tüm olguların %86,3'ü, olgu no; 1-4, 6, 7, 9, 11-22). Olguların bazılarında damarların genişlemiş ve hiperemik olduğu dikkati çekti (3 Olgu, tüm olguların %13,6'sı, olgu no: 8, 9, 13). Damarların çevresinde gevşek yapıda makrofaj infiltrasyonlarının yer aldığı gözlemlendi. Bu makrofajların bazılarında çekirdeklerin karyoreksise uğrayarak nekroze olduğu göze çarptı.

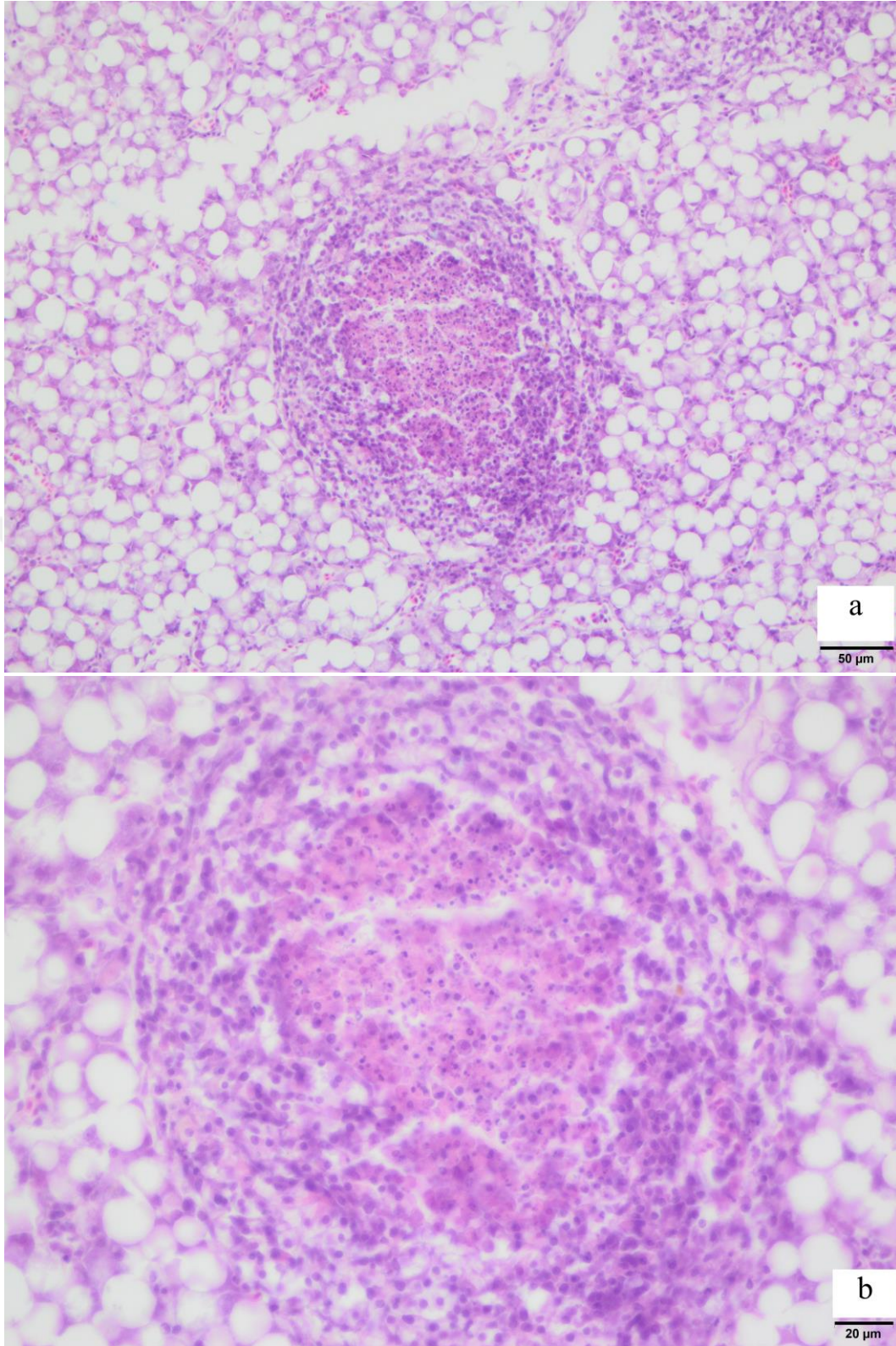
Karaciğerde ağırlıklı olarak 16 olgu (Tüm olguların %72,7'si, olgu no; 1, 4, 6, 7, 9, 10, 12-16, 18-22)'da I. ve II. evre granülomlar gözlenirken (Resim 10 a ve b), 11 olguda (Tüm

olguların %50'si, olgu no; 1, 3, 4, 6, 13-16, 18, 19, 21) da III. evre granülomlar dikkati çekti (Resim 11 a ve b). Ortasında kazeifiye nekroz alanının şekillenmiş olduğu IV. evre granülomlar 8 olgunun karaciğerinde saptandı (Tüm olguların %36,3'ü, olgu no; 3, 4, 6, 13, 15, 16, 18, 19).

Bu granülomların sayısı ve dağılımları ise granülomların şiddetine göre olgularda farklılık göstermekteydi. İki olguda (Tüm olguların %9'u, olgu no; 1, 21) I. ve II. evredeki granülomlar çok yoğun olarak görülürken, III. evredeki granülomlar az miktardaydı, bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 18), I. ve II. evredeki granülomlar çok yoğun, III. ve IV. evre granülomlar orta düzeydeydi, bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 3) III. ve IV. evre granülomlar şiddetliydi, bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 4) I. ve II. evre granülomlar şiddetli, III. ve IV. evre granülomlar ise hafif düzeydeydi, bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 6) I. ve II. evre granülomlar şiddetli, III. evre granülomlar orta, IV. evre granülomlar ise hafif düzeydeydi, üç olguda (Tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 7, 10, 12) I. ve II. evre granülomlar hafif düzeydeydi, iki olguda (Tüm olguların %9'u, olgu no; 9, 20) I. ve II. evre granülomlar hafif düzeydeydi, beş olguda (Tüm olguların %22,7'si, olgu no; 12-16) I., II. ve III. evre granülomlar şiddetli, IV. evre granülomlar ise orta düzeydeydi, bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 17) IV. evre granülomlar şiddetliydi, bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 19) I., II., III. ve IV. evre granülomlar şiddetli ve bir olguda ise (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 21) I. ve II. evre granülomlar şiddetli, IV. evre granülomlar ise hafif düzeyde tespit edildi. Bazı olgularda (2 Olgu, tüm olguların %9'u, olgu no; 4, 17) birkaç granülomun tek bağ doku çatısı altında birleşerek bileşik (konglomere) granülom yapısını aldığı görüldü. 12 olgunun (Tüm olguların %54,5'i, olgu no; 1, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 17, 18, 20-22) karaciğerinde makroskopik olarak granülom görünmezken histopatolojisinde farklı evrelerdeki granülomlar tespit edildi.



**Resim 10.** (a) ve (b) Makrofajlar arasında tek tük lenfositleri de içeren II. Evre granülom. Karaciğer, olgu no: 18, HE.



**Resim 11.** (a) ve (b) Granülomun merkezindeki makrofajların nekroze olmaya başladığı III. evre granülom. Karaciğer, olgu no: 6, HE.

Dalaktaki granülomlar karaciğerde tanımlananlara benzer şekilde 5 evrede izlendi. Ortada nekroz alanı bulunmayan, dejenere makrofajlarda bakteri içeren ve belirgin bir bağdoku kapsülü henüz şekillenmemiş I. ve II. evre granülomlara on olguda (Tüm olguların %45,4'ü, olgu no; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 15, 21, 22) rastlandı ve yoğunlukları ise 1 olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 8) hafif, 3 olguda (Tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 10, 11, 22) orta düzeyde, 6 olguda (Tüm olguların %27,2'si, olgu no; 1, 2, 4, 6, 15, 21) ise şiddetli olarak tespit edildi. Yine aynı vakalarda makrofajların yalnızca bir silüet halinde seçilebildiği ve nekrotik bir hal aldığı ve belli belirsiz fibröz kapsülünün şeillendiği görüldü. Nekrotik makrofaj yaygınlığı daha geniş ve belirgin olan ve etrafındaki epiteloid makrofaj katmanının daha sıkı ve kompakt halde olduğu, bağ doku kapsülünün nispeten daha belirgin olduğu III. evre granülomlar ise 12 olguda (Tüm olguların %54,5'i, olgu no; 1, 2, 5-7, 11, 12, 14-16, 19, 21) görüldü ve yoğunlukları ise 4 olguda (Tüm olguların %18'i, olgu no; 1, 5, 6, 21) hafif, 3 olguda (Tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 2, 12, 19) orta düzeyde, 5 olguda (Tüm olguların %22,7'si, olgu no; 7, 11, 14-16) da şiddetli olarak tespit edildi. Merkezinde kazeifiye nekroz alanını içeren IV. evre granülomlar 14 olguda (Tüm olguların %63,6'sı, olgu no; 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 14-20) dikkati çekti ve bu granülomların yoğunlukları ise 6 olguda (Tüm olguların %27,2'si, olgu no; 1, 2, 5, 9, 18, 20) hafif ve 7 olguda (Tüm olguların %31,8'i, olgu no; 3, 7, 12, 14, 16, 17, 19) da şiddetli ve 1 olguda da (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 15) orta düzey olarak tespit edildi. 8 olguda (Tüm olguların %36,3'ü, olgu no; 3, 7, 13, 14, 16-19) granülomun sklerotik bir görünüm aldığı V. evre granülomlar tespit edildi ve bu granülomların yoğunlukları da 2 olguda (Tüm olguların %9'u, olgu no; 13, 18) hafif ve 6 olguda (Tüm olguların %27,2'si, olgu no; 3, 7, 14, 16, 17, 19) da şiddetli olarak tespit edildi. Bazı olgularda konglomere granülom yapıları göze çarptı (2 Olgu, tüm olguların %9'u, olgu no; 17, 19) (Resim 12).



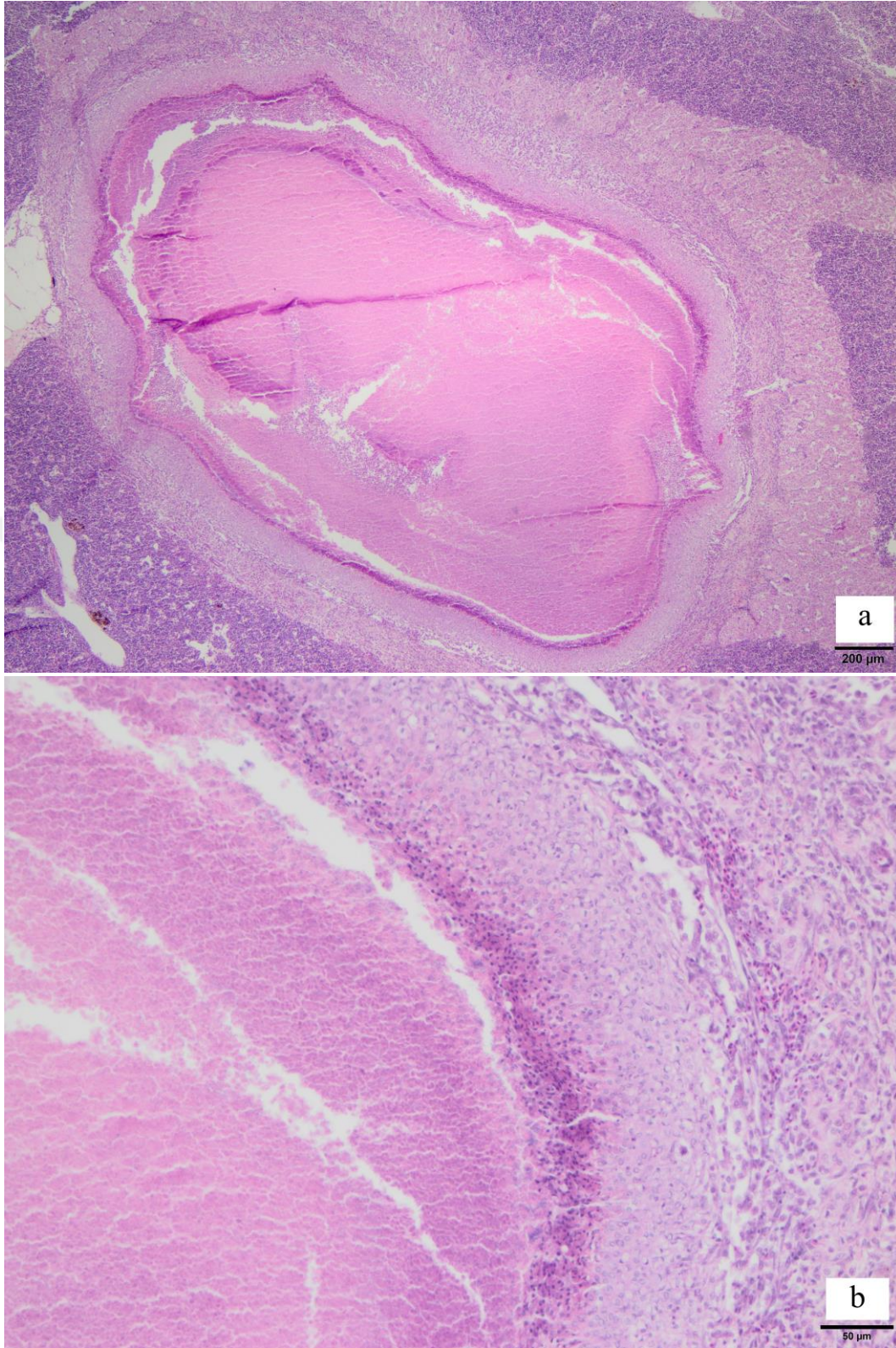
**Resim 12.** IV. evre granülomları içeren konglomere granülom yapısı. Dalak, olgu no: 17, HE.

Böbrek dokularında; kranial böbrekte I. ve II. evre granülomlar 10 olguda (Tüm olguların %45,4'ü, olgu no;1, 2, 4-6, 8, 9, 18, 20, 21) görüldü ve bu granülomların yoğunlukları 3 olguda (tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 5, 6, 8) hafif, 2 olguda (tüm olguların %9'u, olgu no; 9, 20) orta, 5 olguda (tüm olguların %22,7'si, olgu no; 1, 2, 4, 18, 21) şiddetli düzeyde idi. III. evre granülomlar 15 olguda (tüm olguların %68,1'i, olgu no; 1-5, 7, 9, 12, 13, 15-20) görülürken, bunların yoğunlukları 1 olguda (tüm olguların %4,5'i, olgu no; 5) hafif, 4 olguda (tüm olguların %18'i, olgu no; 1, 12, 13, 18) orta, 10 olguda (tüm olguların %45,4'ü, olgu no; 2-4, 7, 9, 15-17, 19, 20) ise şiddetli olarak değerlendirildi. IV. evre granülomlar 14 olguda (tüm olguların %63,6'sı, olgu no; 1-3, 5, 7, 9, 13, 15-20, 22) göze çarparken bu granülomlarda ise yoğunlukları 1 olguda (tüm olguların %4,5'i, olgu no; 5) hafif, 4 olguda (tüm olguların %18'i, olgu no; 1, 2, 13, 18) orta, 9 olguda (tüm olguların %40,9'u, olgu no; 3, 7, 9, 15-17, 19, 20, 22) ise şiddetli olarak tespit edildi. Granülomların sikatrize dokuya dönüşmekte/dönüştüğü V. evre granülomların 7 olguda (tüm olguların %31,8'i, olgu no; 7, 9, 10, 14, 16, 19, 20) gözlemlendiği kaydedildi ve bu olgulardaki yoğunluğun da 1 olguda (tüm olguların %4,5'i, olgu no; 7) orta düzeyde, geri kalan 6 olguda

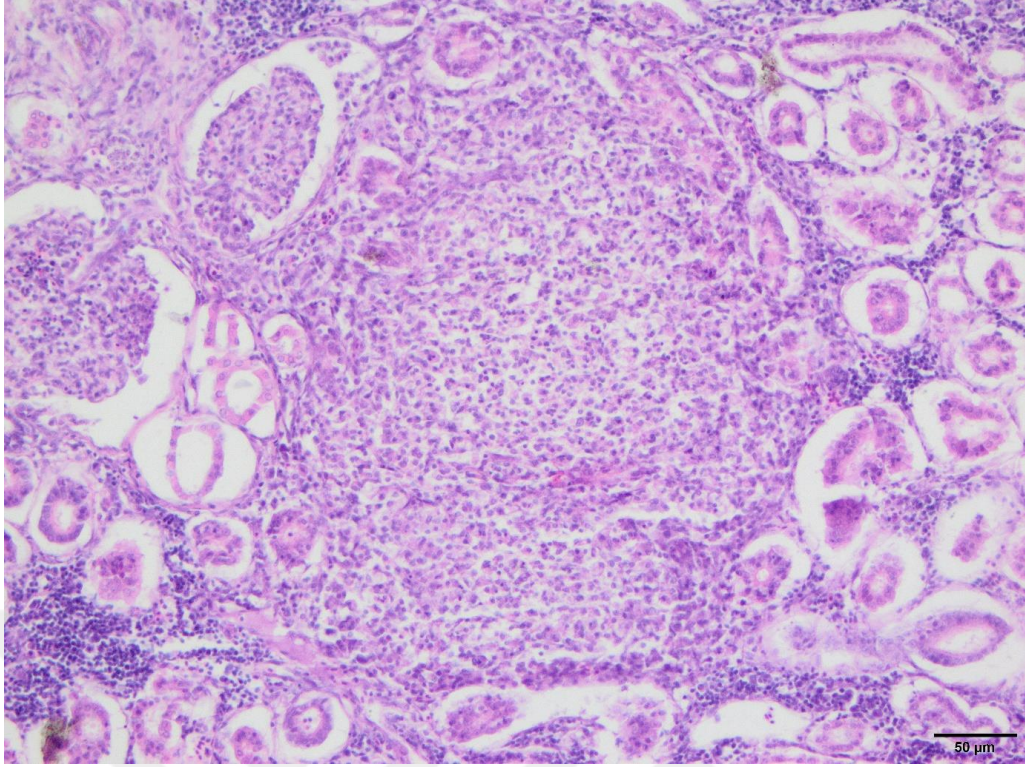
(tüm olguların %27,2'si, olgu no; 9, 10, 14, 16, 19, 20) ise şiddetli düzeyde olduğu tespit edildi. Bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 13) ise geniş kazeifiye nekroz alanı içeren tek bir granülomun kesit alanının yaklaşık üçte ikisini istila ettiği dikkati çekti (Resim 13 a ve b). Bazı olgularda (2 Olgu, tüm olguların %9'u, olgu no; 9, 19) bu granülomların birleşerek konglomere granülom oluşturdukları tespit edildi.

Kaudal böbrekte granülomların görülme sıklığı kraniale göre daha az idi. I. ve II. evre granülomlara 10 olguda (Tüm olguların %45,4'ü, olgu no; 1, 2, 4, 6, 10, 13, 15, 18, 21, 22) rastlanıldı ve bu granülomların yoğunlukları 3 olguda (Tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 4, 6, 13) hafif ve 7 olguda (Tüm olguların %31,8'i, olgu no; 1, 2, 10, 15, 18, 21, 22) orta düzeyde olduğu dikkati çekti. III. evre granülomlar 10 olguda (Tüm olguların %45,4'ü, olgu no; 3, 5, 7, 9, 10, 14-16, 19, 20) dikkati çekerken bu granülomların ise yoğunlukları 1 olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 16) hafif, 6 olguda (Tüm olguların %27,2'si, olgu no; 3, 7, 9, 10, 19, 20) orta düzeyde ve 2 olguda (Tüm olguların %9'u, olgu no; 5, 15) şiddetliydi. IV. evre granülomlar 10 olguda (Tüm olguların %45,4'ü, olgu no; 3, 5, 7, 9, 10, 14-16, 19, 20) görülürken, dağılım ve yoğunlukları 2 olguda (Tüm olguların %9'u, olgu no; 14, 16) hafif, 6 olguda (Tüm olguların %27,2'si, olgu no; 3, 7, 9, 10, 19, 20) orta düzeyde ve 2 olguda da (Tüm olguların %9'u olgu no; 5, 15) şiddetli olarak değerlendirildi. V. evre granülom ise 4 olguda (Tüm olguların %18'i, olgu no; 9, 14, 16, 20) tespit edildi ve 2 olguda (Tüm olguların %9'u, olgu no; 14, 16) hafif düzeydeyken, 2 olguda (Tüm olguların %9'u, olgu no; 9, 20) ise orta olarak değerlendirildi.

Kaudal böbrekte bir olguda kistik papiller tubuler hiperplazi gözlemlendi (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 8). Dört olguda (Tüm olguların %18'i, olgu no; 6, 10, 17, 18) aralarında makrofajların da yer aldığı şiddetli lenfosit infiltrasyonları ile karakterize fokal dissemine interstisyel nefritis tanımlandı. Bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 6) ise, bu infiltrasyonlara fibröz doku proliferasyonu eşlik etmiş olduğu ve bu sahalarda tubulus yapılarının seçilemediği gözlemlendi. Buna bitişik bir alanda da kazeifiye alanı olmayan II. evre büyük bir granülom göze çarptı (Resim 14).



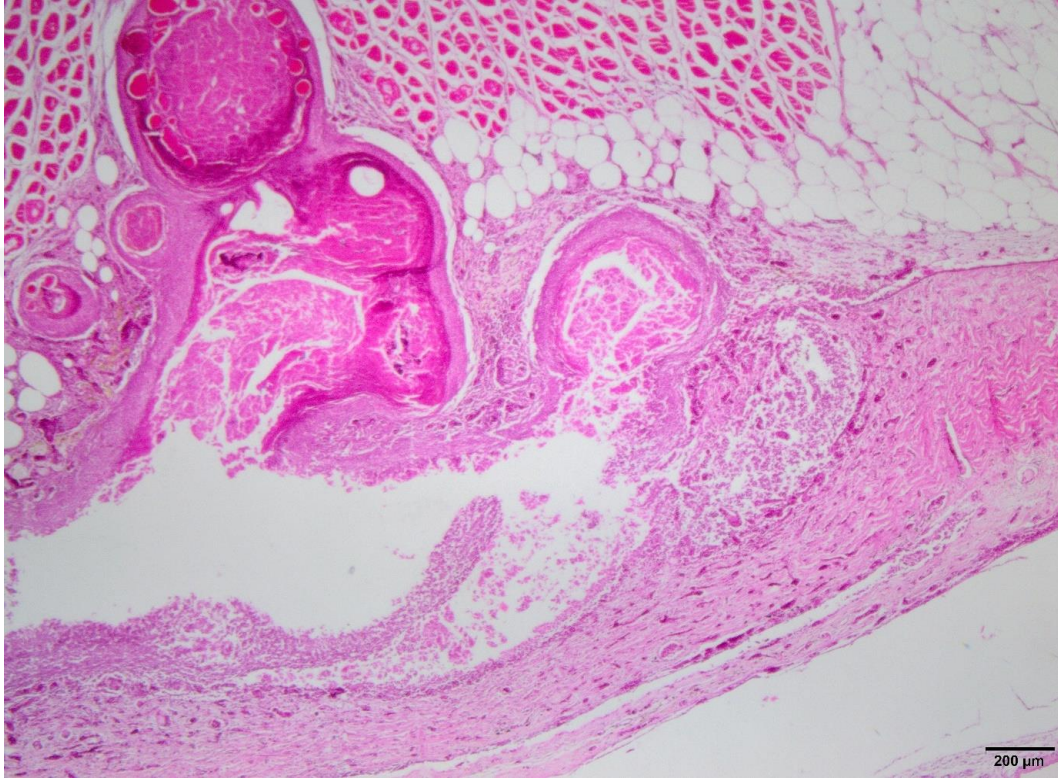
**Resim 13.** (a) ve (b) Ortada kazeifiye nekroz odağını çevreleyen sağlam makrofaj hattı ve en dışta bağdoku kapsülü. IV. evre granülom. Kranial böbrek, olgu no: 13, HE.



**Resim 14.** Nonpurulent interstisyel nefritis ve II. evre granülom morfolojisi. Kaudal böbrek, olgu no: 6, HE.

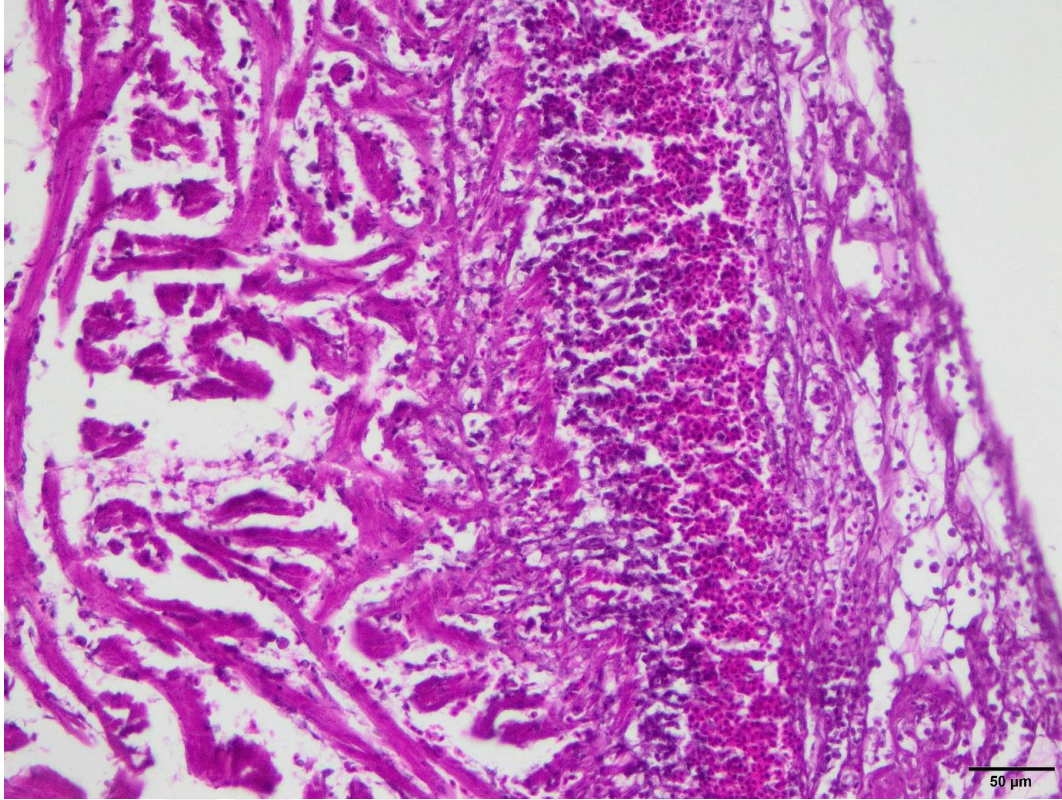
Deride; epitel ile kas katmanı arasında ve genellikle de yüzeye açılarak ülserleşmelere neden olan IV. evre granülomlar dikkati çekti. Bu granülomların, merkezi kısımları geniş kazeifiye nekroz alanları ve bunu çevreleyen makrofajlar ve tek tük lenfositlerden oluşan mononükleer hücrelerden oluşan yangısal bir katman ve en dıştan da fibröz doku ile kuşatılmış olduğu gözlemlendi (9 Olgu, tüm olguların %40,9'u, olgu no; 1-3, 6, 14-17, 19). Bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 19) kazeifiye nekroz alanlarında öbek öbek bazofilik renkte bakteri kümeleri belirlendi. Gram boyamada ise H&E boyamada görülmeyen olgular da dahil olmak üzere Gram negatif çubuk tarzda bakteri kümeleri belirlendi. Bir olguda (Olguların no; 6) ise irili-ufaklı granülomların kas katmanını da kaplayacak şekilde yayıldığı göze çarptı. Yüzeye yakın alanlardaki dışarı açılan bazı granülomlarda nekrotik içeriğin boşalmış ya da boşalmakta olduğu görüldü (3 Olguların no; 6, 17, 18). Yine bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 19), bir sahada irili-ufaklı granülomların birbirine bitişik şekilde dizilim gösterdiği, kazeifiye nekroz alanlarının diğerlerine göre çok daha geniş olduğu, yangısal makrofaj katmanının neredeyse ortadan kalkarak direkt olarak bağ dokusuyla kapsüllenmiş olduğu göze çarptı. Aynı granülomlarda, kapsülaya yakın alanlarda, ayrı ayrı, yuvarlak inci tanesi şeklinde, birbirinden bağımsız, kazeifiye nekroz alanları da mevcuttu. İki

olguda deriden bağımsız şekilde kas katmanı içerisinde geniş kazeifiye nekroz alanlarını direkt olarak çevreleyen iki adet granülom dikkati çekti. Bunun dışında mevcut granülomlara yakın bir alanda, henüz kazeifiye nekroz alanının yeni şekillenmeye başladığı bir granülom daha gözlemlendi. Ayrıca mevcut alanda yağ katmanı içerisinde benzer bir granülom yapısı daha belirlendi (3 Olgu, tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 6, 14, 19) (Resim 15).



**Resim 15.** Küçük, büyüklü ve birbirine neredeyse bitişik şekilde şekillenmiş IV. evre granülomlar. Deri, olgu no:19, HE.

Kalp dokusunda; 8 olgunun (Tüm olguların %36,3'ü, olgu no; 4-6, 8, 13, 14, 18, 19) perikardında mononükleer hücre reaksiyonlarından oluşan perikarditis tanımlandı. Perikart yüzeyi fibrinli eksudat aralarında lenfosit, plazma hücresi, makrofaj ve heterofillerden oluşan yangısal reaksiyonlar ile genişlediği tespit edildi. Bazı olgularda (6 Olgu, tüm olguların %27,2'si, olgu no; 4, 6, 13, 14, 18, 19) yangısal reaksiyonun kas katmanı derinliklerine doğru yayılım gösterdiği dikkati çekti. Buradaki yangısal hücrelerin çoğunluğu makrofaj ağırlıklıydı (Resim 16).

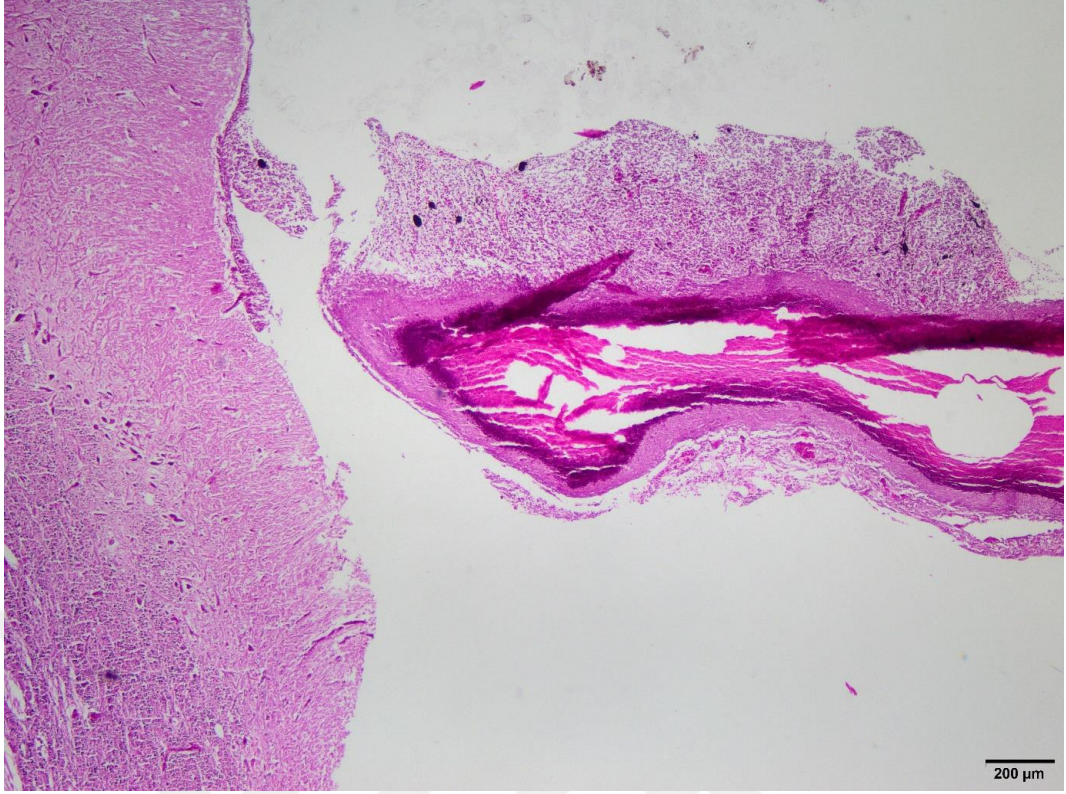


**Resim 16.** Lenfosit, makrofaj hücre infiltrasyonları ile karakterize fibrinli perikarditis. Kalp, olgu no: 13, HE.

3 olguda ise kalp periferinde şekillenmiş III. evre granülom görüldü (Tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 5, 8, 18).

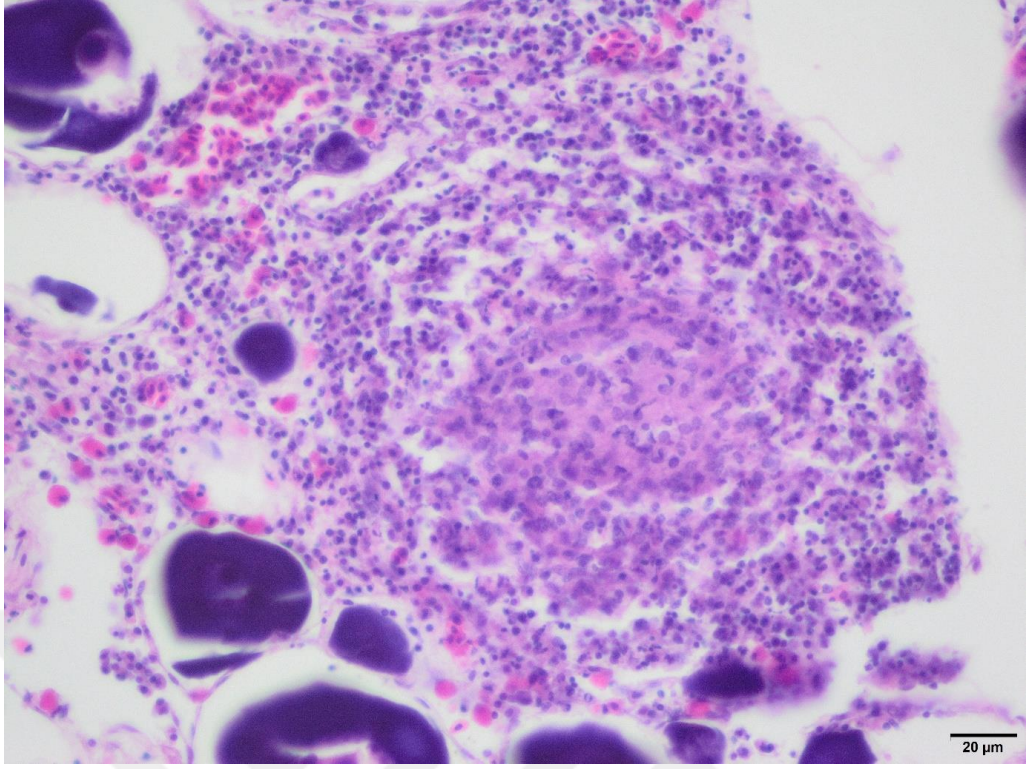
Solungaçlarda; olguların bazılarında az sayıda parazit kesitleri görüldü (5 Olgu, tüm olguların %22,7'si, olgu no; 8, 10, 13, 14, 17). Bu parazitler morfolojik olarak *Diplectanum aequans*'a benzer morfolojik özellikler göstermekteydi. Primer lamellerin tam merkezinde, merkezi kısımda kazeifiye nekroz alanları ve çevresinde makrofajlarca kuşatılmış ve bağ doku ile kapsüllenmiş IV. evre granülom mevcuttu (1 olgu, tüm olguların %4,5'i, olgu no; 19). Solungaç arkının üzerinde, daha küçük çaplı, yeni şekillenmekte olan, kazeifiye nekroz alanlarının yer almadığı, sadece sellüeritinin bulunduğu II. evre granüomlara yakın bir sahada da IV. evre granüloma da rastlandı (1 Olgu, tüm olguların %4,5'i, olgu no; 19). Ayrıca solungaç arkında eozinofilik granüler hücre proliferasyonu dikkati çekti.

Beyinde; bir olguda meninkste ortasında kazeifiye nekroz alanı bulunan, hemen etrafında birbirleriyle oldukça sıkı kompakt halde olan kalın bir kuşak halinde epitelioid makrofajlar ile çevreli ve en dıştan fibröz dokuyla iyi kapsüllenmiş IV. evre bir granülom tanımlandı (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 14) (Resim 17).

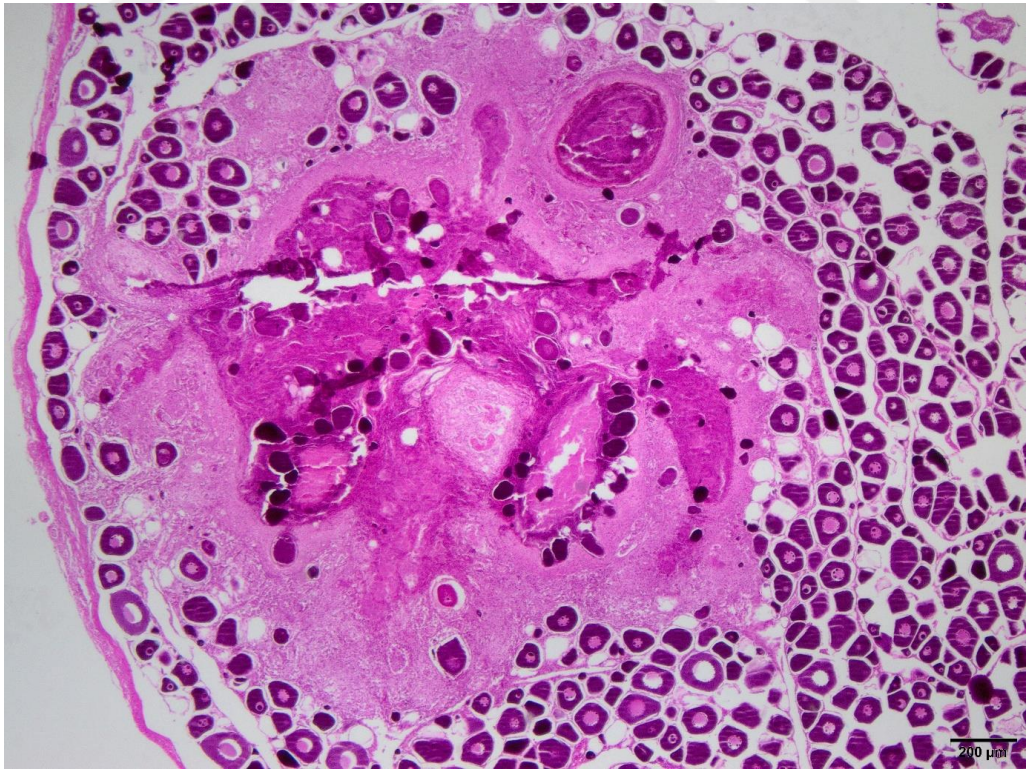


**Resim 17.** Meninkste şekillenen IV. evre granülom. Beyin, olgu no: 14. HE.

Gonad dokularında; bir olguda (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 5) yeni şekillenmekte olan ve ortada kazeifiye nekroz alanı bulunmayan ve bağdoku kapsülünün yeni şekillenmekte olduğu III. evre granülom gözlemlendi (Resim 18). Başka bir olguda (2 Olgu, tüm olguların %9'u, olgu no; 14, 19) ise ortasında kazeifiye nekroz alanı bulunan IV. evre granülom tanımlandı (Resim 19). Tanımlanan granülomların merkezi kısımlarında nekrotik sahalarda ve makrofaj sitoplazmalarında (H&E ve Gram boyamalarda) bakteri içerdiği gözlemlendi.



**Resim 18.** III. Evre granülom. Gonad, olgu no: 5, dişi, HE.



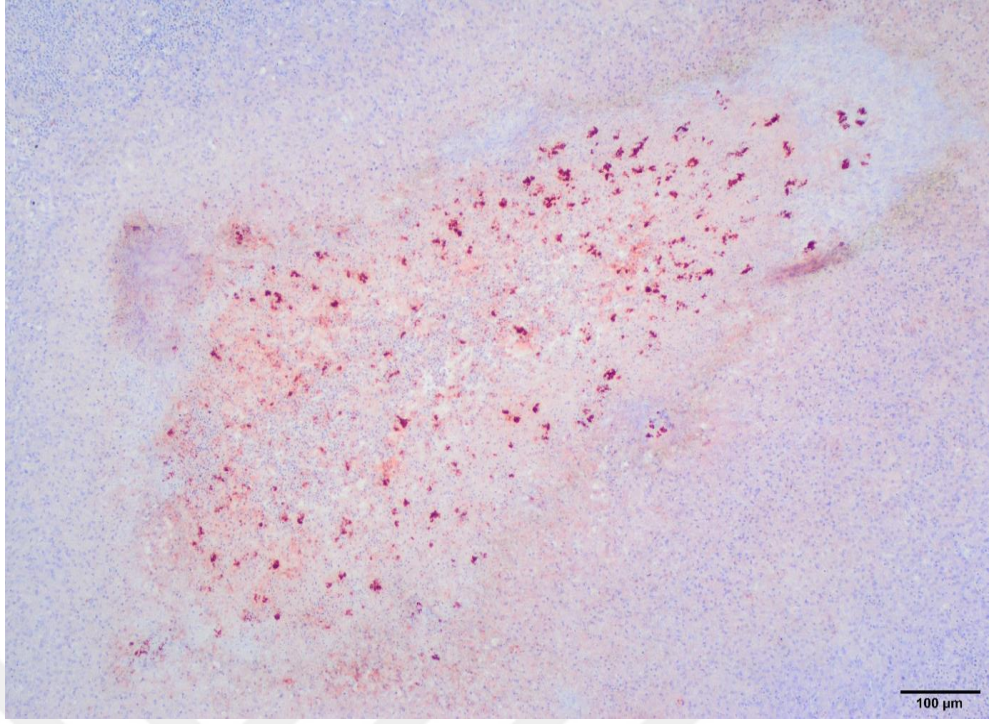
**Resim 19.** Kazeifiye nekroz alanı içeren IV. Evre granümler. Gonad, olgu no: 19, dişi, HE.

Midede bazı olgularda *Sphaerosphora dicentrarchi* olduğu düşünölen parazit kesitleri göröldü (5 Olgu, tüm olguların %22,7'si, olgu no; 6, 8, 10, 18, 19). Bir olgunun barsak kesitlerinde, villus yapılarının yer yer kütleştiği, lamina propriyada lenfosit plazma hücrelerinden ve aralarda makrofajlardan oluşın yangısal reaksiyonlar gözlendi. Bu hücreler arasında da eozinofilik granöler hücrelerin yer aldığı görünmektydi (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 19).

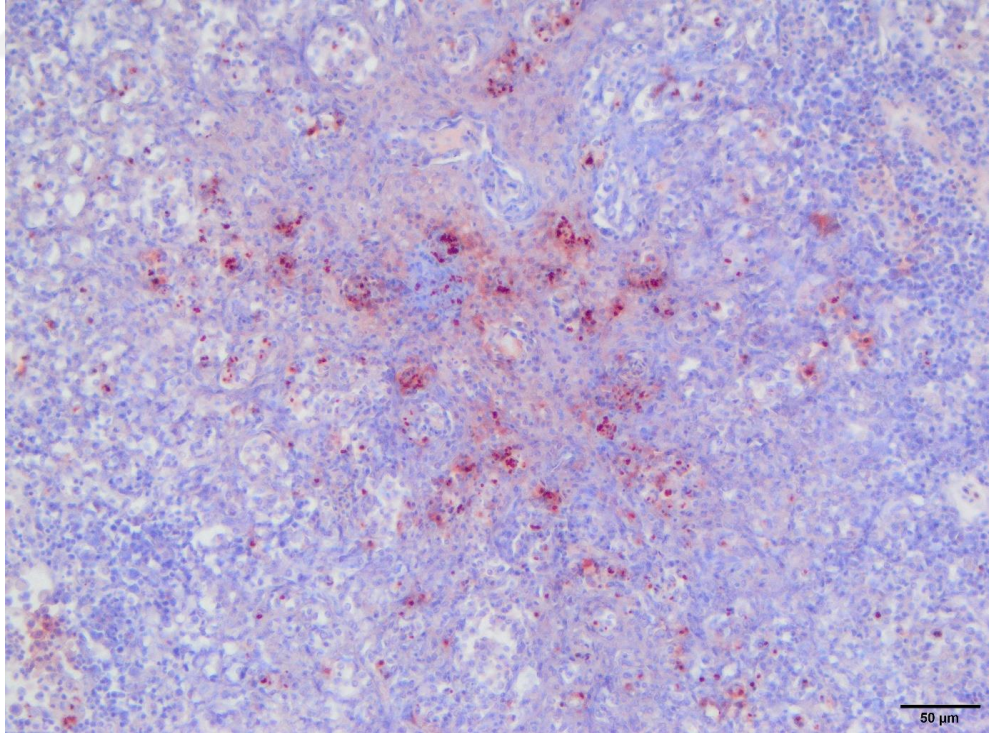
Tüm dokuların Ziehl-Neelsen boyamalarında aside dirençli bakteri tespit edilmedi.

#### 4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

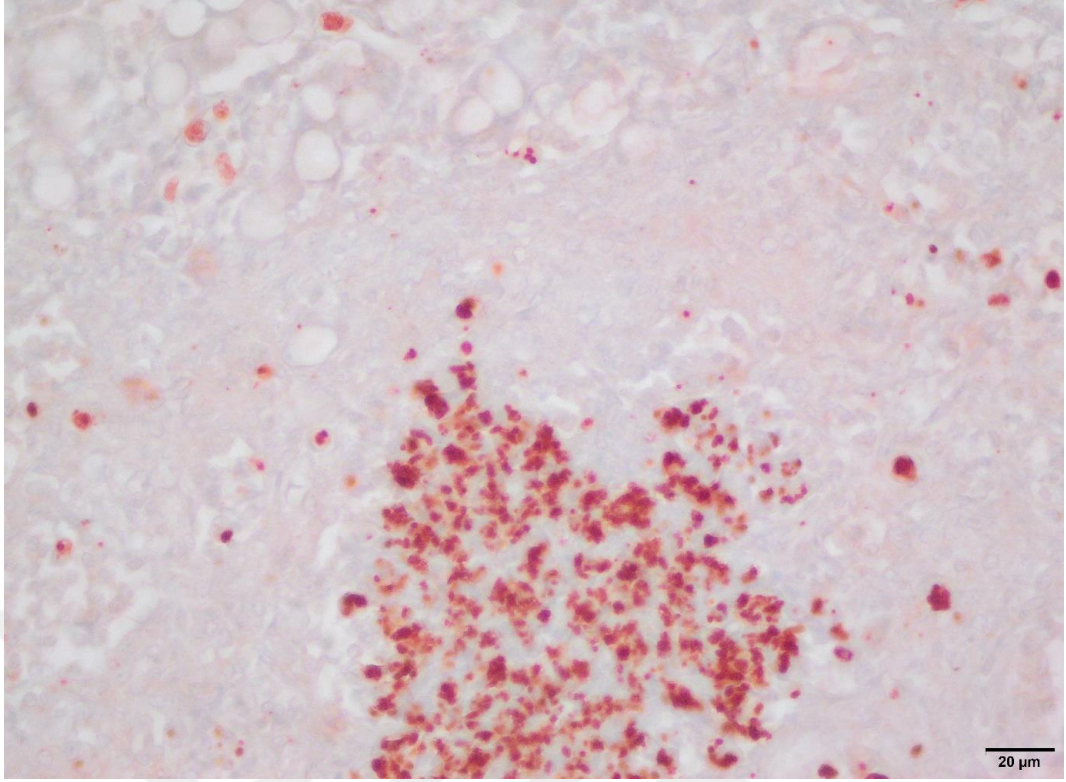
*Aeromonas veronii* antijen pozitif reaksiyonların lokalizasyonu ve şiddeti; granölomların en sıklıkla şekillenmiş olduğu organlar olan dalak (22 Olgu, tüm olguların %100'ü, olgu no; 1-22) (Resim 20), böbrek (22 Olgu, tüm olguların %100'ü, olgu no; 1-22) (Resim 21), karaciğer (18 Olgu, tüm olguların %81,8'i, olgu no; 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12-22) (Resim 22) ve deri (9 Olgu, tüm olguların %40,9'u, olgu no; 1-3, 6, 14-17, 19) iken, daha ender olarak da rastlandığı gonadlar (3 Olgu, tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 5, 16, 19), solungaç (3 Olgu, tüm olguların %13,6'sı, olgu no; 5, 16, 19) (Resim 23 a ve b), beyin (1 Olgu, tüm olguların %4,5'i, olgu no; 14) idi. Bakteriyel antijen pozitif reaksiyonların yoğunluğu ve boyanma şiddetleri de granölomların semikantitatif olarak değeriendirilen evrelerine göre farklılık göstermişti. Buna göre; en şiddetli immunpozitif reaksiyonlar belirgin bir kazeifikasyon nekrozu alanı ve bunu çevreleyen epitelooid makrofaj reaksiyonunun daha sıkı ve kompakt katman halinde dizilim gösterdiği ve bağ doku kapsölünün yeni şekillenmiş olduğu IV. evre granölomlarda lokalizasyon göstermişti. Buradaki reaksiyonlar kazeifiye nekroz alanında öbek öbek serbest halde gözlenirken, nekroz alanının çevreleyen makrofajların ise sitoplazmalarında tanımlandı. Yeni şekillenmekte olan ve ortada nekroz alanı bulunmayan bağdoku kapsölünün net bir şekilde oluşmadığı I. ve II. evre granölomlarda ise immunreaksiyonlar tek tük makrofaj sitoplazmalarında hafif şiddette gözlendi. Kazeifiye nekroz alanının henüz şekillenmediği, III. evre granölomlarda özellikle nekrotik makrofaj sitoplazmalarında orta şiddetten şiddetliye kadar değışen antijen pozitif reaksiyonlar gözlendi. Kazeifiye nekrotik alanların bağ doku ile doldurulmaya başlandığı ya da tamamen doldurulmuş granölomlarda ise immun reaksiyonlar yok denecek kadar azdı.



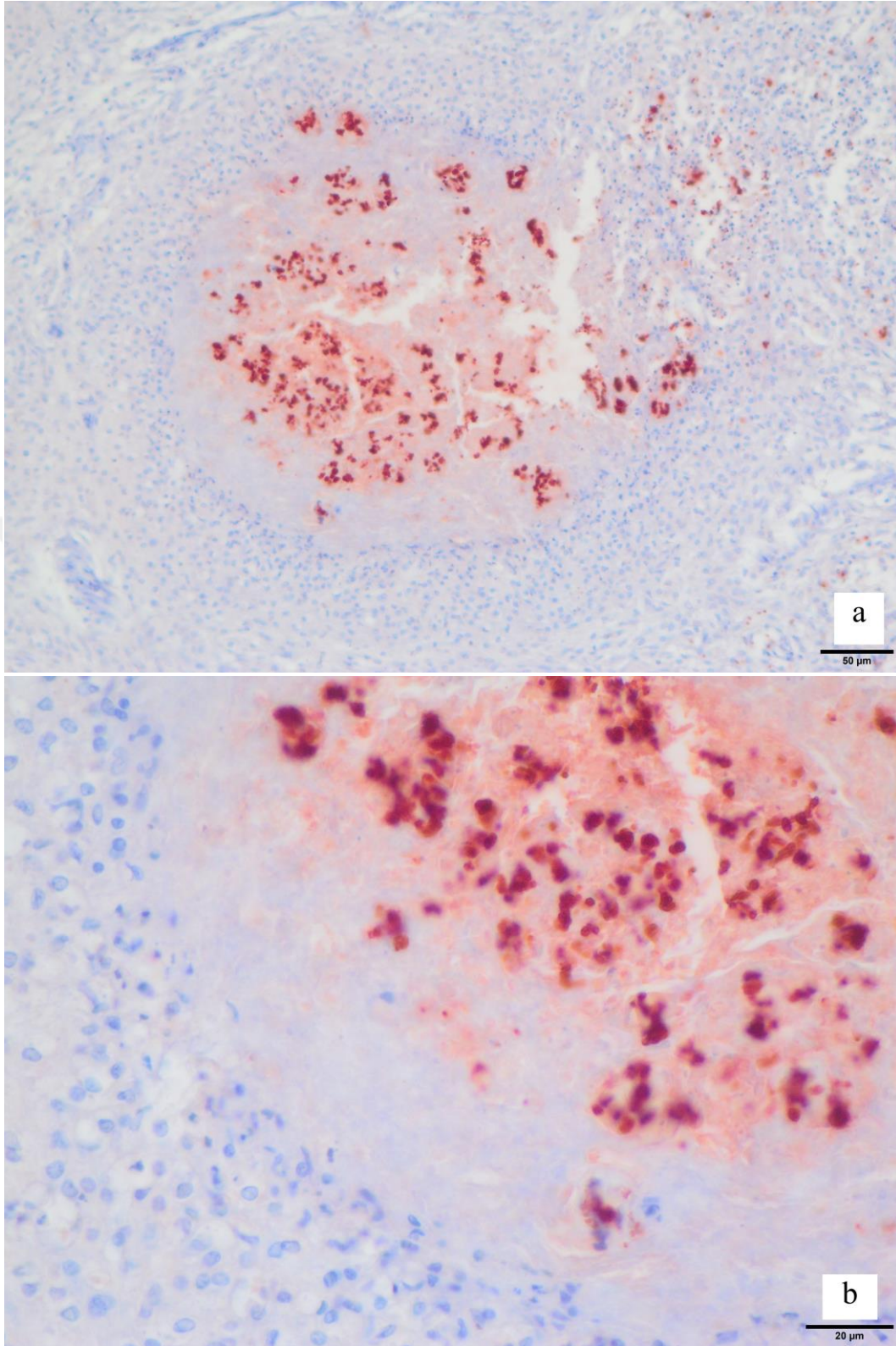
**Resim 20.** Bir granülomda çoğunluğu makrofaj sitoplazmalarında ve daha nadir olarak da nekrotik içerikte immunpozitif reaksiyonlar. Dalak, olgu no: 13, LSAB.



**Resim 21.** Yeni şekillenmekte olan granülomlarda ve infiltrate makrofajların sitoplazmalarında immunpozitif reaksiyonlar. Kranial böbrek, olgu no: 9. LSAB.

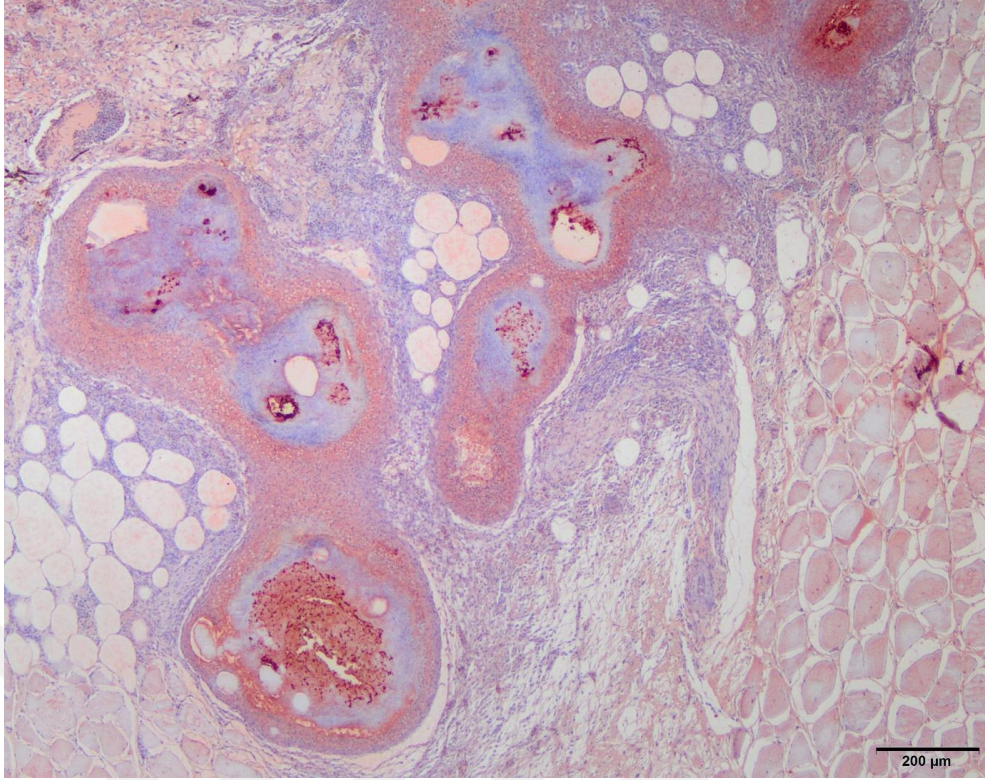


**Resim 22.** Bir granülomun merkezinde makrofajlarda ve nekrotik içerikte serbest halde bakteriyel antijen pozitif reaksiyonlar ile granülom çevresinde tek tük makrofajlardaki immunopozitiflik. Karaciğer, olgu no: 18, LSAB.

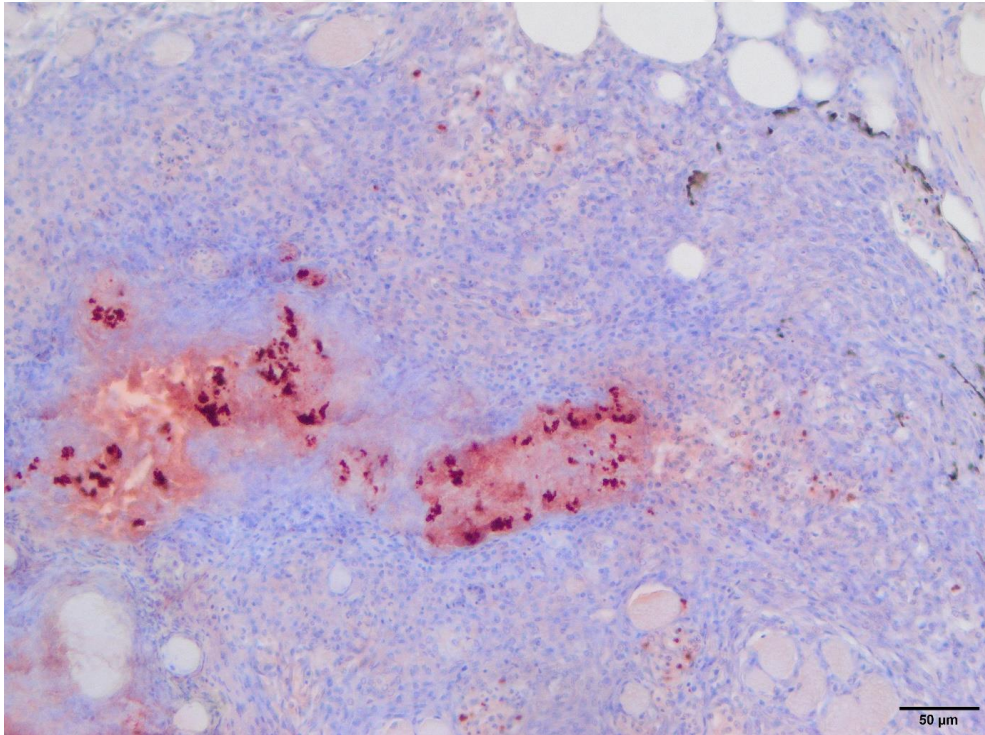


**Resim 23.** (a) ve (b) Bir granülomda makrofajlarda ve nekrotik içerikte immun pozitif reaksiyonlar. Solungaç, olgu no: 19., LSAB.

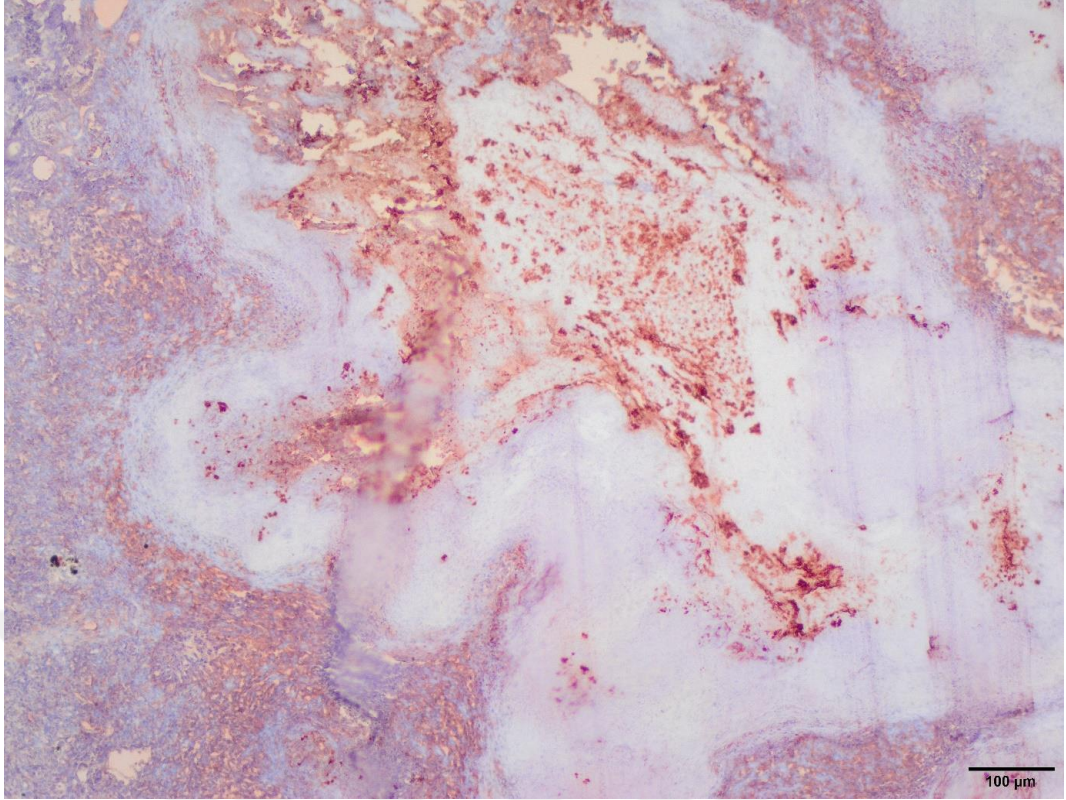
*Aeromonas veronii* pozitif reaksiyonlar yukarıda vurgulandığı gibi, iç organlarda şekillenen granülomlar içerisinde sınırlı kalırken, deride, böbreklerde ve kalpte ise lokalizasyonları kısmen de olsa farklılık göstermişti. Deride, çoğunluğu IV. evre granülom olarak tanımlanan kesitlerde (9 Olgu, tüm olguların %40,9'u, olgu no;1-3, 6, 14-17, 19), bakteriyel antijen pozitif reaksiyonlar kazeifiye nekroz alanlarında ve makrofajlarda kaydedildi. Bunun yanında fibröz kapsülün duvarında ve dışında perifere doğru infiltrate olan makrofajlarda güçlü pozitif reaksiyonlar gözlemlendi (Resim 24). Ülserli bölgelerde de serbest ya da makrofajlarda şiddetli pozitif reaksiyonlar tanımlandı (1 Olgu, tüm olguların %4,5'i, olgu no; 6). Ayrıca kas lifleri arasında infiltrate makrofajlarda da pozitif reaksiyonlara rastlandı (1 Olgu, tüm olguların %4,5'i, olgu no; 14) (Resim 25). Kaudal böbrekte granülomlar dışında, interstisyel nefritisin de tanımlandığı olgularda (2 Olgu, tüm olguların %9'u, olgu no; 6, 18) (Resim 26) lenfositler arasında yer alan tek tük makrofaj sitoplazmalarında pozitif reaksiyonlar not edildi. Kalpte perikarditis saptanan olgularda, infiltrate hücreler arasında serpilmiş halde yer alan makrofajlarda belirgin antijen pozitif reaksiyonlar gözlemlendi (6 Olgu, tüm olguların %27,2'si, olgu no; 4, 6, 13, 14, 18, 19). Bir olgunun perikardında (Tüm olguların %4,5'i, olgu no; 18) gözlenen granülomda da kapsüle altındaki makrofajlarda pozitif reaksiyonlar kaydedildi. Karaciğerde granülom lokalizasyonları yanında, bazı olgularda (5 Olgu, tüm olguların %22,7'si, olgu no; 6, 7, 14, 18, 19) Kupffer hücre sitoplazmalarında antijen pozitif reaksiyonlar gözlemlendi.



**Resim 24.** Konglemere granümlardaki immunpozitif reaksiyonlar. Deri, olgu no: 19, LSAB.



**Resim 25.** Kas katmanındaki granümlardaki immunpozitif reaksiyonlar. Kas, olgu no: 14, LSAB.



**Resim 26.** V. Evre granülomdaki immunpozitif reaksiyonlar. Kaudal böbrek, olgu no: 6, LSAB.

## 5. TARTIŞMA

Türkiye’de akuakültür üretiminin giderek artışı ve bu durumla doğru orantılı şekilde, kültür balıklarında görülen önemli hastalıklar ile daha sık karşılaşma ihtimali doğmuştur. Artan stok yoğunluğuyla beraber küresel ısınma ve iklim değişikliklerinin de etkisiyle kültür balıklarında hastalık etkeni patojenlerin sayısı sürekli artış göstermektedir (Smyrli ve diğerleri, 2017; Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021).

Gram negatif, çubuk şeklinde ve mezofilik bir bakteri olan *Aeromonas veronii* levreklerde ilk olarak 2008 yılında Yunanistan’da izole edilmiştir ve gün geçtikçe akuakültür endüstrisi için giderek önemli bir hale gelmiştir (Smyrli ve diğerleri, 2017). Ülkemizde ise 2010 yılında Karadeniz’de (Uzun ve Oğut, 2015), 2017 yılında ise Ege Deniz’inde (Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021) bildirim yapılmıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalara göre Uzun ve Oğut (2015) tarafından izole edilen tüm suşlar hareketli olup, pigment oluşumu hakkında bilgi verilmemiştir. Dinçtürk ve Tanrıkul (2021)’un yapmış olduğu çalışmada ise izolatların hareketli ve TSA’da pigment oluşturduğu belirtilmiştir. Yunanistan’da Smyrli ve diğerleri. (2019) ise elde ettikleri suşları hareketsiz ve pigment oluşturmayan suşlar (Batı Ege Denizi), hareketli ve pigment oluşturan suşlar (Batı Ege Denizi) ve hareketli ve az pigment oluşturan suşlar (Doğu Ege Denizi) olmak üzere üç grupta incelemiştir. Bu çalışmada ise izole edilen tüm *Aeromonas veronii* suşlarının, hareketli türde olduğu ve TSA agarda pigment oluşturmadığı gözlenmiştir.

*Aeromonas veronii*; *Aeromonas veronii* bv. *veronii* ve *Aeromonas veronii* bv. *sobria* olmak üzere iki biyovara ayrılmaktadır. Her iki tür de Gram negatif, çubuk şeklinde, mezofilik, hareketli bakterilerdir (Janda ve Abbott, 2010). *Aeromonas veronii* bv. *sobria*’nın ornitin dekarboksilaz için negatif, *Aeromonas veronii* bv. *veronii*’nin ise bu reaksiyon için pozitif olduğu bildirilmiştir (Altwegg ve diğerleri, 1990; Austin ve diğerleri, 1996). Çalışmamızda ise analiz edilen olguların tümünde (Olgular no: 6, 10, 13, 14, 17, 18) VITEK-2 ve API 20E sonuçlarına göre ornitin dekarboksilaz pozitif olarak bulunmuştur. Smyrli ve diğerleri (2017) tarafından yapılan çalışmada levreklerden izole edilen *Aeromonas veronii* bv. *sobria* izolatlarında ornitin dekarboksilaz negatif bulunurken, Dinçtürk ve Tanrıkul (2021) tarafından ülkemizde yapılan çalışmada ise negatif olarak bulunmuştur. Ayrıca, *Aeromonas veronii* bv. *veronii* arginin dihidrolaz için negatiftir, salisin’den asit üretir ve tartarat kullanır

(Abbott ve diğeri, 2003). Mevcut çalışmada ise API 20E sonuçlarına göre arginin dihidrolaz negatif olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Smyrli ve diğeri (2017) tarafından yapılan çalışmada *Aeromonas veronii* *bv. sobria* olarak tanımlanan izolatlardan arginin dihidrolaz pozitif olarak bulunmuştur. Dinçtürk ve Tanrıkul (2021) tarafından ülkemizde levreklerde yapılan çalışmada da arginin dihidrolaz negatif olarak bulunmuştur. L Histidin asimilasyonu (IHISa) çalışmamızda negatif olarak tespit edilirken, Smyrli ve diğeri (2017) tarafından yapılan çalışmada hem *Aeromonas veronii* *bv. sobria* olarak tanımlanan suşlarda hem de *Aeromonas veronii* *bv. veronii* olarak kullanılan referans suşta pozitif olarak bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen bu veriler izole edilen bakterilerin *Aeromonas veronii* *bv. veronii* olduğunu göstermektedir.

Smyrli ve diğeri (2017) 2008-2009 yılları arasında ve Dinçtürk ve Tanrıkul (2021) 2017-2019 yılları arasında levreklerde yaptıkları çalışmalarda hastalıktan etkilenen balıkların 250-400 gram arasında olduğunu bildirmişlerdir. Smyrli ve diğeri (2019) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise hastalığın artık 50 gramın altındaki levreklerde de rapor edildiği bildirilmiştir. Her ne kadar bizim çalışmamızdaki en küçük olgu gramajı 46 gram olsa da saha gözlemlerimize göre hastalık artık 1-2 gram ve hatta altındaki levreklerde dahi görülmektedir.

Levreklerde granülomlarla seyreden diğer hastalıklar *Fotobakteriyozis* ve *Mikobakteriyum* enfeksiyonlarıdır. *Mycobacterium* *sp.* Gram pozitif bir bakteri iken *Photobacterium* *spp.* Gram negatif bakteridir (Mugetti ve diğeri, 2021; Abu-Elala ve diğeri, 2015). Sunulan çalışmada bakteri kültürlerinde ve doku kesitlerinde yapılan Ziehl-Neelsen boyamalarda aside dirençli bakteriler görülmemesi, izolatların *Mycobacterium* *sp.*'den ayrımını sağlamıştır. İzole edilen tüm suşların motilite testleri pozitif çıkmış olup bakteri bu özelliği ile de hareketsiz olan *Photobacterium* *spp.* ve *Mycobacterium* *sp.*'den ayrımını da sağlamıştır. Diğer taraftan Gram boyamalar, histopatoloji ve immunohistokimyasal boyamalarda tanımlanan çubuk şekilli *Aeromonas veronii* morfolojisi, *Photobacterium* *spp.* için karakteristik olan bipolar görüntüsünden kolaylıkla ayrıştığını ortaya koymuştur. Sonuçta, sunulan çalışma bakteri kültürü, histopatoloji ve immunohistokimya verilerinin hastalığın kesin tanısının konulmasına önemli katkılar sağlayacağını ortaya koymuştur.

Daha önce levreklerde yapılan çalışmalarda *Aeromonas veronii* kaynaklı salgınlara 18-19°C üzerinde görüldüğü bildirilmiştir (Smyrli ve diğeri, 2017; Smyrli ve diğeri, 2019; Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021). Çalışmamızda ise toplanan materyallerin alındığı su sıcaklıkları 19-26°C arasında değişmekle birlikte saha gözlemlerimize göre su sıcaklığının 15-16°C

arasında seyrettiği kış aylarında dahi *Aeromonas veronii* kaynaklı ve çok düşük mortalite ile seyreden balık ölümlerinin olduğu görülmüştür.

Smyrli ve diğerleri (2017), levreklerde günlük mortalitenin düşük (< %0,5) görünse de, 3-4 aylık periyot sonunda kümülatif mortalitenin %17-20'lere ulaştığına dikkat çekmiştir. Yine aynı ekip tarafından 2019 yılında yayınlanan çalışmada ise kümülatif mortalitenin %50'yi geçtiği bildirilmiştir. Saha gözlemlerimize göre *Aeromonas veronii* enfeksiyonlarından dolayı mortalitenin pik yaptığı dönemlerde günlük mortalite 50 gram altındaki balıklarda %1'e ulaşırken, 50 gram üstündeki balıklarda %0,5'e ulaşmaktadır. Ege bölgesinde bazı üreticilerden aldığımız bilgilere göre üretim periyodu boyunca kümülatif mortalitenin %15-20 dolayında seyretmesi; levrek yetiştiriciliğinde başı çeken Türkiye ve diğer ülkeler açısından *Aeromonas veronii* ilişkili hastalığın önemini ortaya koymaktadır. Henüz aşısı olmayan ve antibiyotiklere de direnç gösterebilen bu hastalığa farklı disiplinlerin birlikte çalışması, etkin tedavi ve aşı geliştirilmesini de zorunlu kılmaktadır.

*Aeromonas veronii*'nin levreklerde granülatöz yangılarla birlikte seyreden sistemik bir enfeksiyon olduğu daha önce yapılan birkaç çalışmada yer almıştır (Smyrli ve diğerleri, 2017; Smyrli ve diğerleri, 2019; Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021). Bu çalışmalarda tanımlanan klinik ve nekropsi bulgularına benzer şekilde, bu çalışmaya dahil olan olguların deri ve iç organlarında granülomlar ile karakterize kronik enfeksiyon tablosu gözlenmiştir. Henüz 2008 yılından bu yana gözlemlenmeye başlanmış olan ve klinik-patolojik bulgularının literatürlerde yeni yeni yer bulmaya başlayan bu hastalıkta; *Aeromonas veronii* *bv. veronii*'nin bulaşımı ve hücrelere tutunumu ve replikasyonuna yönelik bir patogeneze çalışmasına rastlanmamıştır. Yine önemli bir balık patojeni olan ve özellikle salmonidlerde salgınlara yol açan *Aeromonas salmonicida*'nın balık dış yüzeylerinde hidrofobik hücreler ve makrofajlarda replike olarak septisemilere ve deride ülserlere neden olduğu iyi bilinmektedir. (Graham ve diğerleri, 1988). Sunulan çalışmada, Gram boyama ve immunohistokimya *Aeromonas veronii* *bv. veronii*'nin makrofajlarda replike olduğunu ve makrofajların güçlü bakterisit etkilerinden kaçabildiğini ve sonuçta da yangısal reaksiyonun granülom oluşumu ile sınırlandırıldığı görülmektedir. Bakterinin makrofajlar içerisinde hangi etkileşimleri kullanarak canlı kalabildiği ve yeni generasyonlarını oluşturabildiği hakkında bir araştırmaya rastlanmaması; fagozom/fagolizozom oluşumlarının morfolojisi elektronmikroskopik incelemelerde yer almalı, lizozomal enzimler ve serbest radikallere karşı bakterinin hangi mekanizmalarla dirençli kalabildiği de sonraki çalışmaların hipotezlerinde yer verilmesi gerekmektedir.

*Aeromonas veronii* *bv. sobria* ile enfekte levreklerin nekropsilerinde dalak, böbrek ve karaciğerlerin öncelikli etkilenen organlar olduğu gözlenmiştir. Dalakta büyüme ve üzerinde çok sayıda beyazımsı nodüller, böbrek ve karaciğerde nekroz, deride ülseratif lezyonlar tanımlanmıştır (Smyrli ve diğerleri, 2017; Dinçtürk ve Tanrıku, 2021). Bunun yanında bu organlarda peteşiyel hemorajiler, daha önce levreklerde *Aeromonas hydrophila* salgınlarında da bildirilmiştir (Doukas ve diğerleri, 1998). Sunulan tez çalışmasında levreklerin nekropsi muayeleri sonucunda dalak, karaciğer, böbrek dokularında 0.1-0.5mm çapında granülomlar en çarpıcı bulguları oluşturmuştur.

Levreklerde *Aeromonas veronii*, *Aeromonas hydrophila* ve *Aeromonas salmonicida* *subsp. achromogenes* enfeksiyonlarında deri üzerindeki hemorajiler ve yüzgeçlerde kızarıklık ya da hemorajiler, tespit edilmiştir (Doukas ve diğerleri, 1998; Demircan ve diğerleri, 2005; Smyrli ve diğerleri, 2017; Dinçtürk ve Tanrıku, 2021). Sunulan çalışmada %59 kadar olguda operkulum üzerinde de ekimotik kanamalar şeklinde dikkati çekmiştir. Derideki ülserler levreklerdeki tüm *Aeromonas veronii* çalışmalarında bildirilen ortak bulgulardan biridir (Smyrli ve diğerleri, 2017; Dinçtürk ve Tanrıku, 2021). Smyrli ve diğerleri (2017) tarafından solungaçlarda solgun renk tanımlanmış ancak solungaçlarda hemoraji ya da ekimotik kanamalardan söz edilmemiştir.

Karaciğer, dalak ve böbrekte görülen granülomlar levreklerdeki tüm *Aeromonas veronii* vakalarında (Uzun ve Oğut, 2015; Smyrli ve diğerleri, 2017; Dinçtürk ve Tanrıku, 2021) bildirilmiş olup kalp üzerindeki granülomlar da Dinçtürk ve Tanrıku (2021) tarafından rapor edilmiştir. Sunulan çalışmada da nekropsi muayenesinde granülomlar başta böbrek (%82), dalak (%77) ve karaciğer (%27) olmak üzere kalpte (%18) de tespit edilmiştir. Karaciğerdeki nekroz ve hemorajiler de yine daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Smyrli ve diğerleri, 2017; Dinçtürk ve Tanrıku, 2021). Önceki bildirimlerde ve sunulan bu çalışmada levreklerde göze çarpan granülomların *Aeromonas veronii* enfeksiyonunun en çarpıcı bulgusu olduğu ve nekropsi tanısında önemli karakteristik bir veriyi teşkil ettiği görülmektedir.

Gonadlarda makroskopik ve histopatolojik olarak tanımlanan granülomlar levreklerde daha önce hiçbir *Aeromonas sp.* enfeksiyonunda tanımlanmamıştır. Çalışmamızda ise 3 olguda makroskopik, 4 olguda ise histopatolojik olarak granülom oluşumları dışı balıkların gonadlarında tespit edilmekle birlikte bu granülomların immunohistokimyasal boyamasında pozitif reaksiyonlar belirlenmiştir. Gonadlarda görülen önemli bir bakteri yükünü bulduran lezyonlar hastalığın vertikal olarak da bulaşım kaynağı olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan deride epidermis yüzeyine yakın şekilde oluşan granülomları çevreleyen fibröz

kapsülün yıkılmış olması ve bakteri kolonilerini de içeren nekrotik içeriğin su faunasına boşalması, *Aeromonas veronii*'nin özellikle portrenteleri bulunan balıkların deri ve solungaçları yoluyla bulaşımın başlıca yolları olduğunu düşündürmektedir. Keza *Aeromonas salmonicida*'dan kaynaklanan balık enfeksiyonlarında ana bulaşım yollarının da deri yoluyla olduğu bildirilmektedir (Fernández-Álvarez ve diğerleri, 2016).

Mugetti ve diğerleri (2021) levreklerde *Mycobacterium marinum* enfeksiyonlarında nekrotik granülomların dalak ve böbreğin %70-80'ini kapsayacak yoğunlukta, karaciğerde ise tek veya nadiren çoklu olacak şekilde tanımlamıştır. Bu granümatöz lezyonlar geniş eozinofilik kazeifiye nekrotik alanların epitelooid hücreler, koyu kahverengi pigment içeren köpüklü makrofajlar, lenfositler ile çevrelediği ve en dıştan ince bir fibröz kapsülle kuşatılmış olduğu görülür. Ziehl-Neelsen boyamalarda orta ve şiddetli yoğunluklarda aside dirençli basil varlığı dikkati çeker (Mugetti ve diğerleri, 2021). Abu-Elala ve diğerleri (2015) ise levreklerdeki *Photobacterium damsela* *Subspecies piscicida* enfeksiyonlarında kronik evrede görülen farklı evrelerde granülomları değerlendirmişlerdir. Buna göre bazı granülomların merkezi kısımlarının bakteri kolonilerini de içeren eozinofilik nekrotik bir yapıda ve yangısal hücrelerce kuşatıldığı ve bağ doku ile kapsüllendiği bildirilmiştir. Diğer granülomların ise granülom merkezinde veya çevresinde melano-makrofaj hücrelerinin bulunduğu ancak bakteri kolonileri içermediği görülmüştür. Sunulan tez çalışmasında ise granülomların semikantitatif olarak 5 farklı gelişim evresine sahip olduğu değerlendirilmiştir. I. evre granülomda sağlam makrofajlar (10-20'li hücre grupları) küçük odaklar halinde epitelooid bir küme oluşturacak şekilde yığılım göstermiş ve kapsül yapısı içermediği görülmüştür. II. evre granülomlar ise dejenere-sağlam çoklu makrofaj hücre gurubundan oluşan ve geniş bir alanı kaplayan, fibröz kapsül oluşumu belli-belirsiz olan genç granülomlardan oluştuğu kaydedilmiştir. Nekrotik hücrelerden bazılarının H.E boyamada da görülebilen bakteri morfolojileri tanımlanmıştır. IV. evre granülomların ise, III. evredeki nekrotik makrofajların tamamen yıkılarak kazeifiye nekrotik bir içeriğe dönüştüğü gözlemlendi. Hatta bu evredeki bazı granülomlardaki yangısal hat makrofajların da tamamen kazeifiye nekrotik içeriğe katılarak, granülomun direkt olarak fibröz doku ile kapsüllendiği gözlemlenmiştir. V. evredeki granülomlarda ise kapsülü oluşturan fibrositler kazeifiye nekroz alanını dolduracak şekilde proliferatif olduğu ve granülomun sklerotik bir yapıya doğru evrildiği görülmüştür. Hatta bu evredeki bazı granülomlarda kazeifiye alanın fibrosit proliferasyonlarca tamamen doldurulduğu gözlemlenmiştir. Sunulan tez çalışmasında *Aeromonas veronii*'nin neden olduğu granülomların gelişim evreleri ve yaşları hakkında ayrıntılı bir veri önceki raporlarda

bildirilmemiştir. Sonuçta erken dönemde tanımlanan I. ve II. evre granülomlar özellikle *Photobacterium damsela subsp. piscisida*'nın neden olduğu histomorfoloji ile, III. ve IV. evre granülomlar ise *Mycobacterium sp.*'nin neden olduğu granülomlardan differensiyasyonunu gerektirmektedir. Bu nedenle Gram boyama ve Ziehl-Neelsen boyamaların histopatolojik tanıya eklenmesi gerekmektedir. Ticari bir antikor henüz olmamasına karşın, çalışmada gerçekleştirilen immunohistokimyasal boyama metotları ile de tanının güçlendirilmesi gerekmektedir.

*Aeromonas veronii*'nin ticari olarak satışa sunulmuş bir antikorunun bulunmamaktadır. Ayrıca daha önce levreklerde yapılan *Aeromonas sp.* çalışmalarının hiçbirinde immunohistokimyasal inceleme de yapılmamıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada *Aeromonas veronii* için antikor üretimi ve levreklerde incelenen *Aeromonas sp.* vakalarında ilk kez immunohistokimyasal incelemenin yapılması hastalığın patogenezinin tanımlanması açısından önem taşımaktadır. Bakterinin makrofajlarda çoğalması ve bu makrofajlar içerisindeki bakterinin immunohistokimyasal boyama ile bütün olgularda yüksek özgüllükte tespit edilebilmesi, immunohistokimyasal metotların *Aeromonas veronii* kaynaklı enfeksiyonların tanısında altın standart metotlardan biri olabileceği kanısını uyandırmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

*Aeromonas veronii*, Ege Denizi'nin her iki yakasında (Batı/Doğu) levreklerde görülen tüm *Aeromonas* enfeksiyonları vakalarında en yaygın türdür. Hastalık yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmekte olup, Avrupa levreği yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Smyrli ve diğerleri, 2017). Hastalık yavru balıklarda septisemi ile seyrederek direkt olarak ölümlerle, ileri yaşlardakilerde ise karaciğer, dalak ve böbrekte oluşturduğu granülomlar ile karakterizedir (Smyrli ve diğerleri, 2017; Dinçtürk ve Tanrıkul, 2021). Saha deneyimlerimize göre antibiyotik tedavisinin yetersiz kalması hastalığın kontrolünü zor bir hale getirmektedir. Bu durumun antibiyotiklerin granülomlar içerisinde yoğunlaşmamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Hastalığa karşı üretilmiş bir aşının olmaması ise üreticiler için dezavantaj oluşturmaktadır. Bu konuda yapılacak olan çalışmalar Türkiye ve diğer levrek üreticisi ülkelerdeki ekonomik kayıpların önlenmesine destek olacaktır.

Daha önce yapılan çalışmaların sonuçları da göz önünde bulundurulduğunda, *Photobacterium damsela subsp. piscisida* ve *Mycobacterium sp.* enfeksiyonlarında da sıklıkla gözlenen granülomlar bu tez çalışmasında *Aeromonas veronii*'nin levreklerde neden olduğu en göze çarpan makroskopik bulgusunu teşkil etmiştir. Bu nedenle nekropsi aşamasında bu hastalıkların ayırıcı tanısını yetersiz kılmaktadır. Histopatolojik olarak da *Aeromonas veronii* enfeksiyonlarına ilişkin tanımlanan ve kazeifiye nekroz odaklarını içeren granülomlar da bu hastalıklarda tanımlananlara benzerlik gösterebilmektedir. Özellikle de kazeifiye nekroz odakları içermeyen makrofaj kümelenmelerinden oluşan granülomlar *Photobacterium damsela subsp. piscisida* ilişkin olanlar ile çok benzerlik gösterebilmektedir. Nekropside gözlenen granülomların gelişim evreleri ilk kez bu tez çalışmasında kapsamlı olarak değerlendirilse de; sonuçta gerek makroskopik ve gerekse mikroskopik bulguların kesin tanı için yetersiz kaldığı görülmektedir. Bakteriyojik kültürleri izleyen kimyasal ve moleküler identifikasyon çalışmalarının da uzun bir sürece yayılması, tanıda gecikmelere yol açabileceği sonucunu da doğurmuştur.

Sunulan çalışmada ilk kez uygulanan immunohistokimyasal yöntemlerden immunoperoksidaz metot enfekte levreklerin doku kesitlerin *Aeromonas veronii* antijenlerini yüksek duyarlılık ve spesifitede tespit etmesi, gerek tanıda gerekse hastalığın patogenezi aydınlatmada önemli katkılar sağladığını ortaya koymuştur. Diğer yandan *Aeromonas*

*veronii*'ye yönelik ticari antikorun henüz bulunmaması, bizi izole edilen ve moleküler dizilimi teyit edilen izolatlar ile tavşanlarda poliklonal antikor üretmeye yöneltmiştir. *Aeromonas veronii*'ye karşı elde edilen antikorun ve immunoperoksidaz metodun ilk kez uygulanması ve yüksek duyarlılıkta yanıt alınması bu tez çalışmasına ayrıcalıklı bir değer kattığı düşüncesini taşımaktayız. İmmunohistokimyasal veriler bakterinin granülomlarda çoğunlukla makrofaj sitoplazmalarında yer aldığını ve yeni generasyonlarını bu hücrelerde şekillendirdiğini göstermektedir. *Aeromonas veronii*'nin makrofaj savunma sistemleri olan lizozomal enzimler ve serbest radikal yıkımından nasıl kaçtığı ya da direnç gösterdiği ve makrofajları ana konakçı hücre haline getirdiği gelecek tez/münferit ya da Ar-Ge çalışmalarına konu olabileceği kanısını taşımaktayız.



## KAYNAKLAR

- Abbott, S. L., Cheung, W. K., & Janda, J. M. (2003). The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2348-2357.
- Aberoum, A., & Jooyandeh, H. (2010). A review on occurrence and characterization of the *Aeromonas* species from marine fishes. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2(6), 519-523.
- Abu-Elala, N. M., Abd-Elsalam, R. M., & Marzouk, M. S. (2015). Molecular and immunohistochemical diagnosis of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* during naturally occurring disease in Egypt. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(6), 583-595.
- Agladze, K., Wang, X., & Romeo, T. (2005). Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *Journal of Bacteriology*, 187(24), 8237-8246.
- Albertí, S., Alvarez, D., Merino, S., Casado, M. T., Vivanco, F., Tomás, J. M., & Benedí, V. J. (1996). Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 64(11), 4726-4732.
- Altwegg, M., Steigerwalt, A. G., Altwegg-Bissig, R., Lüthy-Hottenstein, J., & Brenner, D. J. (1990). Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(2), 258-264.
- Araujo, R. M., Pares, R., & Lucena, F. (1990). The effect of terrestrial effluents on the incidence of *Aeromonas* spp. in coastal waters. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(3), 439-444.
- Asao, T., Kinoshita, Y., Kozaki, S., Uemura, T., & Sakaguchi, G. (1984). Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infection and Immunity*, 46(1), 122-127.
- Austin, B., Altwegg, M., Gosling, P., & Joseph, S. (1996). *The Genus: Aeromonas*. Wiley.

- Barnes, A. C., Dos Santos, N. M., & Ellis, A. E. (2005). Update on bacterial vaccines: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Developments in Biologicals*, 121, 75-84.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M. J., & Romalde, J. L. (2009). *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(7), 471-479.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2010). Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(3), 149-153.
- Berg, H. C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 19-54.
- Beveridge, T. J., Pouwels, P. H., Sára, M., Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Kari, K., ... Koval, S. F. (1997). Functions of S-layers. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(1-2), 99-149.
- Birkbeck, T. H., Feist, S. W., & Verner-Jeffreys, D. W. (2011). *Francisella* infections in fish and shellfish. *Journal of Fish Diseases*, 34(3), 173-187.
- Boussaid, A., Baleux, B., Hassani, L., & Lesne, J. (1991). *Aeromonas* species in stabilization ponds in the arid region of Marrakesh, Morocco, and relation to fecal-pollution and climatic factors. *Microbial Ecology*, 21(1), 11-20.
- Burke, V., Cooper, M., Robinson, J., Gracey, M., Lesmana, M., Echeverria, P., & Janda, J. M. (1984). Hemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. in relation to biotype and source. *Journal of Clinical Microbiology*, 19(1), 39-43.
- Cai, S. H., Wu, Z. H., Jian, J. C., Lu, Y. S., & Tang, J. F. (2012). Characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* bv. *veronii* associated with ulcerative syndrome from Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(1), 382-388.
- Canals, R., Altarriba, M., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J. G., Tomás, J. M., & Merino, S. (2006). Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. *Journal of Bacteriology*, 188(3), 852-862.
- Canals, R., Ramirez, S., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J. G., Tomás, J. M., & Merino, S. (2006). Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 188(2), 542-555.

- Cardia, F., & Lovatelli, A. (2007). A review of cage aquaculture: Mediterranean Sea. *FAO Fisheries Technical Paper*, 498, 159.
- Caroff, M., & Karibian, D. (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 338(23), 2431-2447.
- Chakraborty, T., Montenegro, M. A., Sanyal, S. C., Helmuth, R., Bulling, E., & Timmis, K. N. (1984). Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infection and Immunity*, 46(2), 435-441.
- Chen, Y. F., Liang, R. S., Zhuo, X. L., Wu, X. T., & Zou, J. X. (2012). Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède). *Journal of Fish Diseases*, 35(6), 421-430.
- Chopra, A. K., & Houston, C. W. (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and Infection*, 1(13), 1129-1137.
- Chu, S., Cavaignac, S., Feutrier, J., Phipps, B. M., Kostrzynska, M., Kay, W. W., & Trust, T. J. (1991). Structure of the tetragonal surface virulence array protein and gene of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23), 15258-15265.
- Demircan, D., Candan, A., & Karatas, S. (2005). Atypical aeromonas infection in cultured sea bass in the Black Sea. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57, 20417.
- Dinçtürk, E., & Tanrıkul, T. T. (2021). A New Outbreak in Sea Bass Farming in Turkey: *Aeromonas veronii*. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 72(3), 3051-3058.
- Doukas, V., Athanassopoulou, F., Karagouni, E., & Dotsika, E. (1998). *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea. *Journal of Fish Diseases* (United Kingdom).
- Esteve, C., Gutierrez, M. C., & Ventosa, A. (1995). *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(3), 462-466.
- Esteve, C., Gutierrez, M. C., & Ventosa, A. (1995). DNA relatedness among *Aeromonas allosaccharophila* strains and DNA hybridization groups of the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(2), 390-391.

- Esteve, C., Alcaide, E., & Blasco, M. D. (2009). *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* isolated from feces, water and fish in Mediterranean Spain. *Microbes and Environments*, 1203290374-1203290374.
- Fernández-Álvarez, C., Gijón, D., Álvarez, M., & Santos, Y. (2016). First isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* from diseased sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), cultured in Spain. *Aquaculture Reports*, 4, 36-41.
- Fernández-Bravo, A., & Figueras, M. J. (2020). An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Microorganisms*, 8(1), 129.
- Galán, J. E., & Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284(5418), 1322-1328.
- Graham, S., Jeffries, A. H., & Secombes, C. J. (1988). A novel assay to detect macrophage bactericidal activity in fish: factors influencing the killing of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 11(5), 389-396.
- Han, H. J., Taki, T., Kondo, H., Hirono, I., & Aoki, T. (2008). Pathogenic potential of a collagenase gene from *Aeromonas veronii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(1), 1-10.
- Hanson, L. A., Hemstreet, W. G., Hawke, J. P. (2019). Motile *Aeromonas* septicemia (MAS) in fish. *Southern Regional Aquaculture Center*, 0478.
- Hassan, M. A., Noureldin, E. A., Mahmoud, M. A., & Fita, N. A. (2017). Molecular identification and epizootiology of *Aeromonas veronii* infection among farmed *Oreochromis niloticus* in Eastern Province, KSA. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43(2), 161-167.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099-1103.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35-73.
- Kirov, S. M., Jacobs, I., Hayward, L. J., & Hapin, R. H. (1995). Electron microscopic examination of factors influencing the expression of filamentous surface structures on clinical and environmental isolates of *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *Microbiology and Immunology*, 39(5), 329-338.

- Kostakioti, M., Newman, C. L., Thanassi, D. G., & Stathopoulos, C. (2005). Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *Journal of Bacteriology*, 187(13), 4306-4314.
- Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., & Saksida, S. M. (2015). Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science*, 7, 471-496.
- Latif-Eugenín, F., Beaz-Hidalgo, R., & José, F. M. (2016). A culture independent method for the detection of *Aeromonas* sp. from water samples. *Italian Journal of Food Safety*, 5(1).
- Li, Y., & Cai, S. H. (2011). Identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tail-rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Current Microbiology*, 62(2), 623-627.
- Lillehoj, E. P., Kim, B. T., & Kim, K. C. (2002). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282(4), L751-L756.
- Ma, Z., Yang, H., Li, T., Luo, L., & Gao, J. (2009). Isolation and identification of pathogenic *Aeromonas veronii* isolated from infected Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Wei sheng wu xue bao = Acta Microbiologica Sinica*, 49(10), 1289-1294.
- Magariños, B., Toranzo, A. E., & Romalde, J. L. (1996). Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annual Review of Fish Diseases*, 6, 41-64.
- Martinez-Murcia, A. J., Esteve, C., Garay, E., & Collins, M. D. (1992). *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 91(3), 199-205.
- Martínez, M. J., Simon-Pujol, D., Congregado, F., Merino, S., Rubires, X., & Tomás, J. M. (1995). The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes O: 11 and O: 34. *FEMS Microbiology Letters*, 128(1), 69-73.
- Massad, G., Arceneaux, J. E., & Byers, B. R. (1994). Diversity of siderophore genes encoding biosynthesis of 2, 3-dihydroxybenzoic acid in *Aeromonas* spp. *Biometals*, 7(3), 227-236.
- McCarter, L. L. (2001). Polar flagellar motility of the Vibrionaceae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(3), 445-462.

- McLellan, S. L., Huse, S. M., Mueller-Spitz, S. R., Andreishcheva, E. N., & Sogin, M. (2010). Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environmental Microbiology*, 12(2), 378-392.
- Merino, S., & Tomás, J. M. (2015). Bacterial capsules and evasion of immune responses. *eLS*, 1-10.
- Merino, S., Bouamama, L., Knirel, Y. A., Senchenkova, S. N., Regue, M., & Tomas, J. M. (2012). Aeromonas surface glucan attached through the O-antigen ligase represents a new way to obtain UDP-glucose. *PLoS One*, 7(5), e35707.
- Meyer, F. P. (1991). Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science*, 69(10), 4201-4208.
- Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R., Ruyschaert, J. M., & Cornelis, G. (1990). Secretion of Yop proteins by Yersiniae. *Infection and Immunity*, 58(9), 2840-2849.
- Monfort, P., & Baleux, B. (1990). Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), 1999-2006.
- Morrison, D. C. (1983). Bacterial endotoxins and pathogenesis. *Reviews of Infectious Diseases*, 5(Supplement\_4), S733-S747.
- Mugetti, D., Varello, K., Pastorino, P., Tomasoni, M., Menconi, V., Bozzetta, E., Dondo, A., & Prearo, M. (2021). Investigation of Potential Reservoirs of Non-Tuberculous Mycobacteria in a European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Farm. *Pathogens*, 10(8), 1014.
- Nawaz, M., Sung, K., Khan, S. A., Khan, A. A., & Steele, R. (2006). Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6461-6466.
- Nawaz, M., Khan, S. A., Khan, A. A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K., & Steele, R. (2010). Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiology*, 27(3), 327-331.
- Osorio, C. R., Toranzo, A. E., Romalde, J. L., & Barja, J. L. (2000). Multiplex PCR assay for ureC and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40(3), 177-183.

- Pessoa, R. B. G., de Oliveira, W. F., Marques, D. S. C., dos Santos Correia, M. T., de Carvalho, E. V. M. M., & Coelho, L. C. B. B. (2019). The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis*, 130, 81-94.
- Potomski, J., Burke, V., Robinson, J., Fumarola, D., & Miragliotta, G. (1987). *Aeromonas* cytotoxic enterotoxin cross reactive with cholera toxin. *Journal of Medical Microbiology*, 23(2), 179-186.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F., & Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1528-1533.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15508-15513.
- Quinn, D. M., Atkinson, H. M., Bretag, A. H., Tester, M., Trust, T. J., Wong, C. Y., & Flower, R. L. (1994). Carbohydrate-reactive, pore-forming outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 62(9), 4054-4058.
- Rahman, M., Colque-Navarro, P., Kühn, I., Huys, G., Swings, J., & Möllby, R. (2002). Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 650-655.
- Ravid-Peretz, S., Colorni, A., Sharon, G., & Ucko, M. (2019). Vaccination of European sea bass *Dicentrarchus labrax* with avirulent *Mycobacterium marinum* (*iipA*:: kan mutant). *Fish & Shellfish Immunology*, 90, 317-327.
- Roberts, I. S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), 285-315.
- Salvat, M. F., & Ashbolt, N. (2019). *Aeromonas*. Global Water Pathogen Project; University of Alberta: Edmonton, AB, Canada.
- Silver, A. C., Williams, D., Faucher, J., Horneman, A. J., Gogarten, J. P., & Graf, J. (2011). Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data. *PLoS one*, 6(2), e16751.

- Smyrli, M., Prapas, A., Rigos, G., Kokkari, C., Pavlidis, M., & Katharios, P. (2017). *Aeromonas veronii* infection associated with high morbidity and mortality in farmed European seabass *Dicentrarchus labrax* in the Aegean Sea, Greece. *Fish Pathology*, 52(2), 68-81.
- Smyrli, M., Triga, A., Dourala, N., Varvarigos, P., Pavlidis, M., Quoc, V. H., & Katharios, P. (2019). Comparative study on a novel pathogen of European seabass. Diversity of *Aeromonas veronii* in the Aegean Sea. *Microorganisms*, 7(11), 504.
- Sreedharan, K., Philip, R., & Singh, I. S. B. (2013). Characterization and virulence potential of phenotypically diverse *Aeromonas veronii* isolates recovered from moribund freshwater ornamental fishes of Kerala, India. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(1), 53-67.
- Stratev, D., & Odeyemi, O. A. (2017). An overview of motile *Aeromonas septicaemia* management. *Aquaculture international*, 25(3), 1095-1105.
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.
- Takeuchi, H., Namba, A., Hori, K., Kashiwada, S., & Mano, N. (2018). *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with mortalities of riverine ayu *Plecoglossus altivelis* in the Tama river. *Fish Pathology*, 53(2), 86-89.
- Tanaka, K. H., Dallaire-Dufresne, S., Daher, R. K., Frenette, M., & Charette, S. J. (2012). An insertion sequence-dependent plasmid rearrangement in *Aeromonas salmonicida* causes the loss of the type three secretion system. *PLoS One*, 7(3), e33725.
- Tanaka, K. H., Vincent, A. T., Emond-Rheault, J. G., Adamczuk, M., Frenette, M., & Charette, S. J. (2017). Plasmid composition in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* 01-B526 unravels unsuspected type three secretion system loss patterns. *BMC Genomics*, 18(1), 1-12.
- Tekedar, H. C., Kumru, S., Blom, J., Perkins, A. D., Griffin, M. J., Abdelhamed, H., Karsi, A., & Lawrence, M. L. (2019). Comparative genomics of *Aeromonas veronii*: Identification of a pathotype impacting aquaculture globally. *PloS one*, 14(8), e0221018.

- Telford, J. R., & Raymond, K. N. (1998). Coordination chemistry of the amonabactins, bis (catecholate) siderophores from *Aeromonas hydrophila*. *Inorganic Chemistry*, 37(18), 4578-4583.
- Terashima, H., Fukuoka, H., Yakushi, T., Kojima, S., & Homma, M. (2006). The Vibrio motor proteins, MotX and MotY, are associated with the basal body of Na<sup>+</sup>-driven flagella and required for stator formation. *Molecular Microbiology*, 62(4), 1170-1180.
- The Federation of European Aquaculture Producers [FEAP]. (2021). European Aquaculture Production Report 2014-2020 (V1.1). <https://feap.info/wp-content/uploads/2022/03/production-report-v1.1.pdf> adresinden erişildi.
- Thelestam, M., & Ljungh, A. (1981). Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of alpha-and beta-hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 34(3), 949-956.
- Tomás, J. M. (2012). The main *Aeromonas* pathogenic factors. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
- Uzun, E., & Ogut, H. (2015). The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Southeastern Black Sea. *Aquaculture*, 437, 30-37.
- Van der Marel, M., Schroers, V., Neuhaus, H., & Steinhagen, D. (2008). Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*, 31(5), 321-330.
- Verma, A., Arora, S. K., Kuravi, S. K., & Ramphal, R. (2005). Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. *Infection and Immunity*, 73(12), 8237-8246.
- Whitfield, C., & Valvano, M. A. (1993). Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 35, 135-246.
- Yi, S. W., You, M. J., Cho, H. S., Lee, C. S., Kwon, J. K., & Shin, G. W. (2013). Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*). *Veterinary Microbiology*, 164(1-2), 195-200.

- Yu, J. H., Han, J. J., Kim, H. J., Kang, S. G., & Park, S. W. (2010). First report of *Aeromonas veronii* infection in farmed Israeli carp *Cyprinus carpio* in Korea. *Journal of Fish Pathology*, 23(2), 165-176.
- Zheng, W., Cao, H., & Yang, X. (2013). *Aeromonas veronii* infection in the cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor). *African Journal of Microbiology Research*, 6(44), 7218-7223.
- Zhu, M., Wang, X. R., Li, J., Li, G. Y., Liu, Z. P., & Mo, Z. L. (2016). Identification and virulence properties of *Aeromonas veronii* bv. *sobria* isolates causing an ulcerative syndrome of loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Journal of Fish Diseases*, 39(6), 777-781.

