

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ
DOKTORA PROGRAMI
DR-2022-0028

LEVREK VE ÇİPURALARDAN İZOLE EDİLEN
PHOTOBACTERIUM DAMSELAE SUŞLARININ
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARININ VE
ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

SEMA MİDİLLİ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-18015 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN- 2022

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji (Veteriner) Doktora Programı öğrencisi Sema MİDİLLİ tarafından hazırlanan ‘Levrek ve Çipuralardan İzole Edilen *Photobacterium damsela* Suşlarının Moleküler Karakterizasyonlarının ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi’ başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/06/2022

Üye (T.D.) : Prof.Dr. Şükrü KIRKAN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Prof.Dr. Serap SAVAŞAN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Pof. Dr. Cavit KUM Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye : Prof. Dr. Serkan İKİZ İstanbul üniversitesi- Cerrahpaşa
Üye.....: Dr. Öğr. Üyesi Volkan Dokuz Eylül Üniversitesi
ÖZAVCI

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannumaralı Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın konusunun belirlenmesi, taslağının oluşturulması ve uygulamaya geçilmesi de dahil bu uzun süreçte her daim desteği ve engin bilgisiyle yanımda hissettiğim saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Her daim güler yüzleriyle bana kapılarını açan saygıdeğer Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. K. Serdar DİKER'e, Prof. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, Prof. Dr. Serap SAVAŞAN'a, Doç. Dr. Göksel ERBAŞ'a, Doç. Dr. Uğur PARIN'a bir kez daha sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında her daim gerek teorik gerekse pratik bilgileriyle beni destekleyen ve yardımlarını unutamayacağım Arş. Gör. Dr. Hafize Tuğba YÜKSEL DOLGUN'a, Arş. Gör. Yiğit SEFEROĞLU'na çok teşekkürler ediyorum. Ayrıca laboratuvar çalışmalarında yardımcı ve desteğinden ötürü Uzman Veteriner Hekim Erdem SUR'a teşekkür ediyorum.

Saha örneklemelerinde her zaman desteğini gördüğüm çok kıymetli arkadaşım Uzman Veteriner Hekim Melike DERELİ'ye, ayrıca değerli veteriner hekim arkadaşlarım Uzman Veteriner Hekimler Emre BERKE ve Soner AYVAZ'a çok teşekkür ediyorum.

Saha tecrübeleriyle desteklerini esirgemeyen çok kıymetli Uzman Su Ürünleri Mühendisleri Cengiz ÖNDER, Gülçin MUTLU MENDERES ve Engin ARBAÇ'a çok teşekkürler ediyorum.

Laboratuvar denememde bilimsel deneyimi ve desteğiyle sorularımı yanıtsız bırakmayan çok kıymetli Carlos R. OSORIO'ya ve bilimsel anlamda her zaman desteğini gördüğüm çok değerli hocam Prof. Dr. Deniz ÇOBAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak her zaman desteğini omzumda hissettiğim eşim Şahin MİDİLLİ'ye, varlığı ve sevgisiyle beni her daim mutlu kılan kızım Doğa'ya çok teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kültür Balıkçılığında Çipura ve Levrek	3
2.2. Etiyoloji	5
2.3. Patogenez.....	10
2.3.1. <i>Photobacterium damsela</i> 'nın Virülansı ve Virülans Faktörleri.....	13
2.5. Histopatolojik Bulgular	17
2.6. Teşhis.....	18
2.6.1. Klinik Muayene ve Bakteriyoskopi.....	18
2.6.2. Biyokimyasal Testler	20
2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanısı	22
2.7. Tedavi	24
2.7.1. Antibiyotikler	24
2.8. Kontrol.....	25
2.8.1. Aşılar	25

3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Gereç.....	27
3.1.1. Örnekleme	27
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Solüsyon ve Araçlar	27
3.1.2.1. Besiyerleri.....	27
3.1.2.2. Gram Boyama.....	27
3.1.2.3. Biyokimyasal Testler.....	28
3.1.2.4. BD-Phoenix™ ID/AST Broth	28
3.1.2.5. Solüsyonlar	28
3.1.2.5.1. 50x TAE (Tris, Asetik asit, EDTA) Elektroforez Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific ®).....	28
3.1.2.5.2. 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific ®).....	28
3.1.2.5.3. Tris/EDTA (TE) buffer (Thermo Fisher Scientific®)	29
3.1.3. BD Phoenix™ M50 Otomatize İdentifikasyon Sistemi	29
3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	29
3.1.4.1. DNA Ekstraksiyonu.....	29
3.1.4.2. ExPrime Taq Premix (2X).....	29
3.1.4.3. Primerler	30
3.1.4.4. Agaroz Jel.....	30
3.1.4.5. Marker	31
3.1.4.6. Etidium Bromür (AppliChem®)	31
3.1.5. Kullanılan Cihazlar.....	31
3.1.5.1. Block Heater Cihazı	31
3.1.5.2. Santrifüj Cihazı.....	31
3.1.5.3. Termal Döngüleme Cihazı.....	31
3.1.5.4. Elektroforez Cihazı.....	32
3.1.5.5. Görüntüleme Cihazı.....	32

3.1.5.6. Saflaştırılmış PCR Ürünü Ölçüm Cihazı.....	32
3.1.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	32
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Örnekleme	32
3.2.2. <i>Photobacterium damsela</i> İzolasyonu.....	33
3.2.3. Gram Boyama.....	34
3.2.4. Biyokimyasal Testler.....	34
3.2.5. Bakteriyel İzolatların BD Phoenix ile İdentifikasyonu	35
3.2.6. Gliserinli Besi Yeri.....	35
3.3. DNA Ekstraksiyonu.....	35
3.4. <i>Photobacterium damsela</i> ve Alt Türlerinin PCR ile İdentifikasyonu	36
3.4.1. 16S rRNA Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti.....	36
3.4.2. Kapsüler Polisakkarit (CPS) Geninin PCR Yöntemi ile Teşhisi.....	37
3.4.3. Üreaz (URE C) Geninin PCR Yöntemi ile Teşhisi	38
3.4.4. PCR ürünlerinin elektroforez tankına yüklenmesi	39
3.4.5. Jelde yürütme.....	39
3.4.6. Görüntüleme ve değerlendirme	39
3.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	40
4. BULGULAR	41
4.1. Klinik Bulgular	41
4.2. İzolatların Besi Yerinde Üremesi ve Gram Boyama Sonuçları.....	43
4.4. BD Phoneix™ 50 Otomatize İdentifikasyon Cihazı ile İdentifikasyon	46
4.5. PCR Bulguları	46
4.5.1. <i>Photobacterium damsela</i> 16S rRNA PCR Bulguları.....	46
4.5.2. <i>Photobacterium damsela</i> CPS Geni PCR Bulguları.....	47
4.5.3. <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> URE C Geni PCR Bulguları	48
4.6. Antibiyogram Sonuçları	51

5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR.....	67
BİLİMSEL ETİK BEYANI	81
ÖZ GEÇMİŞ.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bp	: Baz çifti
CFU	: Koloni oluşturan birim (colony-forming unit)
dk/dk	: Dakika
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
ddH₂O	: Deiyonize su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
G	: Gram
LD₅₀	: Bir popülasyonun yarısını öldürmek için gereken letal doz
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mM	: Milimol
ml	: Mililitre
Na⁺Cl⁻	: Sodyum klorür
NO₂	: Nitrit
NO₃	: Nitrat
pH	: Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
pmol	: Pikomol
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
sn	: Saniye
TAE	: Tris Acetate EDTA
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
∞	: Sonsuz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. PCR ile tanımlanan <i>P. damsela</i> izolatlarının yüzdeleri.....	49
Şekil 2. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ve <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç yüzde oranları.....	54

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Örneklenen balıklarda deride görülen yamalı görüntü	41
Resim 2. Örneklenen balıklarda yamalı görüntü ve deri lezyonları.....	42
Resim 3. Örneklenen balıklarda deride belirgin lezyon gelişimi.....	42
Resim 4. Örneklenen balıklarda abdomen görüntüsü ve büyümüş dalak görünümü.....	43
Resim 5. Photobacteriosis şüpheli balıklarda dalak görüntüsü.....	43
Resim 6. Bir Photobacterium spp. şüpheli izolatının kanlı agarda görüntüsü	44
Resim 7. Bir Photobacterium spp. şüpheli izolatının TSA'da görüntüsü	45
Resim 8. Bir Photobacterium spp. şüpheli izolatın Gram negatif bipolar görüntüsü	45
Resim 9. Photobacterium damsela 16S rRNA PCR elektroforez görüntüsü.	47
Resim 10. Photobacterium damsela CPS geni PCR elektroforez görüntüsü.	47
Resim 11. P. damsela subsp. damsela URE C geni PCR elektroforez görüntüsü.....	48

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Photobacterium damselaе'nın alt türlerinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri	21
Tablo 2. Photobacterium damselaе türü için 16S rRNA ve CPS gen primerleri.....	30
Tablo 3. P. damselaе subsp. damselaе spesifik URE C geni için primer dizilimleri.....	30
Tablo 4. Photobacterium damselaе 16S rRNA geni PCR karışım oranları	36
Tablo 5. Photobacterium damselaе 16S rRNA geni PCR ısıl döngü ve süreleri.....	37
Tablo 6. Photobacterium damselaе CPS geni PCR karışım oranları	37
Tablo 7. Photobacterium damselaе CPS geni PCR ısıl döngü ve süreleri.....	38
Tablo 8. Photobacterium damselaе subsp. damselaе URE C geni için PCR karışım oranları	38
Tablo 9. Photobacterium damselaе subsp. damselaе URE C geni ısıl döngü ve süreleri.....	39
Tablo 10. CLSI standartları.....	40
Tablo 11. Photobacterium damselaе izolatlarının biyokimyasal, BD-Phoenix ve PCR identifikasyon sonuçları	50
Tablo 12. Photobacterium damselaе pozitif izolatların antibiyogram duyarlılık sonuçları.....	52
Tablo 13. İdentifiye edilen P. damselaе subsp. piscicida ve P. damselaе subsp. damselaе izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	53

ÖZET

LEVREK VE ÇİPURALARDAN İZOLE EDİLEN *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUŞLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARININ VE ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Midilli S. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2022.

Amaç: Bu çalışmada çipura ve levrek yetiştiriciliği için önemli bir tehdit olan *Photobacterium damsela* ve alt türlerinin moleküler yöntemlerle teşhisi ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırma materyalini *Photobacterium damsela* şüpheli 100'er adet ölü çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) oluşturmuştur. Balık örneklerinin iç organlarından konvansiyonel, hızlı teşhis ve moleküler yöntemlerle *P. damsela* izolasyonu yapılmış ve izolatların antibiyotiklere karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Çipura örneklerinin iç organlarından 26 (%26) *Photobacterium damsela* izolatu izole edilirken, levrek örneklerinden izolasyon yapılamamıştır. Çipura örneklerinden izole edilen 26 (%26) *P. damsela* izolatu BD-Phoenix tanı cihazı ile identifiye edilmiştir. İdentife edilen 26 (%26) *P. damsela* izolatu 16S rRNA PCR ile doğrulanmış ve CPS ile URE C genleri kullanılarak yapılan PCR ile alt tür ayırımına gidilmiştir. Sonuçta *P. damsela* suşlarından 18 adedi (%69,23) *P. damsela* subsp. *piscicida* ve geri kalan 8 adedi (%30,77) de *P. damsela* subsp. *damsela* olarak tiplendirilmiştir. *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatlarının tamamı gentamisine (10 µg) karşı %100 oranında, diğer yandan hem *P. damsela* subsp. *piscicida* hem de *P. damsela* subsp. *damsela* izolatları siprofloksasine (5 µg) karşı %100 duyarlı bulunmuştur.

Sonuç: Bu araştırma ile deniz akuakültüründe çipura ve levrek için önemli hastalık etkeni olan *P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela*'nın tür spesifik genler ile moleküler teşhisi ve bazı antibiyotiklere karşı duyarlılığı ortaya koyulmuştur.

Anahtar kelimeler: Deniz çipurası, levrek, moleküler tipleme, *Photobacterium damsela*, polimeraz zincir reaksiyonu.

ABSTRACT

DETECTION OF MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* STRAINS IN SEA BASS AND SEA BREEM

Midilli S. Aydin Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Microbiology Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2022.

Objective: In this study, it was aimed that declaring of diagnosing of *Photobacterium damsela* and its subspecies, which are significant threat for gilthead sea bream and European sea bass aquaculture, with molecular technique and sensitivity to antibiotics.

Material and Methods: The study materials were 100 dead gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) which were suspected as *Photobacterium damsela*. *P. damsela* isolation was performed by using conventional, rapid diagnostic and molecular methods from internal organs of fish specimens, and antibiotic susceptibility was investigated by disk diffusion method.

Results: While 26 (26%) *Photobacterium damsela* were isolated from the internal organs of gilthead sea bream specimens, any isolation from European sea bass specimens not performed. Total 26 (26%) *P. damsela* isolates were isolated by gilthead sea bream were identified by BD Phoenix diagnosis device. Isolated 26 (26%) *P. damsela* was confirmed by 16S rRNA PCR and subspecies separation was performed by PCR using CPS and URE C genes. As result, 18 (69.23%) of the *P. damsela* strains were typified as *P. damsela* subsp. *piscicida* and the remaining 8 (30.77%) were as *P. damsela* subsp. *damsela*. All *P. damsela* subsp. *piscicida* isolates were 100% sensitive to gentamicin (10 µg), while both *P. damsela* subsp. *piscicida* and *P. damsela* subsp. *damsela* isolates were found to be 100% sensitive to ciprofloxacin (5 µg).

Conclusion: With this research, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* which are important disease agents for both gilthead sea bream and European sea bass were diagnosed by molecular with species specific genes and their susceptibilities to some antibiotics were declared.

Keywords: Bass, molecular typing, *Photobacterium damsela*, polymerase chain reaction, sea bream.

1. GİRİŞ

Photobacterium damsela deniz balıkları için oldukça önemli bir balık patojenidir. Günümüzde *Photobacterium damsela*'nın balıklar için patojenik özelliğe sahip iki önemli alt türü tanımlanmıştır. Bu alt türlerden ilki *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Photobacteriosis'e (eski adıyla balık pastörellozisi) sebep olan önemli bir balık patojenidir ve iç organlarda sebep olduğu tüberküllerle karakteristiktir. Diğer alt tür *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* ise fırsatçı bir patojen olup pek çok balık türünde ve denizde yaşayan bazı omurgasız canlı türlerinde hastalık yapabilir. Ayrıca *P. damsela* subsp. *damsela* memelilerde epizootilere yol açarak insanlar için de infeksiyöz özellik taşıyan önemli bir zoonoz patojendir (Rivas ve diğerleri, 2011; Roberts, 2012; Eissa ve diğerleri, 2018).

Photobacteriosis günümüzde bildirildiği üzere denize kıyısı olan Avrupa ülkelerinde (Labella ve diğerleri 2006; Mladineo ve diğerleri, 2006), Akdeniz ülkelerinden Mısır (Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018) ve Türkiye'de (Çağrgan, 1993a; 1993b; Candan ve diğerleri, 1996; Korun ve Timur, 2005), Amerika (Teru ve diğerleri, 2017) ve Uzak Doğu ülkelerinden Çin (Wang ve diğerleri, 2013), Japonya (Nagano ve diğerleri, 2009) ve Tayvan'da (Liu ve diğerleri, 2003; Rajan ve diğerleri, 2003) hem doğal hem de kültürü yapılan balık türlerinden izole edilmektedir (Andreoni ve Magnani, 2014). Photobacteriosis özellikle Avrupa'da ve Akdeniz'de yaygın şekilde kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve dil balığında (*Solea* spp.) şiddetli septisemilere yol açmaktadır. Hastalık tipik şekilde yaz mevsiminde su sıcaklığının 20-25°C'lere ulaştığı zamanlarda yüksek mortaliteye yol açarak epizootiler şeklinde görülmektedir (Toranzo ve diğerleri, 1991; Osorio ve diğerleri, 1999; Magarinos ve diğerleri, 2003; Eissa ve diğerleri, 2018).

Photobacterium damsela subsp. *damsela* ise Avrupa'da İspanya'da (Labella ve diğerleri, 2011), Akdeniz ülkelerinden Mısır (Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013; Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018, Mahmoud ve diğerleri, 2018) ve Türkiye'de (Uzun ve Ögüt, 2015), Asya'da Hindistan (Krupesha Sharma ve diğerleri, 2017; Petchimuthu ve diğerleri, 2021) ve Uzak Doğu'da Tayland'da (Kanchanopas-Barnetta ve diğerleri, 2009) bildirilmiştir. *P. damsela* subsp. *damsela* damsel balığı (*Chromis punctipinnis*), vatoz (*Raja* sp.), yunus (*Delphinus* sp.) ve karides (*Penaeus* sp.) gibi çok çeşitli deniz canlısında ve

kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) gibi deniz balığı türlerinden izole edilmiştir (Roberts, 2012; Rivas ve diğerleri, 2013).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* günümüzde tek başına ya da *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* ile beraber çeşitli salgınlardan izole edilebilmektedir. Bu önemli derecede patojenik olan iki alt türün hem doğada yaşayan balıklar hem de kültür koşulları altındaki balıklar açısından önemi, hızlı yayılma göstermeleri ve çeşitli kemoterapötiklere karşı hızlıca direnç kazanabilmeleridir. Su sıcaklığı artışına paralel olarak hızlıca gelişen bu enfeksiyonlar önemli ekonomik kayıplara yol açabildiği için hızlı teşhisin önemi ortaya çıkmaktadır (Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018). Ülkemizde deniz kültür balıkçılığında *P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela*'ya karşı geliştirilen çeşitli ticari karma aşılar mevcuttur ancak bazı durumlarda aşılama hemen önce ya da aşılamanın başarısız olduğu durumlarda hastalık gelişimi gözlenebilmektedir (Korun ve Timur, 2005; Uzun ve Öğüt, 2015).

Çalışmamızda Ege Bölgesi'nde yaygın şekilde ve yüksek miktarlarda kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarında rastlanan *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ve *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* etkenlerinin moleküler yöntemler kullanılarak identifikasyonlarının tür bazında yapılması ve bu izolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada çipura ve levrek yetiştiriciliği için önemli bir tehdit olan *P. damsela* ve alt türlerinin moleküler yöntemlerle teşhisi ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının ortaya koyulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kültür Balıkçılığında Çipura ve Levrek

Çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) ülkemiz sularında tüm Akdeniz’de yaygın şekilde bulunmakla beraber, ayrıca Ege, Marmara ve Karadeniz’de de yayılım göstermektedir (Özden ve diğerleri, 2020). Özellikle Akdeniz kültür balıkçılığında başı çeken bu iki tür ülkemizin de dahil olduğu çeşitli ülkeler (Yunanistan, İspanya, İtalya, Hırvatistan ve Mısır) tarafından yoğun şekilde üretilmektedir. Çipuranın kültürü yirmi yıldan daha kısa bir sürede çok hızlı şekilde gelişmiş olup, 1985’te dünya genelinde üretimi 564 ton/yıl iken bu değer 2016’da 185,000 tonu geçmiştir (Borrego ve diğerleri, 2017; Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2022a). Levrek kültürü Avrupa’da ilk olarak ülkemiz, Yunanistan ve İtalya’da başlatılmıştır. Günümüzde ise bu büyük üreticiler arasına İspanya, Hırvatistan ve Mısır da dahil olmuştur. Tüm dünyada toplam levrek üretim 2000 yılı verileri 71,000 ton/yıl iken, 2016 akuakültür verilerine göre bu değer 191,003 ton/yıldır (FAO, 2022b).

Çipurada karşılaşılan önemli bakteriyel hastalıklara bakıldığında Akdeniz bölgesinde üretim yapan farklı çiftliklerdeki infekte çipuralardan sıklıkla *Vibrio* spp. izole edilmektedir (Balebona ve diğerleri, 1995). Çipuralarda mortaliteye sebep olan türler arasında *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio salmonicida* ve *Vibrio anguillarum* yer almaktadır (Colorni ve Padros, 2011; Balebona ve diğerleri, 1998a, 1998b; Halidar ve diğerleri, 2010). Levrek üretimi yapan çiftliklerdeki Vibriosis kaynakları ise *V. anguillarum*, *V. ordali* ve *Vibrio* spp.’dir (FAO, 2022b).

Hem çipura hem de levrek için önemli bir diğer bakteriyel hastalık etkeni ise *P. damsela* subsp. *piscicida* (Balebona ve diğerleri, 1998b; Magarinos ve diğerleri, 2001; Korun ve Timur, 2005; Essam ve diğerleri, 2016) ve *P. damsela* subsp. *damsela*’dır (Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013; Mahmoud ve diğerleri, 2018).

Çipura yetiştiriciliğinde karşılaşılan diğer bakteriyel hastalık etkenlerine bakıldığında Akdeniz bölgesinde *Pseudomonas anguilliseptica* infeksiyonları (Berthe ve diğerleri, 1995), *Tenacibaculum maritimum* (eski bilinen adlarıyla *Cytophaga marina* veya *Flexibacter marinus* veya *F. maritimus*) (Sukui ve diğerleri, 2001; Colorni ve Padros, 2011) ve *Chlamydia* kaynaklı infeksiyöz Epitheliosistis karşımıza çıkmaktadır (Cruz-Silva ve diğerleri,

1997; Crespo ve diğeri, 1999; Borrego ve diğeri, 2017). Levrek yetiştiriciliğinde karşılaşılan diğeri önemli bakteriyel hastalık etkenlerine bakıldığında, *Tenacibaculum maritimum* ve *Mycobacterium marinum*, Epitheliocystis kaynağı *Chlamydia*-like etkenleri karşımıza çıkmaktadır (FAO, 2022b).

Çipura yetiştiriciliği için ülkemizde karşılaşılan önemli hastalık etkenlerine bakıldığında Ege bölgesinde *V. alginolyticus* (Çağırğan, 1993a) ve *V. vulnificus* (Türk, 2002), *Aeromonas hydrophila* (Türk, 2002), *Staphylococcus epidermidis* (Kubilay ve Uluköy, 2004), *Pseudomonas fluorescens* (Türk, 2002), *Pseudomonas anguillaseptica* (Çanak, 2011), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Çağırğan, 1993b), *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*'ya rastlanmıştır (Akaylı, 2001). İzmir ve Muğla'da *V. anguillarum* (Candan, 1991; Çanak, 2011), *V. ordalii* (Akaylı, 2001), *V. harveyi* (Çanak, 2011) bildirilmiştir.

Ülkemizde levrek yetiştiriciliğinde görülen önemli bakteriyel etkenlere bakıldığında Ege Denizi'nde *V. anguillarum* (Çağırğan, 1993a; Tanrıkul ve diğeri, 2004), *V. alginolyticus* (Çağırğan, 1993a), *V. ordalii* (Türk, 2002; Korun, 2004), *V. vulnificus* (Türk, 2002), *V. harveyi* (Korun ve Akaylı, 2004) karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca yine Ege Bölgesi'nde *A. hydrophila* (Türk, 2002), *Flavobacterium psychrophilum* (Ayaz, 2006), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas anguilliseptica* (Türk, 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (Ayaz, 2006), *Pseudomonas chlororaphis*, *P. damsela* subsp. *damsela* (Türk, 2002), *P. damsela* subsp. *piscicida* (Candan ve diğeri, 1996; Türk, 2002), *Shewanella putrefaciens* (Korun ve diğeri, 2009) bildirilmiştir.

Levrek balığı özellikle tuzluluğa olan toleransından dolayı Karadeniz sularında da besiciliği yapılabilmektedir. Bu bölgede karşılaşılmış olan hastalık kayıtlarına bakıldığında, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* (Savaş ve diğeri, 2006), *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (Karataş ve diğeri, 2005), *A. hydrophila* (Savaş ve diğeri, 2006), *Yersinia ruckeri* (Savaş ve diğeri, 2006; Savaş ve Türe, 2007), *P. damsela* subsp. *piscicida* (Savaş ve diğeri, 2006), *P. damsela* subsp. *damsela* (Uzun ve Öğüt, 2015; Terceti ve diğeri, 2016), *Lactococcus garvieae* (Savaş ve Türe, 2007), *Staphylococcus epidermidis*'e (Timur ve diğeri, 2008) rastlanılmıştır.

Akdeniz kültür balıkçılığında ve ülkemizde *P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela*'nın en fazla etkilediği türlerin başında levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) gelmektedir (Labella ve diğeri, 2010a; Abdel-Aziz ve

diğerleri, 2013; Khouadja ve diğerleri, 2014; Essam ve diğerleri, 2016; Parın ve diğerleri, 2016; Terceti ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018; Varvarigos, 2020).

Çipura ve levrek kültüründe en önemli hastalıklardan biri olan Photobacteriosis (balık pastörellozisi) sebep olan etken *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* *Vibrionaceae* ailesine dahil *Photobacterium* cinsine ait *Photobacterium damsela* türünün bir alt türüdür. Hastalık şiddetli patojenik özelliğe sahip olup deniz balıklarında hemorajik septisemilere sebep olur. Photobacteriosis dünya genelinde kültürü yapılan çeşitli balık türlerinde ciddi ekonomik kayıplara sebep olabilmektedir (Thyssen ve Ollevier, 2005; Martins ve diğerleri, 2015; Essam ve diğerleri, 2016).

2.2. Etiyoloji

Photobacterium Vibrionaceae ailesine dahil Gram negatif kokobasil veya basil, 0,8-1,3 µm çap ve 1,8-2,4 µm uzunluğuna sahip bakterilerden oluşan bir bakteri cinsidir. Büyümek için ihtiyaç duydukları optimum sıcaklık 18-25°C'dir. Aerobik ya da fakültatif anaerobik, oksidaz ve katalaz pozitif bir bakteri cinsidir, optimum büyüme için sodyuma ihtiyaç duymaktadırlar. Bir veya üç arasında sahip olduğu polar flagellalar sayesinde hareketli bakteriler olmakla beraber bazı bakteriler ise hareketsizdir. Bazı türler flöresans yeteneğine sahiptir (Farmer Iii ve Hickman-Brenner 2006; Moi ve diğerleri, 2017).

Photobacterium spp. deniz suyunda bulunması yanında denizde yaşayan hayvanlarda saprofitik ya da enterik bir ilişki içerisinde bulunmaktadırlar. *Photobacterium* spp. üyeleri deniz suyunda ve sedimentte, tuzlu göllerde ve deniz hayvanlarının sindirim sisteminde bulunabilirler (Urbanczyk ve diğerleri, 2011). İnfekte ettiği hayvanlar arasında yer alan deniz balıkları, deniz memelileri ve insanlarda patojenik özellik göstermektedirler (Urbanczyk ve diğerleri, 2011; Moi ve diğerleri, 2017).

Photobacterium damsela dünya genelinde kültürü yapılan balıklarda ciddi ekonomik kayıplara sebep olan bir bakteriyel hastalık etkenidir. İlk kez 1963 yılında Amerika'da beyaz levrek (*Morone americanus*) ve çizgili levrekte (*Morone saxatilis*) doğal populasyondan izole edilmiştir. Hastalık balık populasyonlarının yarısına yakınında mortaliteye sebep olmuştur (Snieszko ve diğerleri, 1964). Bu etken daha sonraki çalışmalarda *Vibrio damsela* ismiyle demirci chromis (*Chromis punctipinnis*) balığında deri ülserlerinden izole edilmiştir (Love ve diğerleri, 1981). Denizlerde *Photobacterium damsela* su sıcaklığının 20-25°C'lere ulaştığı

zamanlarda duyarlı türlerde akut yaz epizootilerine yol açmaktadır. (Toranzo ve diğerleri, 1991; Baptista ve diğerleri, 1996).

Günümüzde *Photobacterium damsela* türünün sahip olduğu iki farklı alt tür tanımlanmıştır, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ve *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. Alt türlerden *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Photobacteriosis (balık pastörellozisi) sebep olan önemli bir patojendir. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* *Vibrionaceae* ailesi, *Photobacterium* cinsi ve *Photobacterium damsela* türünün bir alt türüdür. Bu patojen deniz balıklarında şiddetli epizootilere yol açmaktadır (Martins ve diğerleri, 2015; Essam ve diğerleri, 2016). Diğer alt tür *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* ise denizde yaşayan balıklar ve omurgasızları infekte etmenin yanında, çeşitli memeli türlerinde ve insanlarda da hastalığa yol açan fırsatçı bir patojen özelliği de göstermektedir (Gauthier ve diğerleri, 1995; Osorio ve diğerleri, 1999; Rivas ve diğerleri, 2013).

Thyssen ve diğerleri (1998) *P. damsela* subsp. *piscicida*'nın fenotipik özelliklerine göre *P. damsela* ile benzerlik göstermediğini bildirmiş olsa da 16S rRNA ve üreaz C genlerinin spesifik primerleri ile çalışılan multiplex PCR sonucuna göre alt türlerin varlığı doğrulanmıştır (Osorio ve diğerleri, 2000a; Labella ve diğerleri, 2011).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* halofilik, hareketsiz, çomaktan koka kadar değişen şekillere sahip ve bazı suşlarda kapsüllü olabilen bir bakteridir. Boyutları 0,6 - 1,2 x 0,8 - 2,6 µm aralığında olup, Gram negatif bipolar boyanma özelliği göstermektedir. Farklı ortam şartlarında pleomorfizm özelliği gösterebilir. Ayrıca sadece balıklar için patojenik özellik göstermektedir (Bakopoulos ve diğerleri, 1995; Candan ve diğerleri, 1996; Korun, 2004). Üremek için 20-25°C aralığına ihtiyaç duyar, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*'ya kıyasla 37°C'de ürememektedir ve kanlı agar besi yerinde hemolitik aktivite göstermemektedir (Magarinos ve diğerleri, 1996a; Osorio ve diğerleri, 2000b; Rivas ve diğerleri, 2011).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* dış bakıda lezyonlar oluşturmakla beraber iç organlarda dalak ve böbrekte meydana getirdiği beyaz tüberküllerden dolayı pseudotüberkülozis ismini almıştır (Korun ve Timur, 2005). Teşhis esnasında etken böbrek, karaciğer, dalak ve solungaçtan izole edilebilir. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Triptik Soy Agar'da (TSA) ve %1-3 Na⁺Cl⁻ içeren besi yerlerinde üreyebilir. Etken 20-25°C'de 48 saat inkübasyondan sonra, küçük ve çığ damlacığına benzer şekilde koloniler şeklinde gelişebilir. Brain Heart Infüzyon Agarda (BHIA) koloniler küçük solgun ve bir arada

olacak şekilde üremektedir. Ayrıca, %3 Na⁺Cl⁻ içeren koyun kanlı agarda non-hemolitik şekilde ürerler. *P. damsela* subsp. *piscicida* tiyosülfat-sitrat-safra tuzları-sükroz agarda (TCBS) gelişmemektedir. Ayrıca bu tür Vibriostat testine (O/129) karşı duyarlıdır (Roberts, 2012; Eissa ve diğerleri, 2018).

P. damsela subsp. *piscicida*'nın genç kültürleri ışık mikroskobu altında çomak şeklinde görünürken eskiyen kültürlerde kok görünümünü alabilir. Bakterinin optimum üreme sıcaklığı 22-25°C olmasına rağmen 15-32,5°C aralığında da üreyebilirler (Zorrilla ve diğerleri, 1999; Yazıcı, 2004). Etkenin biyokimyasal özellikleri arasında sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif, fakültatif anaerobik ve kemoorganotrof ve glukoz fermentatif olması yer almaktadır (Roberts, 2012).

P. damsela subsp. *piscicida*'nın balık vücuduna girme yollarının solungaçlar, deri ve sindirim sistemi olduğu düşünülmektedir (Bakopoulos ve diğerleri, 1995; Magarinos ve diğerleri, 1996a, Petchimuthu ve diğerleri, 2021). Geçmişte bu etkenin balıktan balığa temas yolu ile ya da denizde yaşayan omurgasız canlılar aracılığı ile bulaştığı düşünülmekteydi (Toranzo ve diğerleri, 1991; Korun, 2004; Korun ve Akaylı, 2004). Günümüzde ise etkenin balıktan balığa bulaştığı ve özellikle *P. damsela* subsp. *damsela*'nın suda bir süre hayatta kalabildiği ve sudan balığa geçerek direk infekte edebildiği belirtilmiştir (Fouz ve diğerleri, 1998; Roberts, 2012; Eissa ve diğerleri, 2018).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* günümüzde Japonya'da kültürü yapılan sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*) ve kara çipurada (*Spondyliosoma cantharus*), Avrupa'da çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*), kefal (*Mugil cephalus* ve *Chelon labrasus*) ve dil balığında (*Solea senegalensis* ve *Solea solea*), Amerika'da çizgili levrek (*Morone saxatilis*), beyaz levrek (*Morone americana*) ve hibrid çizgili levrekte (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*), Tayvan'da kobiadan (*Rachycentron canadum*) ve Çin'de altın palamuttan (*Trachinotus ovatus*) bildirilmiştir (Romalde, 2002; Roberts, 2012; Avcı ve diğerleri, 2013; Wang ve diğerleri, 2013; Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida*'nın yaz başında Japonya'da (20-25°C), yaz ortasında İspanya'da (25°C) hem doğal hem de kültür balıklarında yoğun ölümlere yol açtığı bildirilmiştir (Toranzo ve diğerleri, 1991; Magarinos ve diğerleri, 1996a). Mısır'da hastalık en fazla yaz aylarında görülmüştür (Essam ve diğerleri; Eissa ve diğerleri, 2018). Ayrıca *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*'nın Yunanistan'da periyodik şekilde her yıl Mayıs

ve Ekim ayları arasında çipura, levrek ve kefal balıklarında epizootiler şeklinde görüldüğü bildirilmiştir (Romalde, 2002).

P. damsela subsp. *piscicida* şiddetli salgınlara yol açarak yüksek oranda mortaliteyle seyreden sepsisemilerden sorumludur (Toranzo ve diğerleri, 1991). Ancak bir çalışmada Ege Denizi'nde su sıcaklığının 18-19°C ölçüldüğü bir ağ kafes işletmesinde günlük olarak ortalama %5'e varan ölümler izlenmiştir (Korun ve Timur, 2005). Yine bir çalışmada su sıcaklığının artışına paralel su kalitesinin düştüğü bölgelerde yüksek oranda (%40-50) balık ölümlerinin izlendiği bildirilmiştir (Yaman ve diğerleri, 2003). Diğer yandan Japonya'da balık çiftliklerinde her yıl su sıcaklığı 25°C 'nin üzerine çıktığında ya da bol ve uzun süreli yağmurlar nedeniyle suda tuz oranı düştüğünde *P. damsela* subsp. *piscicida* infeksiyonları görüldüğü bildirilmiştir (Magarinos ve diğerleri, 1996a; Korun ve Timur, 2005).

Photobacteriosis infeksiyonu açısından ülkemizde görülen vakalara bakıldığında hastalığa ilk kez 1993 yılında Ege Denizi'nde kafeslerde yetiştiriciliği yapılan çipuralarda rastlanmıştır (Çağırğan, 1993b). Aynı infeksiyon bir yıl sonra levreklerde de izlenmiştir (Candan ve diğerleri, 1996). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* aynı yıl Çanakkale Eceabat'ta havuzlarda kültürü yapılan levrek balıklarından da izole edilmiştir (Tanrıkul ve Çağırğan, 2001). Yine aynı yıllarda ülkemizde kültür levreklerinde 25°C su sıcaklığında Pasteurellosis kaynaklı yoğun ölümler rapor edilmiştir (Candan ve diğerleri, 1996; Korun ve Timur, 2005). Tür ayrımının yapıldığı ilk çalışmalarda, alt tür *P. damsela* subsp. *piscicida* çipura (Çağırğan, 1993b) ve levrekten izole edilmiş ve bu vakalarda önemli ekonomik kayıplar izlenmiştir (Korun, 2004; Savaş ve diğerleri, 2006). Bu etken ülkemizde ayrıca kefal türlerinde (*Mugil cephalus*, *Chelon labrosus*) (Tanrıkul ve Çağırğan, 2001) ve Karadeniz'de levrek ve gökkuşacağı alabalığından (*Oncorhynchus mykiss*) da izole edilmiştir (Savaş ve Türe, 2007; Öztürk ve Altınok, 2014; Uzun ve Öğüt, 2015).

Photobacterium damsela subsp. *damsela* ilk kez 1971'de "isimsiz deniz *Vibrio* 'su" olarak adlandırılmıştır ve insan infeksiyonu olarak izole edilmiştir (Morris ve diğerleri, 1982). Balıklarda ise ilk kez 1981 yılında damsel balığında (*Chromis punctipinnis*) gelişen deri ülserlerinden izole edilmiştir (Love ve diğerleri, 1981). Bu etken insan dahil çeşitli memeli türleri için primer patojen özelliği taşımaktadır (Goodell ve diğerleri, 2004; Yamane ve diğerleri, 2004; Labella ve diğerleri, 2011).

P. damsela subsp. *damsela* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology isimli kitapta bildirilen sistematik bilgisine göre, *P. damsela*'nın bir alt tür olduğu ve

Photobacterium cinsi ile *Vibrionaceae* ailesine dahil olduğu belirlenmiştir (Thyssen ve Ollevier, 2005).

P. damsela subsp. *damsela* Gram negatif, mikroskop altında genelde çomak ve bazı eski kültürlerde kokobasil şeklinde görünen ve bipolar boyanabilen, hareketli bir patojendir (Roberts, 2012; Eissa ve diğerleri, 2018). Bu etken 20-35°C arasında üreyebilir ve %1-3 NaCl ilave edilmiş besi yerlerinde TCBS agar üzerinde küçük yeşil koloniler, BHIA üzerinde küçük solgun bir arada görünen koloniler şeklinde izlenmektedir. Ayrıca etken kanlı agarda küçük β-hemolitik koloniler şeklinde izlenmektedir. İzolatlar sitokrom oksidaz, katalaz ve arginin dihidrolaz pozitifdir, nitrat indirgeyebilir ve melibioz ve maltozu fermente edebilirler, Vibriostatik ajana (O/129) karşı ise duyarlıdırlar. Ayrıca API 20E kitleri teşhiste biyokimyasal test sonuçlarını doğrulama amaçlı kullanılabilir (Labella ve diğerleri, 2010a, 2011; Roberts, 2012; Eissa ve diğerleri, 2018).

Sekonder infeksiyonlara yol açtığı bilinen *P. damsela* subsp. *damsela*'nın primer patojen olma özelliği de güçlüdür ve bazı izolatları laboratuvar deneylerinde sağlıklı balıkları infekte edebilmiştir (Ho ve diğerleri, 2011). *P. damsela* subsp. *damsela* ılık ve soğuk deniz sularında yaşayan çeşitli balık türlerinde primer patojen olarak ülser ve hemorajik septisemilere yol açmaktadır (Fouz ve diğerleri, 1992; Pedersen ve diğerleri, 1997; Labella ve diğerleri, 2010b; Rivas ve diğerleri, 2011). Bu etken insanlarda yara infeksiyonları yanında bazı vakalarda primer septisemiye yol açabildiği (Essam ve diğerleri, 2016) ve hatta ölümcül sonuçlar doğurabildiği bildirilmiştir (Rivas ve diğerleri, 2011).

P. damsela subsp. *damsela* primer patojen olarak damsel balığı (*Chromis punctipinnis*), yayıngiller (catfish), kahverengi köpek balığı (*Carcharhinus plumbeus*), vatozlar (*Raja* sp.), yunuslar (*Delphinus* sp.) ve karides (*Penaeus* sp.) gibi çeşitli deniz canlılarında görülmesinin yanında, denizde kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*), sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*), granyöz (*Argyrosomus regius*), kalkan (*Psetta maxima*), çizgili mercan (*Pagrus auriga*), sargoz (*Diplodus sargus*), Atlantik pisi balığı (*Hippoglossus hippoglossus*), yılan balığı (*Anguilla reinhardtii*) ve gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) yara infeksiyonlarından izole edilmiştir (Roberts, 2012; Rivas ve diğerleri, 2013; Bowden ve diğerleri, 2017).

P. damsela subsp. *damsela* ülkemizde ilk kez Muğla'da çipuralardan (*Sparus aurata*) (Akaylı, 2001), daha sonra da aynı bölgede levreklerden (*Dicentrarchus labrax*) (Türk, 2002) izole edilmiştir. Sonrasında tekrar levrek kültüründe etkene rastlanmıştır (Korun, 2004).

Patojene ayrıca Karadeniz’de gökkuşuğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) (Timur ve diğerleri, 2008; Kayış ve diğerleri, 2009), istavritte (*Trachurus mediterraneus*) (Boran ve diğerleri, 2013) ve levrekte (*Dicentrarchus labrax*) de rastlanmıştır (Uzun ve Ögüt, 2015).

2.3. Patogenez

Günümüzde *P. damsela*’nın iki alt türü de (*P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela*) gerek doğal yollarla gerekse laboratuvar koşullarında çeşitli balık türlerinde infeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu infeksiyonların etiyojisi ve teşhisine ilişkin çeşitli araştırmalar mevcut olmakla birlikte infeksiyonların patojenitelerine ve balıkta gelişen biyolojik değişimlere ait daha sınırlı çalışmalar mevcuttur. İnfeksiyolara yol açan bu iki alt tür farklı genotiplere, farklı fenotipik özelliklere ve farklı patojeniteye sahiptir (Takahashi ve diğerleri, 2008). Bütün bu sebeplerden dolayı meydana gelen infeksiyonun teşhisi sırasında hastalık gelişim mekanizmalarının bilinmesi infeksiyonun daha hızlı kontrol altına alınması açısından önemlidir (Essam ve diğerleri, 2016).

P. damsela subsp. *piscicida* etkeni balıklarda infeksiyon oluştururken canlı hücrelere tutunması zayıf ya da orta kuvvette olmaktadır ancak bu etken konakçısında canlı hücre içine girebilir ve burada bir kaç gün canlı kalabilmektedir (Magarinos ve diğerleri, 1996b). *P. damsela* subsp. *piscicida* ile infekte olan çipuralarda büyümeyle beraber makrofaj ve nötrofillerin fonksiyonelleşmesine bağlı olarak, aktif fagositoz yapabilme yeteneğinin gelişmesiyle hastalığa karşı dirençlerinin arttığı bildirilmiştir. Buna göre küçük çipuralar (< 5 g) hastalığa duyarlı, 50 g ve üzeri balıklar ise daha dirençlidir (Noya ve diğerleri, 1995; Romalde, 2002).

Yapılan bir patojenite çalışmasında, farklı balık türleri ve farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş 11 adet *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatu ve kontrol amaçlı *Vibrio anguillarum* R-82 ve *Aeromonas hydrophila* B-32 birlikte kullanılmıştır. Patojenite testleri açısından balıklar için etkenlerin virülansının incelendiği çalışmanın sonuçlarına göre *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatlarının çipura (*Sparus aurata*), gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve kalkan (*Scophthalmus maximus*) için virülant olduğu sonucuna varılmıştır. Araştırmada LD50 değerinin 10^3 - 10^6 CFU’ya kadar değiştiği not edilmiştir. Tür karşılaştırmasında gökkuşuğu alabalığı ve kalkan laboratuvar koşullarında patojene karşı en hassas türler olarak belirlenmiş olup gökkuşuğu alabalığında etkenin periton içine enjeksiyonu sonucunda 6 ve 72. saatler arasında mortalitelerin geliştiği izlenmiştir. Klinik verilere

bakıldığında ölmek üzere olan balıklarda bulgu görülmemesine karşın, etkenin inoküle (enjeksiyon) edilen izolatları, ölen balıkların hepsinde iç organlarından saf kültürler halinde yeniden izole edilmiştir. Ayrıca, *P. damsela* subsp. *piscicida* infeksiyonunu atlatan balıklarda bakteriden tamamen arınma olmamıştır. Ayrıca etkenin dermonekrotik faktör varlığını görmek için yapılan testin sonuçlarına göre, 10 adet *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatından 7'si enjekte edildiği bölgede hemorajik ve/veya ödematoz bir bölge oluşturarak üremiştir. *P. damsela* subsp. *piscicida*'nın dermatoksisite özelliği ısıtma işlemi sonrası ortadan kalkmıştır (Magarinos ve diğerleri, 1992).

Hasta şüpheli levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipuralarla (*Sparus aurata*) yapılan çalışmada doğal yollarla gelişen bir salgından izole edilen *P. damsela* subsp. *damsela*'nın virülent bir izolatı bir grup sağlıklı balığa periton içine enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonunda balıklarda 4. günden 13. güne kadar %60'a varan kümülatif bir mortalite meydana gelmiştir. Kontrol grubunda ise mortalite izlenmemiştir. Hem çipura hem de levreklerde dış bakıda infeksiyonun enjekte edildiği yerde şiddetli hemoraji izlenirken, ayrıca şişkin görünümlü abdomen ve anal açıklık belirgindir. İç organlarda izlenen postmortem değişikliklerde bağırsak ve karaciğerde hemorajiler ve safra kesesinde tıkanıklık dikkat çekmiştir (Essam ve diğerleri, 2016).

P. damsela subsp. *damsela*'nın patojenitesini göstermek için, virülent bir izolatın (LD50 1×10^5 CFU) hücre dışı ürünleri çizgili mercana (*Pagrus auriga*) intraperitonel yolla enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyon sonrasında 2 ile 4 saat sonra letal etki izlenmeye başlamıştır. Diğer yandan non-virülent izolatlardan (LD50 $> 10^8$ CFU) elde edilen hücre dışı ürün örnekleri balıklara enjeksiyon edildikten sonra toksik etki izlenmemiştir. Hücre dışı ürünler ısıtma işlemine (100°C'de 10 dak) tabi tutulduktan sonra balıklara enjekte edildiği zaman ölüme sebebiyet vermemiştir (Labella ve diğerleri, 2010b).

P. damsela subsp. *damsela* ile infekte olan larva, juvenil ve yavru çipura (*Sparus aurata*) ve levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) gelişen infeksiyonun total prevalansı çipura (*S. aurata*) için %7,54 (11 infekte balık/ 146 incelenen balık) ve levrek (*D. labrax*) için %5,93'tür (7 infekte balık /118 incelenen balık). Yetişkin balıklarda ise prevalans çipura için %44 (11/25) ve levrek için %28 (7/25) olarak hesaplanmıştır (Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013).

Levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) *P. damsela* subsp. *damsela*'nın virülansını değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, bir hemolitik bir de non hemolitik izolat, bir de yüksek hemolitik yapılı bir izolat olan RM-71 (pPHDD1virülens plasmide sahiptir)

kullanılmıştır. Balıklar 24°C su sıcaklığında tutulmuş ve iki farklı dozda ($5,4 \times 10^5$ ve $3,4 \times 10^7$ CFU/balık) bakteri ile infekte edilmiştir. RM-71 izolatının iki farklı dozu da 24 saat içinde levreklerde %100 mortaliteye sebep olmuştur ve bu sonuca göre levrek türü bu izolata karşı konakçı duyarlılığına sahiptir. Plazmitsiz hemolitik küçük kolonilerin mortalite oranı ise $5,4 \times 10^5$ doz için %20 ve $3,4 \times 10^7$ CFU/balık doz için %80 bulunmuştur. Non hemolitik izolatın mortalite oranı sırasıyla %0 ve %20 olarak hesaplanmıştır. Deneme sonrasında ölen bütün balıkların böbreklerinden *P. damsela* subsp. *damsela* yeniden izole edilebilmiştir. Bu sonuçlara göre Karadeniz'deki levrekler için plazmitsiz *P. damsela* subsp. *damsela* patojenik özellik göstermiştir. Ölen balıkların hemen hemen hepsinde ağız çevresi, yüzgeç ve anal bölgede hemoraji izlenmiştir (Terceti ve diğerleri, 2016).

Çipura (*Sparus aurata*) ve levreklerle (*Dicentrarchus labrax*) yapılan başka bir çalışmada, *P. damsela* subsp. *damsela* LD50 değerini belirlemek için hemolitik özellikteki bazı izolatlar kullanılmıştır. *P. damsela* subsp. *damsela*'nın çeşitli izolatı ve R1 (yüksek oksidaz aktivitesi gösteren izolat) ve S4 (hemolitik aktivite gösteren izolat) izolatları ile deneysel infeksiyon geliştirilmiştir. R1 ve S4 izolatları ile yapılan enjeksiyon sonucunda 2. gün infeksiyon işaretleri gözlenmeye başlamıştır. Ancak diğer izolatların klinik bulguları 4. günden itibaren izlenmiştir. Kontrol grubunda ise mortalite izlenmemiştir. İzolatlar arasında en yüksek LD50 değeri R1 izolatı için $1,78 \times 10^2$ CFU/balık değerindedir. Virulent izolat hücreleri ile enjeksiyon sonucunda infekte edilen balıklarda gelişen deri ülserleri doğal olarak hasta olan levreklerde görülenle benzerlik göstermiştir (Khouadja ve diğerleri, 2014).

İspanya'da yapılan bir çalışmada kültürü yapılan Senegal dil balığından (*Solea senegalensis*) izole edilen *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatlarının genetik analiz sonuçlarına göre bu izolatlar ile çipura (*Sparus aurata*) ve levrekten (*Dicentrarchus labrax*) elde edilen izolatların aynı olduğu ve bu izolatların dil balığı için yüksek derecede virulent olduğu tespit edilmiştir. Deneysel intraperitoneal enjeksiyonla oluşturulan infeksiyon sonucuna göre hem dil balığı hem de çipura için LD50 değeri 10^3 CFU/balık değerinden daha düşük olarak belirlenmiştir. Bu değer banyo yoluyla oluşturulan infeksiyonda ise 10^5 hücre/ml değerinden daha düşüktür. Ayrıca sonuçlara göre dil balığı izolatlarının virülans değeri (intraperitoneal ve banyo denemesi için LD50 değeri sırasıyla 10^2 CFU/balık ve 10^4 CFU/ml'dir) çipuradan elde edilenden daha yüksek bulunmuştur (Magarinos ve diğerleri, 2003).

2.3.1. *Photobacterium damsela*'nın Virülansı ve Virülans Faktörleri

Bakteriyel balık patojenlerinin virülans gücüne bakıldığında etken tarafından üretilen hücre dışı ürünler (ECPs) öne çıkmaktadır. Bu ürünler önemli birer virülans faktör özelliği taşıyan çeşitli salgılardır. Bu salgılar temelde bakteriye besin sağlamakla beraber hastalığın agresif şekilde gelişimine de katkı sağlayabilir ve böylece bakteri konakçının savunma mekanizmasına kolayca karşı koyabilir (Toranzo ve Barja, 1993). Farklı izolatlar salgıladıkları hücre dışı ürünlerindeki protein ve lipopolisakkarit yapısının farklı olması sebebiyle birbirinden farklılık göstermektedirler. Bu nedenle ürettikleri hücre dışı ürünlerin etkileri de değişkenlik göstermektedir (Magarinos ve diğerleri, 1992; Romalde, 2002).

P. damsela subsp. *piscicida* izolatlarının hücre dışı ürünleri asıl canlı hücre kadar olmamakla beraber aktif şekilde letal özellik taşımaktadır. Bu hücre dışı ürünlerin farklı balık türleri üzerinde letalite gösterdiği bildirilmiştir (Magarinos ve diğerleri, 1992). Bu ürünlerin önemli karakteristik özellikleri fosfolipaz, sitotoksik ve hemolitik aktiviteleridir. Bunlar arasında özellikle fosfolipaz enzimi histolojik açıdan dokularda hasarlara yol açmaktadır (Noya ve diğerleri, 1995; Romalde, 2002).

İzolatların virülans gücünün araştırıldığı bir çalışmada *P. damsela* subsp. *piscicida* suşlarının hücre dışı ürünleri hem balıklarda hem de homeoterm bir canlı olan koyunlarda sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca *P. damsela* subsp. *piscicida* Chinook somon (*Oncorhynchus tshawytscha*) ve kalkan balığı (*Scophthalmus maximus*) eritrositlerine karşı hemolitik aktivite göstermesine rağmen gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) eritrositlerine karşı böyle bir etki sergilememiştir (Magarinos ve diğerleri, 1992).

P. damsela subsp. *piscicida*'nın diğer virülans faktörlerine bakıldığında ise plasmidler ve salgıladıkları toksinler, sideroforlar, piscibactin, polisakkarit kapsüler madde gibi yapılar ve salgılar karşımıza çıkmaktadır. *P. damsela*'nın iki alt türü de sahip olduğu plasmidlerin farklılık göstermesi, virülens gen içeriklerinde önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir ve bu hastalık yapma mekanizmalarındaki farklılığı açıklamaktadır (Rivas ve diğerleri, 2011; Osorio ve diğerleri, 2015).

P. damsela subsp. *piscicida*'da önemli virülans faktörlerden biri metalloproteaz olan A-B toksin AIP56'dır. Bu ekzotoksin balık makrofaj ve nötrofillerinde apoptozisi teşvik etmektedir. AIP56, bir plasmid olan pPHDP10'da kodlanmaktadır (Do Vale ve diğerleri, 2005; Osorio ve diğerleri, 2015; Labella ve diğerleri, 2017).

P. damsela subsp. *piscicida* balık vücudunda yayılırken ihtiyaç duyduğu demirin biyosentezi için bir siderofora sahiptir. Bu sideroforun kimyasal yapısı piscibactin özelliğindedir (Osorio ve diğerleri, 2006; Osorio ve diğerleri, 2015). Piscibactin özellikle infekte balıklarda virülansa katkı sağlamaktadır (Balado ve diğerleri, 2018).

Virulent *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatları serum dirençlidir ve taze balık serumunda hayatta kalıp çoğalabilirken, diğer yandan non-virulent izolatlar taze balık serumu içinde inhibe olurlar (Andreoni ve Magnani, 2014). Ayrıca kapsül üretimi serum direnci ile yakından ilgilidir. Kapsüllü izolatlar taze serumun sahip olduğu inhibe etkisinden etkili şekilde kurtulabilirler (Magarinos ve diğerleri, 1996b; Labella ve diğerleri, 2017).

Diğer bir virülans faktör polisakkarit kapsüler maddedir (Magarinos ve diğerleri, 1996c; Romalde ve Magarinos, 1997). Deneysel olarak oluşturulan infeksiyonlarda kapsülü olmayan *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatlarına kapsül ekspresyonu yapıldığında izolatların balık serumunun bakterisidal etkisine karşı dirençleri artmıştır (Romalde, 2002).

Bu virülans faktörlerine ek olarak taşınabilir bir plasmid olan pPHDP70 *P. damsela* subsp. *piscicida* için balık virülansına büyük katkıda bulunmaktadır. Ayrıca bu plasmid horizontal yolla başka bir bakteriye geçebilmektedir (Osorio ve diğerleri, 2015). Bir çalışmanın sonuçlarına göre *P. damsela* subsp. *piscicida*'nın, konakçı vücudunda, konakçının ürettiği makrofaj ve nötrofillerini kendi kendine apoptozis etmesini uyararak, konakçıyı zayıf düşürdüğü, böylelikle konakçı vücudunda yayılabildiği bildirilmiştir (Do Vale ve diğerleri, 2005).

P. damsela subsp. *damsela*'da virülansa ilişkin önemli hücre dışı ürünler olan proteaz, hemoliziner ve siderofor kaynaklı demir ayrıştırma sisteminden söz edilmektedir (Norqvist ve diğerleri, 1990; Labella ve diğerleri, 2011). Bunların yanında virülansa katkı sağlayanlar arasında fosfolipaz ve kollagenaz aktivitesi de yer almaktadır (Labella ve diğerleri, 2017). Bu etkenler konakçıda doku hasarı ve hemorajiye yol açarak bakterinin istilası, kolonizasyonu ve yayılmasında önemli rol oynarlar (Finkelstein ve diğerleri, 1992; Labella ve diğerleri, 2011).

P. damsela subsp. *damsela*'nın farklı izolatlarının farklı oranlarda hemolitik özellik gösterdiği izlenmiştir (Fouz ve diğerleri, 1993). Hem balık hem de insan patojeni olan izolatların ise güçlü hemolitik ve yüksek virulent özellik gösterdiği bildirilmiştir (Fouz ve diğerleri, 1994).

Çalışmalarda *P. damsela* subsp. *damsela*'nın büyük miktarda sitolitik toksin ürettiği (Kreger, 1984) ve daha sonra bu toksinin güçlü hemolitik etkiye sahip damselizin (Dly)

olduğu tespit edilmiştir (Rivas ve diğerleri, 2011). *P. damsela*e subsp. *damsela*e için temel virulans faktör damselizindir. Damselizin sitotoksini bir fosfolipaz D'dir ve bu toksin koyun eritrositi membranına karşı aktif şekilde saldırması yanında balık eritrositlerine karşı da hemolitik aktivite göstermektedir (Kreger, 1984; Kreger ve diğerleri, 1987; Labella ve diğerleri, 2011). Diğer yandan Dly genine sahip olmayan dly-negatif *P. damsela*e subsp. *damsela*e izolatları da hayvanlar için virulans özellik gösterip homeoterm ve poikiloterm hücre sıraları için toksik etki göstermiştir (Osorio ve diğerleri, 2000a; Labella ve diğerleri, 2010b, 2017).

Yüksek sıcaklığa maruz kalan damselizinin hücre dışı ürünleri sitotoksik özelliğini kaybetmektedir (Labella ve diğerleri, 2010b). Ancak buna rağmen *Vibrionaceae* ailesinden gelen fosfolipaz toksin özelliği izlenmeye devam etmiştir (Labella ve diğerleri, 2011).

Rivas ve diğerleri (2011), yüksek hemolitik özellikteki izolatlarda ayrıca pPHDD1 adında bir plasmid tanımlamıştır. Bu plasmid Dly ve hemolizin A (HlyA) toksinleri için gen taşımakta ve onları kodlamaktadır. HlyA (HlyAch ve HlyApl) hücrede küçük delikler açabilen bir toksindir ve hemolizin aktivitesine sahiptir (Rivas ve diğerleri, 2015; Labella ve diğerleri, 2017).

HlyA ile Dly'nin etkileşime girmesi sonucunda eritrositlere karşı sinerjik bir etki oluştururlar. Bu durum balıklar üzerinde çok yüksek oranda virülens etki yaratmaktadır (Rivas ve diğerleri, 2013, 2015).

Dly geni olsun ya da olmasın virulent izolatların hücre dışı ürünleri balıklar için letal etki göstermektedir. Böylece Dly geni hem sıcak hem de soğukkanlı organizmalarda hücre sıraları için sitotoksiktir (Fouz ve diğerleri, 1993; Labella ve diğerleri, 2010b; Osorio ve diğerleri 2000b).

Son olarak iki alt tür arasındaki farklı hastalık yapma mekanizmasının temel sebeplerinden biri olarak *P. damsela*e subsp. *piscicida*'nın balık hücrelerine tutunabilirken, *P. damsela*e subsp. *damsela*e'nin ise balık mukusuna tutunabilme özelliğinde olması gösterilebilir (Magarinos ve diğerleri, 1996b; Khouadja ve diğerleri, 2014; Labella ve diğerleri, 2017).

2.4. Klinik Bulgular

*P. damsela*e etkenleri ile doğal yollarla infekte olan çipura (*Sparus aurata*) ve levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) derinin neredeyse tamamında hemorajiler ve yine derinin çeşitli yerleri ve kafa bölgesinde lezyonlar, yüzgeç diplerinde hemorajiler, pullarda kalkmalar, gözde bulanık bir görüntü ve karında şişkinlik izlenmektedir. Postmortem incelemede solungaç, böbrek ve dalakta hastalığın safhasına bağlı olarak konjesyon ya da solgunluk izlenirken, karaciğerin büyümüş ve abdominal boşluğun da sulu bir sıvıyla dolu olduğu izlenebilir. Bazı durumlarda ise kalp çevresinde hemoraji ve konjesyonlar gelişebilir (Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018). Bunun yanında etken çipura (*Sparus aurata*) ve levrekte (*Dicentrarchus labrax*) fingerling bireylerde yüksek mortalite ile beraber deri ülseri ve iskelet deformasyonları geliştirebilir (Essam ve diğerleri, 2016).

*P. damsela*e subsp. *piscicida* etkeninde kronik vakalarda, deride patognomonik lezyonlar, balığın yaşına bağlı değişen boyutta karaciğer, böbrek ve dalakta gri-beyaz granülomlar/tüberkül ve multifokal nekrozlar görülmekte ve bu oluşumlar balığın zayıflamasına ve ölümüne yol açmaktadır (Mladineo ve diğerleri, 2006; Liu ve diğerleri, 2011; Eissa ve diğerleri, 2018).

Akut vakalarda ise, abdominal boşlukta asidik, purulent bir sıvı, genişlemiş dalak, solgun ve konjestif kan damarlarıyla beraber genişlemiş karaciğer ve safra kesesi izlenmekte olup, genişlemiş safra kesesi septisemik oluşumlarda önemli rol oynamaktadır (Labella ve diğerleri, 2006). Hastalık genellikle larval dönemdeki balıkları etkilemekle beraber (mortalite %50-100), juvenil dönem balıklarda da %50'lere varan mortalite izlenebilir (Bakopoulos ve diğerleri, 1997).

*P. damsela*e subsp. *piscicida* ile infekte olan Atlantik mavi yüzgeçli orkinosta (*Thunnus thynnus*) karaciğer, böbrek ve dalak gibi farklı iç organlarda gri-beyaz granülomlar/tüberkül ve multifokal nekrozlar gelişebilir (Mladineo ve diğerleri, 2006). Senegal dil balığında (*Solea senegalensis*) hasta balıklarda deride koyu renk pigment değişimi, karında şişlik, karın içinde karaciğer ve böbrekte solgunluk ve dalakta beyaz tüberküller izlenebilir (Zorrilla ve diğerleri, 1999). Çizgili mercanda (*Pagrus auriga*) gözde ekzoftalmus ve deride koyulaşma, iç organlarda abdominal boşlukta asidik bir sıvı ve karaciğerde büyüme, solgunluk, konjestif kan damarları, büyümüş dalak ve dolu safra kesesi gibi bulgular gelişebilir (Labella ve diğerleri, 2006).

Deneysel olarak *P. damsela* subsp. *piscicida* ile infekte edilen levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) iştahta azalma, letarji, deride koyu pigmentasyon ve ölmek üzere olan balıklarda anormal yüzme davranışı gibi klinik bulgular izlenebilir. Dış bakıda enjeksiyon bölgesinde şiddetli hemoraji, abdomende ve anal açıklıkta şişkinlik, postmortem muayenede iç organlarda, bağırsak ve karaciğerde hemoraji, ayrıca tıkanmış safra kesesi gelişebilir (Essam ve diğerleri, 2016).

P. damsela subsp. *damsela* ile infekte olan fingerling levreklerde yüzgeç erozyonları ile birlikte vücudun genelinde ülser ve hemorojiler gibi bulgular izlenebilir. Anaç balıklarda deride koyulaşma, vücut üzerinde ve kafada hemorajik bölgeler ve erozyonlar, ayrıca solungaçlarda solgunluk izlenmektedir. İç organlarda büyümüş ve rengi koyulaşmış karaciğer ve dalak, dolu safra kesesi, abdominal boşlukta hemorajik alanlar, bağırsakta sarımsı bir sıvı gözlenebilir (Mahmoud ve diğerleri, 2018). Kültürü yapılan kobia balığında (*Rachycentron canadum*) hemorajilerle birlikte şişkin bir abdomen izlenmekte, karın içinde abdominal boşlukta sarı bir sıvı, hemorajik karaciğer ve böbrek göze çarpmaktadır (Krupesha Sharma ve diğerleri, 2017).

Yavru damsel balıklarında (*Pomacentrus similis*) *P. damsela* subsp. *damsela* izolatları ile oluşturulan deneysel infeksiyon ($3,0 \times 10^4$; $3,0 \times 10^3$; $3,0 \times 10^2$ CFU/balık) sonrasında ilk 3 gün balıklar semptom göstermemektedir. Enjeksiyon sonrası 4 ve 5. günler yem almada azalma ve 6. gün letarji, deride solgunluk ve ölmek üzere olan balıklarda anormal yüzme davranışı izlenebilir. Daha sonra 7. günden itibaren iki yüksek doz enjekte edilen balıklarda %100 kümülatif mortalite gelişebilir (Petchimuthu ve diğerleri, 2021).

2.5. Histopatolojik Bulgular

P. damsela subsp. *piscicida*'nın dokularda sebep olduğu histopatolojik etkisi levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) solungaçlarda hem primer hem de sekonder lamellerde izlenmektedir. Sekonder lamellerde kıvrılmalar, filamentlerde ödem, şiddetli lameller anevrizma ve goblet hücrelerde hiper aktivasyon gelişebilir. Karaciğer dokusunda fibröz bağ doku ile sarılmış nekrozlu alanlar, hepatositlerde ödem, vakuolleşmiş ve piknotik nükleuslar, ve hemorajik alanlarla ilişkili kan damarlarında hasarlar izlenmektedir. Böbreklerde fibröz bağ doku birikimi, yangı hücreleri ve renal tübüllerin epitel hücreleri içinde melanomakrofaj odaklar ile sarılı nekrotik alanlar gözlenir. Dalakta ise melanomakrofaj gelişimi ve kan damarı konjesyonu izlenebilir (Essam ve diğerleri, 2016).

Damsel balıklarında (*Pomacentrus similis*) doğal olarak gelişen *P. damsela* subsp. *damsela* infeksiyonunda böbrekte hematopoetik dokuda hiperplazi, melanomakrofaj merkezlerde artış, renal tübül epitel sıralarında nekroz ve glomerülonefrit gelişmektedir. Solungaçlarda hem primer hem sekonder lamellerde meydana gelen değişimlerde sekonder lamelde kıvrılmalar, lamellar füzyon ve hiperemi, ödem, konjesyon ve goblet hücre aktivasyonunda artış dikkat çekmektedir (Petchimuthu ve diğerleri, 2021).

Levrek (*Dicentrarchus labrax*), çipura (*Sparus aurata*) ve gri kefalde (*Mugil capitus*) doğal olarak gelişen *P. damsela* subsp. *damsela* (Eissa ve diğerleri, 2018) ve Atlantik mavi yüzgeçli orkinosta (*Thunnus thynnus*) gelişen *P. damsela* subsp. *piscicida* infeksiyonlarında (Mladineo ve diğerleri, 2006) benzer şekilde böbreklerde kan damarlarında konjesyon, renal tübüllerde nekroz, melanomakrofaj merkezlerde hiperplaziler gelişmektedir.

2.6. Teşhis

Balık kültüründe sıklıkla *P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela* etkenlerine bağlı salgınlar gelişebilmektedir. Bu salgınların hızlı teşhisi hastalığın yönetimi ve etkin kontrolü için oldukça önemlidir.

Hastalık teşhisi hastalık etkeninin izolasyonu ve identifikasyonu basamaklarından oluşmaktadır. Teşhis genellikle klasik mikrobiyolojik metotlar (API 20E kiti) kullanılarak yapılmakla beraber günümüzde çeşitli hızlı tanı yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bakteriyel izolatların teşhisinde sıklıkla kullanılan hızlı tanı yöntemleri arasında VITEC, VITEC MS, BD Phoenix hızlı tanı sistemleri ve moleküler teşhis yöntemleri yer almaktadır (Chatzigeorgiou ve diğerleri, 2011; Eissa ve diğerleri, 2018).

2.6.1. Klinik Muayene ve Bakteriyoskopi

Tanımlanmak istenen *Photobacterium* etkenleri öncelikle steril bir şekilde hastalık şüphesi olan balıktan doku örneği ile alınarak besi yerine ekilmektedir. Balık dokularından ekim yapılırken solungaç ve iç organlardan (karaciğer, böbrek, dalak) alınan doku veya sürme (svap) örnekleri kullanılmaktadır. Çalışılan balık örnekleri deniz balığına ait ise TSA ya da

kanlı agara besi yeri hazırlarken içine %1-10 oranında sodyum klorür (Na^+Cl^-) eklenmektedir (Osorio ve diğerleri 2000a; Essam ve diğerleri, 2016; Duman ve diğerleri, 2021).

Photobacterium damsela izolasyonunda doku örneklemede solungaç dokunun yüzeyinden aseptik şekilde açılan böbrek, dalak ve karaciğerden steril öze ya da pamuklu çubuk ile alınan numuneler %1-3 NaCl eklenerek hazırlanmış TSA, TSB (Triptik soy broth), BHI broth (Beyin kalp infüzyon broth) ya da BHIA'a ekilmektedir (Abu-Elala ve diğerleri, 2015; Eissa ve diğerleri, 2018; Petchimuthu ve diğerleri, 2021). Ayrıca alınan doku örnekleri alkalın peptonlu suda (%3 NaCl- pH 8,6) kültüre edilebilir ve sonrasında bakteri izolasyonuna gidilebilir (Mahmoud ve diğerleri, 2018). Diğer yöntemlerde ise solungaç ve iç organlar steril fosfat tamponlu salin solüsyonu (PBSS) içinde homojenize edildikten sonra %1 NaCl eklenmiş besi yerine (BHIA) ekilebilir (Essam ve diğerleri, 2016). İzolatlar 24-25°C'de 1-3 gün arasında inkübe edilir (Rivas ve diğerleri, 2011; Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013; Abu-Elala ve diğerleri, 2015; Eissa ve diğerleri, 2018).

Üreyen karışık kolonilerden saf kültürler elde etmek için TCBS ve kanlı agara ekim yapılmaktadır. Besi yerleri 24-27°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edilir. Biyokimyasal testlerde API 20E yöntemi kullanılabilir (Eissa ve diğerleri, 2018; Mahmoud ve diğerleri, 2018). TCBS'de küçük yeşil renkli üreyen koloniler (*P. damsela* subsp. *damsela*) saflaştırılmak üzere %2-3 tuzlulukta TSA'ya ekilir ve 27°C'de 24 saatte üremesi beklenir (Mahmoud ve diğerleri, 2018; Petchimuthu ve diğerleri, 2021). Kanlı agarda (%3 NaCl) *P. damsela* subsp. *piscicida*'nın küçük beyazımsı sarı non-hemolitik ve *P. damsela* subsp. *damsela*'nın küçük hemolitik koloniler şeklinde üremesi karakteristiktir (Rajan ve diğerleri, 2003; Rivas ve diğerleri, 2011; Magarinos ve diğerleri, 1996a; Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018).

TSA ya da kanlı agar kültüründen sonra Gram boyama yöntemiyle Gram (-), kokobasil görünümlü bipolar boyanan kısa çomaklar mikroskopta görülmektedirler (Buller, 2004; Eissa ve diğerleri, 2018).

Hareketlilik testi yapılabilir ve alt türler hareketsiz (*P. damsela* subsp. *piscicida*) ya da hareketli (*P. damsela* subsp. *damsela*) olarak birbirinden ayırt edilebilir (Dolapçlı, 2016; Essam ve diğerleri, 2016).

Saflaştırılmış koloniler biyokimyasal testler için kullanılır. Biyokimyasal testlerde oksidaz reaksiyonu, lizin dekarboksilaz (LDC), ornitin dekarboksilaz (ODC) üretimi, beta-

galaktosidaz reaksiyonu, nitratı nitrite indirgeme, glukozdan gaz üretimi ve üreaz reaksiyonu, mannitol, melibioz ve amigdalinin fermentasyonu test edilmektedir (Dolapçı, 2016).

2.6.2. Biyokimyasal Testler

Alt tür ayrımında şüpheli izolat biyokimyasal tanımlamada lizin dekarboksilaz (LDC), hareketlilik, TCBS agarda üreme ve üreaz üretimi gibi testlerden üç veya daha fazlasında pozitif sonuç vermişse *P. damsela* subsp. *damsela* olduğu sonucuna varılabilir, çünkü *P. damsela* subsp. *piscicida*'nın bütün izolatları LDC üretimi, hareketlilik, nitratı nitrite indirgeme, glukozdan gaz üretimi, TCBS'de üreme ve üreaz testlerinde negatif sonuç vermektedir (Thyssen ve diğerleri, 1998; Botella ve diğerleri, 2002; Andreoni ve Magneni, 2014; Petchimuthu ve diğerleri, 2021). Tablo 1'de *Photobacterium damsela*'nın alt türlerine ait morfolojik ve biyokimyasal özellikleri gösterilmiştir (Labella ve diğerleri, 2010a, 2010b, 2011; Osorio ve diğerleri, 2015; Mahmoud ve diğerleri, 2018; Eissa ve diğerleri, 2018).

Tablo 1. *Photobacterium damsela*'nın alt türlerinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.

Özellikler	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
Gram boyama	Gram (-) bipolar	Gram (-)
Hareketlilik testi	-	+
Katalaz testi	+	+
Oksidaz testi	+	+
O/129'a hassasiyet	+	+
TCBS Agarda üreme	-	+ küçük yeşil koloniler
TSA (%2,5 NaCl)'da üreme	+	+ soluk küçük koloniler
KA (%3 NaCl)'da üreme	Küçük gri non hemolitik koloniler	Beta hemoliz küçük koloniler
TSI Agarda üreme	+	Glukoz fermente, Laktoz ve Sükroz non fermente eder
BHIA (%3 NaCl)'da üreme	Küçük solgun birbirine yakın koloniler	Küçük solgun birbirine yakın koloniler
Nitrat indirgeme	-	+
Sitrat testi (CIT)	D	D
Gaz üretimi	-	+
Beta galaktosidaz (ONPG) testi	-	D
İndol testi	-	-
H ₂ S üretimi	-	-
Triptofan deminaz üretimi (TDA)	-	-
Amilaz testi	-	-
Asetoin üretimi (VP)	D	D
D-galaktoz Hidroliz	N	+
Lizin dekarboksilaz (LDC) testi	-	D
Ornitrin dekarboksilaz (ODC) testi	D	D
Arjinin dehidrolaz testi	+	+
Üreaz testi	-	D
Jelatinaz üretimi (GEL) Asit üretimi	-	-
Mannitol fermentasyonu	D	D
Melibiyoz fermentasyonu	D	D
Amigdalin fermentasyonu	+	D
Glukozdan asit üretimi (GLU)	+	+
İnositolden asit üretimi (INO)	-	-
Sorbitolden asit üretimi (SOR)	-	-
Arabinozdan asit üretimi (ARA)	D	-
Sukrozdan asit üretimi	-	-
Rhaminozdan asit üretimi	D	-

D: değişkenlik gösteren veri, N: veri yok

2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tanısı

Günümüzde zaman alıcı laboratuvar prosedürlerinin üstesinden gelebilmek için moleküler metotlar geliştirilmiştir. Bu moleküler metotlardan biri olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) DNA'nın belli bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan önemli bir moleküler teşhis yöntemidir (Kralik ve Ricchi, 2017). Bu yöntem 1990'lı yılların başından beri balık hastalıklarının teşhisinde kullanılan tekniklerden biridir. Ayrıca hızlı, doğru ve spesifik bir teşhis yapabilmeye de olanak sağlamaktadır (Romalde, 2002; Altınok ve Kurt, 2003; Andreoni ve Magneni, 2014).

Günümüzde balık patojenlerinin pek çoğunda kullanıldığı gibi *P. damsela* teşhisinde de PCR yaygın şekilde kullanılmaktadır. *P. damsela* üzerine yapılmış 16S rRNA sekans analizlerine göre, *P. damsela* subsp. *damsela* ve *P. damsela* subsp. *piscicida* birbiri ile tam bir homologluk göstermektedirler (Osorio ve diğerleri, 2000b; Ho ve diğerleri, 2011). Bu benzerlik sebebiyle tür seviyesinde teşhis, 16S rRNA sekans dizilimleri kullanılarak geliştirilen PCR metodu ile pratik şekilde yapılabilmektedir (Osorio ve diğerleri, 1999; Andreoni ve Magneni, 2014). Ancak alt tür ayırımında üreaz geni (URE C) karşımıza çıkmaktadır ve bu gen *P. damsela* subsp. *damsela* genomunda bulunurken *P. damsela* subsp. *piscicida* genomunda ise bulunmamaktadır (Osorio ve diğerleri, 1999; Essam ve diğerleri, 2016). Böylece multipleks PCR yöntemi ile 16S rRNA ve URE C geni hedeflenerek *P. damsela* alt türleri teşhis edilebilmektedir (Osorio ve diğerleri, 2000a; Rajan ve diğerleri, 2003; Andreoni ve Magneni, 2014).

Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda Photobacteriosis teşhisinde enzim immün testi (EIA) ile poliklonal antikorların hedef alındığı testler (Romalde ve diğerleri, 1999), Pbp- 1A geni ve URE C geni hedeflenerek geliştirilen multipleks PCR yöntemi (Amagliani ve diğerleri, 2009), PCR-RFLP metodu ile GenBank AY191120, AY191121 sekansları hedef alınarak tasarlanan ve alt türlerin tanımlanmasına yönelik yöntemler de çalışılmıştır (Zappulli ve diğerleri, 2005; Andreoni ve Magneni, 2014).

Yapılan bir çalışmada moleküler teşhiste alt türlerin ayırımı için PCR'ın ilk safhasında, forward primer CAR1 (*Escherichia coli* 16S rRNA geninde 18-mer; 5'-GCTTGAAGAGATTCGAGT-3'; pozisyon 1016'dan 1033'e) ve reverse primer CAR2 (1266'dan 1283 pozisyonunda, 18-mer; 5'-CACCTCGCGGTCTTGCTG-3') geliştirilmiştir. Bu primerlerin diziliminde 16S rRNA geninin 267 baz çiftlik (bp) parçası kullanılmıştır.

PCR'in ikinci kısmında nested PCR kullanılmış olup, primer Car1 forward primer olup reverse primer Nestcar1 (17-mer; 5'-GGTCTTGCTGCCCTCTG-3'; 1259'ten 1275 pozisyonunda) ile 259 bp parçalı bir sıra oluşturulmuştur. Bir internal fragment olarak 18-mer; 5'-TACAATGGCATATACAGA-3'; 1245'ten 1262'ye pozisyonunda dizayn edilmiştir ve digoxigenin ile işaretlenmiştir. *P. damsela* subsp. *piscicida*'nın, saf DNA ile çoğaltılması için CAR1 ve CAR2 primerleri kullanıldığında 267 baz çiftlik PCR ürünleri elde edilmiştir. PCR'in ikinci kısmında (nested PCR) daha ileri sonuçlar elde edilememiş ancak bantların yoğunluğunun arttığı bildirilmiştir (Osorio ve diğerleri, 1999).

Diğer bir çalışmada iki alt türün ayrımı için multipleks-PCR analizinde URE C geni için Gen Bank'tan 448 baz çifti uzunluğundaki *P. damsela* subsp. *damsela*'nın forward primeri URE-5' (20-mer 5'-TCCGGAATAGGTAAAGCGGG-3') ve reverse primer URE-3' (22-mer 5'-CTTGAATATCCATCTCATCTGC-3') parçaları dizayn ettirilmiştir. 16S rRNA geni için forward primer CAR1 ve reverse primer CAR2, ve *P. damsela* subsp. *piscicida*'nın ATCC 29690 izolatının 16S rRNA geninin 267 baz çiftlik kısmı, multipleks PCR reaksiyonunda URE-5' ve URE-3' ile konjugasyon oluşturması için kullanılmıştır. *P. damsela* subsp. *damsela*'nın 267 baz çiftlik bandı 16S rRNA, 448 baz çiftlik bandı URE C genine ilişkindir ve bant oluşumu gözlenmiştir. Diğer yandan *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatlarında yalnızca 267 baz çiftlik 16S rRNA'ya ilişkin parçanın ürettiği, URE C geninin üremediği bildirilmiştir (Osorio ve diğerleri, 2000a).

Bir diğer çalışmada Gen Bank'tan *P. damsela* subsp. *piscicida*'nın kapsüler polisakkarit geni için 410 baz çiftlik parçası forward primeri 20 nukleotidlik olup CPSF 5'-AGGGGATCCGATTACTG-3' ve 20 nukleotidlik reverse primer CPSR 5'-TCCATTGAGAAGATTTGAT-3' tasarlanmıştır (Rajan ve diğerleri, 2003).

Multipleks PCR yöntemi kullanılan başka çalışmalarda primerlerin sekansları 16S rRNA geni ile tür-spesifik *P. damsela* ele alınarak tasarlanmış olup, CAR1 primeri, CAR2 primeri parça boyutu 267 baz çifttir. URE C geni için yine tür spesifik olarak *P. damsela* subsp. *damsela* ele alınmıştır. Primerler URE-5' ve URE-3', 448 baz çifti boyundadır. 16S rRNA tür spesifik PCR koşulları 95°C'de 4 dakika ön denatürasyonu takiben 30 siklus olmak üzere 95°C'de 1 dakika ön denatürasyon, 60°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 40 saniye uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama aşamaları şeklinde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak *Photobacterium damsela* için 267 baz çifti büyüklüğündeki bant oluşumu gözlenmiştir (Osorio ve diğerleri, 2000a; Essam ve diğerleri, 2016).

Bir diğerk moleküler çalışmada kapsüler polisakkarit geni (CPS) ve üreaz geni (URE C) eşleşmesi çalışılmıştır. Primer olarak CPS 5' ve CPS 3' (Rajan ve diğerkleri, 2003), URE-5' ve URE-3' sekansları (Osorio ve diğerkleri, 1999) kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, kapsüler polisakkarit geni iki alt türde de izlenmiştir. URE C gen primerlerinde çoğalma ise yalnızca *P. damsela* subsp. *damsela*'da izlenmiştir. Kapsüler polisakkarit geni agaroz jelde 410 baz çiftlik gen ürünü çoğaltırken, URE C geni 448 baz çifti boyutunda çoğalmıştır. Tür spesifik kapsüler polisakkarid geni (CPS) için PCR koşulları 94°C'de 5 dakika ön denatürasyonu takiben 35 siklus olmak üzere 94°C'de 30 saniye ön denatürasyon, 55°C'de 30 sn bağlanma, 72°C'de 1 dk uzama ve 72°C'de 7 dakika son uzama aşamaları şeklinde gerçekleştirilmiştir. *Photobacterium damsela* alt tür spesifik üreaz geni için PCR koşulları 95°C'de 4 dakika ön denatürasyonu takiben 30 siklus olmak üzere 95°C'de 1 dakika ön denatürasyon, 60°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 40 saniye uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama aşamaları şeklinde gerçekleştirilmiştir (Eissa ve diğerkleri, 2018).

2.7. Tedavi

2.7.1. Antibiyotikler

Balık költüründe salgınlara karşı mücadelede geliştirilen kontrol yöntemleri içinde ilk sırayı aşılama yöntemi almaktadır. Ancak aşılamanın başarısız olduğu ve hastalıkların yine de geliştiği durumlarda devreye antibiyotikler girmektedir (Andreoni ve Magneni, 2014).

Yapılan alışmalar göstermiştir ki *P. damsela* subsp. *piscicida* etkeninde kanamisin, sulfonamid, tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol, florfenikol ve eritromisine karşı direnç göstermesini sağlayabilen hareketli genetik elementler (R plasmidler) bulunmaktadır. Ayrıca farklı coğrafyalarda antibiyotiklere direnç kazanmaya yol açan farklı genetik elementler de mevcuttur. Bu durum farklı izolatların farklı direnç mekanizmasına sahip olduğunu açıklayabilir (Kim ve diğerkleri, 2008; Del Castillo ve diğerkleri, 2013). Ayrıca, *P. damsela* subsp. *piscicida* konakısında makrofaj içinde bulunması ve intraselüler parazit gibi davranması nedeniyle kemoterapinin etkisini zayıflatmaktadır (Andreoni ve Magneni, 2014).

P. damsela subsp. *piscicida*'ya karşı kullanılan antibiyotiklere bakıldığında izolatlar kloksasilin (5 µg) (%85,7), sefoperazon (5 µg), ampisilin (10 µg) (Parın ve diğerkleri, 2016), eritromisin (15 µg) ve spektinomisine (10 µg) karşı dirençli olduğu izlenmiştir (Eissa ve

diğerleri, 2018). Diğer yandan oksitetrasiklin (30 µg) (Parın ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018), enrofloksasin (5 µg), florfenikol (30 µg) (Parın ve diğerleri, 2016), ampisilin (10 µg), siprofloksasin (5 µg), novobiosin (30 µg) ve linkomisine (2 µg) (Eissa ve diğerleri, 2018) karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir.

*P. damsela*e subsp. *damsela*e izolatları trimetoprim-sulfametoksazol (1,25+23,7 µg), oksolinik asit (10 µg), nitrofurantoin (300 µg) (Labella ve diğerleri, 2011) ve siprofloksasine (5 µg) (Eissa ve diğerleri, 2018) karşı duyarlı bulunmuştur. Öte yandan eritromisin (15 µg), oksitetrasiklin (30 µg), novobiosin (30 µg) (Labella ve diğerleri, 2011; Eissa ve diğerleri, 2018), tetrasiklin (30 µg), streptomisin (10 µg), amoksisilin (25 µg) (Labella ve diğerleri, 2011), spektromisin (10 µg), linkomisin (2 µg) ve ampisiline (10 µg) (Eissa ve diğerleri, 2018) karşı dirençli olduğu izlenmiştir.

2.8. Kontrol

2.8.1. Aşılar

Günümüzde *P. damsela*e subsp. *piscicida* ve *P. damsela*e subsp. *damsela*e'ya karşı kontrol amaçlı çeşitli karma aşilar bulunmakla beraber çeşitli çalışmalarda bazı yeni spesifik aşı denemeleri de mevcuttur. *P. damsela*e subsp. *piscicida* için mevcut konvansiyonel aşilar inaktif yapıda olup ya immersiyon (LPS-lipopolisakkarit ve ribozomal yapıda çözünebilir antijenler) ya da enjeksiyon yöntemiyle (ısı ve formaline maruz kalan hücresel yapıda ölü bakteri) uygulanmaktadır (Andreoni ve Magnani, 2014). Tavsiye edilen aşı protokollerinden biri larval dönemden (50 mg) itibaren aylık aralıklarla iki banyo (immersiyon) ve bunu balık 2 g vücut ağırlığına ulaştığında bir adet oral yolla bağışıklık arttırıcı doz uygulaması şeklindedir. Bu aşılama yönteminde İspanya, Portekiz ve Yunanistan başarılı sonuçlar elde etmiştir (Romalde, 2002; Andreoni ve Magnani, 2014).

*Photobacterium damsela*e subsp. *piscicida*'ya karşı geliştirilen çeşitli aşılarından formalinle öldürülmüş bakterin, ECP, ve ham kapsüler polisakkarid (cCPS) enjeksiyon, immersiyon ve oral yolla levrekte (*Dicentrarchus labrax*) uygulanmıştır. Ayrıca *Photobacterium damsela*e banyo yöntemi ile tek doz uygulanmıştır. Besleme yoluyla ise *P. damsela*e hücresi ve ekstrasellüler ürünler farklı aşilar olarak verilmiştir. Buna göre *P. damsela*e hücreleri ile hazırlanan aşı ile %64 oranında koruma sağlanırken, ekstrasellüler

ürünlerle hazırlanan aşı ile %55 koruma sağlanmıştır (Bakopoulos ve diğerleri, 2003). Bir diğer inaktif aşı ile OMP (dış membran proteini) ve ECP proteinlerini fazlaca üreten ve formalinle öldürülmüş bakterinle hazırlanan aşı, immersiyon yoluyla levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve sarı kuyruk balığında (*Seriola quinqueradiata*) başarılı sonuç vermiştir. Elde edilen sonuçlara göre aşı solungaç ve mukozada etkileşime geçip buralarda güçlü antikor yanıtları oluşturmuş ve bunun sonucu buralardan patojenin vücuda girişi ve bu bölgelerde kolonize olmasının engellenmiş olabileceği düşünülmüştür (Barnes ve diğerleri, 2005; Andreoni ve Magneni, 2014). Pasteurellosise karşı geliştirilen ECP zenginleştirilmiş bakterin ile hazırlanan aşı immersiyon yoluyla çipuralarda (*Sparus aurata*) kullanılmıştır. Bu balıklarda 0,5 ve 2 g arasındaki balıklarda uygulanması sonucunda %75'den daha fazla hayatta kalma izlendiği bildirilmiştir (Hastein ve diğerleri, 2005).

Deneysel aşılar, aktif canlı attenü aşı tipi olan aroA mutant enjeksiyon veya immersiyon yoluyla hibrid çizgili levrekte (*Morone saxatilis*) uygulanmıştır. Sonuçlara göre aşı %85 oranında başarıya ulaşmıştır (Thune ve diğerleri, 2003). Diğer deneysel aşılar, rekombinant subunit aşı tipinde, lipoproteinler enjeksiyon yoluyla levreklerde uygulanmış ve başarılı bir sonuç elde edilmiştir (Andreoni ve diğerleri, 2013). Başka bir aşı çalışmasında rHSP60, rENOLASE ve rGAPDH antijenleri, ayrı veya kombinasyon halinde enjeksiyon yoluyla kobiada (*Rachycentron canadum*) uygulanmıştır. Sonuçlara göre bivalent antijen şeklinde uygulanan aşıların (rHSP60+rENOLASE, rENOLASE+rGAPDH, rHSP60+rGAPDH) %65,6'ya varan başarılı sonuçlar verebileceği sonucuna varılmıştır (Ho ve diğerleri, 2014).

Bu çalışmada çipura ve levrek yetiştiriciliği için önemli bir tehdit olan *P. damsela* ve alt türlerinin moleküler yöntemlerle teşhisi ve antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının ortaya koyulması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örnekleme

Bu çalışma için yapılan örneklemede Ege Denizi'nin güney kesiminde kıyı şeridinde konumlanmış olan kültür balıkçılığı işletmelerinden yararlanıldı. Örneklemede hem kafes hem de tank sistemlerinde yetiştiriciliği yapılan çipura ve levrek türlerinden farklı boylarda ve *Photobacterium damsela* şüpheli doğal infekte yeni ölmüş balıklar kullanıldı. Çalışmada örneklenen balıklar 100 adet çipura (*Sparus aurata*) ve 100 adet levrekten (*Dicentrarchus labrax*) oluşmuştur. Örnekleme su sıcaklığının yükselmeye başladığı ve yüksek seyrettiği Haziran-Eylül (2018-2019), Eylül (2021) aylarında gerçekleşmiştir. Örneklemede kullanılan çipuraların ağırlığı 0,20-110 g aralığında levreklerin ise 0,20-114 g aralığında ölçülmüştür.

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Solüsyon ve Araçlar

3.1.2.1. Besiyerleri

Hastalık şüpheli balıklardan alınan doku örneklerinden kültür için Triptik Soy Agar (TSA) (Merck 105458) ve Kanlı agar (Merck® 1.10886), karışık üreyen kolonileri tek düşürmek için TSA, Gram boyama ve biyokimyasal testler sonucunda PCR testinde kullanılacak izolatları zenginleştirme için yine TSA ve antibiyogram testi için Mueller-Hinton agar besi yerleri kullanılmıştır.

3.1.2.2. Gram Boyama

Gram boyama besi yerinde tek düşürülen ve küçük ve sarımsı beyaz renkli *P. damsela* şüpheli kolonileri tanımlamak için kullanıldı. Gram boyama kristal violet, lügol ve sulu fuchsin solüsyonlarından oluşmaktadır.

3.1.2.3. Biyokimyasal Testler

*P. damsela*e şüpheli kanlı agar ve TSA'da üreyen, Gram (-) ve bir kısmı bipolar görünümüne sahip izolatlara katalaz testi ve oksidaz testleri yapılmıştır.

3.1.2.4. BD-Phoenix™ ID/AST Broth

Saflaştırılmış şüpheli izolatların her biri için 1 adet BD Phoenix ID broth (NMIC/ID433) kullanılmıştır.

3.1.2.5. Solüsyonlar

3.1.2.5.1. 50x TAE (Tris, Asetik asit, EDTA) Elektroforez Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific ®)

1X TAE Kullanma Solüsyonu

Tris Base 40 mM

Asetik Asit 20 mM

EDTA 1 mM

1X TAE Kullanma Solüsyonu Hazırlanışı

50X TAE 10 ml

Distile su 490 ml

Karıştırılarak solüsyon hazırlanmıştır.

3.1.2.5.2. 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific ®)

Tris-HCl 10 mM, bromfenol mavisi %0,003, xilen cyanol FF %0,03, gliserol %60, EDTA 60 mM

3.1.2.5.3. Tris/EDTA (TE) buffer (Thermo Fisher Scientific®)

Tris 10mM

EDTA 1 mM

Distile Su 1000 ml

Karışım kullanıma hazır solüsyon halindedir.

3.1.3. BD Phoenix™ M50 Otomatize İdentifikasyon Sistemi

BD Phoenix, bir kültür ve antibiyogram tanımlama sistemidir. Bu çalışmada TSA'da üreyen saf kolonilerin identifikasyonlarının yapılması için, örnekler BD Phoenix™ M50 otomatize identifikasyon sistemi cihazına yüklenmiş ve sonuçları kaydedilmiştir.

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.1.4.1. DNA Ekstraksiyonu

P. damsela şüpheli izolatların DNA ekstraksiyonu için kaynatma yöntemi uygulanmıştır.

3.1.4.2. ExPrime Taq Premix (2X)

ExPrime Taq DNA Polymerase (1 U/10 µl),

Reaksiyon buffer,

Enzim stabilizatörü,

dNTPmix,

MgCl₂.

3.1.4.3. Primerler

Bu çalışmada *Photobacterium damsela* tür spesifik PCR için kullanılan 16S rRNA ve CPS genlerine ait primer dizimleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. *Photobacterium damsela* türü için 16S rRNA ve CPS gen primerleri.

Primerler	Primer dizilimi	Hedef Bölge	Kaynak
16S rRNA CAR1 F	5'-GCT TGA AGA GAT TCG AGT-3'	267 bp	Osorio ve diğerleri, 2000a
16S rRNA CAR2 R	5'-CAC CTC GCG GTC TTG CTG-3'		
CPS F	5'-AGG GGA TCC GAT TAT TAC TG-3'	410 bp	Eissa ve diğerleri, 2018
CPS R	5'-TCC CAT TGA GAA GAT TTG AT - 3'		

Photobacterium damsela subsp. *damsela* alt tür spesifik PCR için kullanılan üreaz enziminin bir alt birimini kodlayan URE C genidir (Terceti ve diğerleri, 2016). Spesifik primer dizimleri Eissa ve diğerleri (2018)’nin çalışmasında belirtildiği gibidir. Bu çalışmada kullanılan URE C genine ait primer dizilimi Tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 3. *P. damsela* subsp. *damsela* spesifik URE C geni için primer dizimleri.

Primerler	Primer dizilimi	Hedef Bölge	Kaynak
URE C F	5'-TCC GGA ATA GGT AAA GCG GG-3'	448 bp	Eissa ve diğerleri, 2018
URE C R	5'-CTT GAA TAT CCA TCT CAT CTG C - 3'		

3.1.4.4. Agaroz Jel

Agaroz jel hazırlanmasında Biomax® marka agaroz kullanılmıştır.

3.1.4.5. Marker

Marker olarak GeneRuler 100 bp'lik DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific®) kullanılmıştır.

3.1.4.6. Etidium Bromür (AppliChem®)

Görüntüleme için jelin boyanmasında elektroforez işleminden önce %1' lik Ethidium Bromür 100 ml 1X TAE ile hazırlanan %2' lik agaroz jelin içerisine 3 µl miktarında eklenerek kullanılmıştır.

3.1.5. Kullanılan Cihazlar

3.1.5.1. Block Heater Cihazı

DNA ekstraksiyonu aşamasında SBH 130D (Stuart®) cihazı kullanılmıştır.

3.1.5.2. Santrifüj Cihazı

Santrifüj işlemleri için 24 örnek kapasiteli Mikro 200R (Hettich®) santrifüj cihazı kullanılmıştır.

3.1.5.3. Termal Döngüleme Cihazı

PCR işlemi 96 örnek kapasiteli Prima-Trio (Himedia®) termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.1.5.4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Biorad® marka elektroforez tankında gerçekleşti. Güç kaynağı olarak Thermo Fisher Scientific® EC250-90 kullanılmıştır.

3.1.5.5. Görüntüleme Cihazı

Görüntüleme işlemi Vilber Lourmat® marka Infinity VX2 1100 marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.1.5.6. Saflaştırılmış PCR Ürünü Ölçüm Cihazı

PCR ürünlerinin saflaştırma işleminden sonra DNA miktarlarının ölçülmesi amacıyla Nanodrop (MAESTROGEN®) marka spektrofotometrik cihaz kullanılmıştır.

3.1.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

P. damsela subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela* türlerinin antibiyotik duyarlılığı testi için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi için 8 adet antimikrobiyal diskten yararlanılmıştır. Bunlar sulfametoksazol-trimetoprim (SXT), sefotaksim (CTX), amoksisilin-klavulanik asit (AMC), gentamisin (CN), ampisilin (AMP), siprofloksasin (CIP), tetrasiklin (TET) ve seftizoksim (ZOX)'dir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklenme

Çalışmada kullanılan doğal infekte *Photobacterium damsela* şüpheli yeni ölmüş balıklar kafes sisteminde ise kafes içine ıgırıp atılarak ya da tank ortamında ise tanka kepçe daldırılarak toplanmış ve soğuk zincir altında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Teşhis Laboratuvarı'na getirilmiştir.

Laboratuvar alışmaları öncesinde yeni ölmüş balıklarda vücudun dış yüzeyi makroskopik olarak incelenip değerlendirilip, yüzgelerde aşınma, solungaçlarda solgunluk ya da hemoraji, deride hemoraji, pigment değişimi (kararma), lezyon, ülser ya da pullarda kalkmalar, baş bölgesinde erozyon, karında şişkinlik, gözde ekzoftalmus varlığı incelenmiştir. Sonrasında anüsten başlayıp solungaç yönünde kesilerek açılan karında abdominal boşlukta büyümüş solgun karaciğer, dolu/tıkanmış safra kesesi, dalak ve böbrekte hem büyüme hem de gri beyaz granülamatoz benzeri yapılar ve kalpte hemoraji varlığı kontrol edilmiş ve bu değişimler gözlendiğinde not edilmiştir (Balebona ve diğerleri, 1998b; Magarinos ve diğerleri, 2001; Korun ve Timur, 2005; Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013; Essam ve diğerleri, 2016; Mahmoud ve diğerleri, 2018).

3.2.2. *Photobacterium damsela* İzolasyonu

Laboratuvara getirilen klinik olarak *Photobacterium damsela* şüpheli doğal infekte ölü balıkların öncelikle karnı aseptik şekilde açılmıştır. Ekim yapılırken balığın yaşına ve boyuna bağlı olarak eğer balıklar büyükse steril eküvyon çubuğu ile iç organların (dalak, karaciğer, böbrek) üzerinden ya da steril olarak kesik atılan organın iç kısmından doku örneği alınarak besi yerine ekilmiştir. Eğer balıklar küçükse steril bir şekilde penset ve makas yardımıyla çıkarılan iç organlar (dalak, karaciğer, böbrek) yine steril olan 2 adet lam arasında iyice ezilip homojen hale getirilerek eküvyon çubuğu yardımıyla %1 NaCl eklenmiş triptik soy agara ve hem %1 NaCl hem de %5 koyun kanı eklenmiş kanlı agara ekilerek 25°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda üreyen kolonilerin morfolojileri ve saflık dereceleri kontrol edilmiştir. *P. damsela* şüpheli saf kültürler Gram boyama metodu ile boyanmıştır. Gram negatif bipolar boyanan çomaklara katalaz testi uygulanmıştır. Test sonucu pozitif çıkan suşlara ise oksidaz testi uygulanmıştır. Hem katalaz hem de oksidaz pozitif *Photobacterium damsela* suşları moleküler tanımlama yöntemi için yeniden pasajlanarak etüve kaldırılmıştır (Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018).

3.2.3. Gram Boyama

Triptik Soy Agar ve kanlı agarda üreyen koloniler Gram boyama tekniği ile boyanmıştır. Gram boyama için bir damla fizyolojik tuzlu su (FTS) damlatılmış bir lam üzerine morfolojik olarak *Photobacterium damsela* şüpheli koloniler alınarak homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan lam oda sıcaklığında kurutulduktan sonra ateşte fikze edilmiştir. Tespit edilmiş ve soğumuş preparat üzerine öncelikle Kristal violet solusyonu damlatılmış ve 2 dakika boyanması için beklenmiştir. Sonrasında boya dökülüp ve preparat üzeri lugol solusyonu ile kaplanmış ve 1 dakika beklenmiştir. Preparat üzerine %95'lik etil alkol karışımı eklenerek 10-15 saniye beklenmiş ve preparat distile su ile yıkanmıştır. Ardından preparat üzerine sulu fuksin çözeltisi eklenmiş ve 30 saniye beklenmiştir. Sonrasında preparat bol distile su ile yıkanıp fazla boyası giderilmiş ve kurutma kağıdı yardımıyla kurutulmuştur. Boyanan preparatlar ışık mikroskobu altında 100x objektif ile değerlendirilmiştir (Arda, 1997).

3.2.4. Biyokimyasal Testler

Gram boyama sonucunda Gram negatif ve bir kısmı ya da hepsi bipolar çomaklar halinde izlenen izolatlar tür tayini için biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur.

Katalaz testi için %3'lük hidrojen peroksit çözeltisinden bir damla lama damlatılmış ve daha sonra şüpheli koloniden öze ucu ile alınan örnek bu damla ile karıştırılıp izlenmiştir. Bakteri kolonisi baloncuklar çıkararak tepkime verdiğinde, katalaz pozitif olduğu sonucuna varılmıştır.

Oksidaz testi, sitokrom C oksidaz enzimi varlığını göstermek için yapılan bir biyokimyasal testtir. Hazır test kitine öze ucu ile alınan şüpheli koloni temas ettirilmiş ve 20 ile 60 saniye içinde sonuç vermesi beklenmiştir. Mavi renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Bakteriye İzolatların BD Phoenix ile İdentifikasyonu

Bu yöntem birçok aerobik ve fakültatif anaerobik Gram negatif ve pozitif bakterinin hızlı şekilde tanımlanmasını ve duyarlılık testlerinin yapılmasını sağlamaktadır. Gram boyama işlemi sonucunda Triptik soy agarda üreyen saf koloniler BD Phoenix™ 50 otomatize identifikasyon cihazına yüklenerek identifikasyonu yapılmıştır. Triptik soy agarda üreyen taze kültürler cam tüplerde hazır bulunan ID broth içine alınarak McFarland 0,5 koloni yoğunluğuna göre vortekslenerek süspansiyon hale getirilmiştir. Bakteri teşhisi için, her bir örnek için ayrı ayrı hazırlanmış olan ID Broth süspansiyon tüpleri, her bir örnek için ayrı paneller (BD Phoenix NMIC/ID433) kullanılarak cihaza yerleştirilmiştir. Cihazdan elde edilen biyokimyasal identifikasyon verileri ile identifikasyon sonuçları değerlendirmeye alınmıştır.

3.2.6. Gliserinli Besi Yeri

Photobacterium damsela izolatları moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C’de derin dondurucuya kaldırılmıştır. Bu izolatlar dondurucuya kaldırılmadan önce %1 NaCl ve %15 gliserin içeren triptik soy broth besiyerine geçilmiştir.

3.3. DNA Ekstraksiyonu

Balık dokularından identifiye edilen *Photobacterium damsela* izolatlarının DNA ekstraksiyonları yapılmıştır. DNA ekstraksiyonu için TSA’ya pasajlanmış 24 saatlik koloniler kullanılmıştır. Ekstraksiyon kaynatma yöntemi ile yapılmıştır. Elde edilen DNA’lar hemen kullanılacaksa +4°C’de buzdolabında ya da daha sonra kullanılacaksa -20°C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Ekstraksiyon işleminde TSA’da üretilen 24 saatlik *Photobacterium damsela* izolatlarından bir öze dolusu koloni alınarak önceden içine 500µl distile su eklenmiş eppendorf tüpü içine aktararak homojen bir görünüm sağlanana kadar vortekslenmiştir. Hazırlanan eppendorf tüpler termal bloğa yüklenmiş ve 100°C’de 20-30 dakika süreyle ısıtılıp kaynatılmıştır. Kaynatma işleminden sonra süspansiyonlar 14000 devirde 4-5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst sıvılar ayrı bir eppendorf tüpe toplanarak

elde edilen DNA'lar PCR işlemlerinde kullanılmak üzere -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4. *Photobacterium damsela* ve Alt Türlerinin PCR ile İdentifikasyonu

3.4.1. 16S rRNA Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti

Photobacterium damsela türünün teşhisinde kullanılan 16S rRNA genine ait PCR karışım oranları Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. *Photobacterium damsela* 16S rRNA geni PCR karışım oranları.

Malzeme	İstenen son miktar µl
Master Miks (2x)	12,5 µl
16S Primer F Car 1 (50 pmol)	1 µl
16S Primer R Car 2 (50 pmol)	1 µl
Template DNA	2 µl
ddH ₂ O	8 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,5 µl
TOPLAM	25 µl

Karışım içinde 2x master miksten 12,5 µl, her bir primerden 1 µl (50 pmol), MgCl₂ (50 mM)'den 0,5 µl, deiyonize su-ddH₂O'dan 8 µl, template (hedef) DNA'dan 2 µl bulunmaktadır (Eissa ve diğerleri, 2018).

PCR basamakları, 95°C'de 5 dakika 1 siklus ön denaturasyon, akabinde 30 siklus olacak şekilde 95°C'de 1 dakika denaturasyon, 60°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 40 saniye uzama, 72°C'de 5 dakika son uzama 1 siklus ve 4°C'de sonsuz süreyle bekletme aşaması şeklindedir (Tablo 5).

Tablo 5. *Photobacterium damsela*e 16S rRNA geni PCR ısıl döngü ve süreleri.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç	1	95°C	5 dk
Denatürasyon			
Denatürasyon		95°C	1 dk
Bağlanma	30	60°C	1 dk
Uzama		72°C	40 sn
Son Uzama	1	72°C	5 dk
Bekletme	-	4°C	∞ dk

3.4.2. Kapsüler Polisakkarit (CPS) Geninin PCR Yöntemi ile Teşhisi

*Photobacterium damsela*e'nin iki alt türünde de bulunan ve tür teşhisinde kullanılan kapsüler polisakkarit genine (CPS) ait PCR karışımı Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. *Photobacterium damsela*e CPS geni PCR karışım oranları.

Malzeme	İstenen son miktar µl
Master Mix (2x)	12,5 µl
CPS F (20 pmol)	1 µl
CPS R (20 pmol)	1 µl
Template DNA	2 µl
ddH ₂ O	8 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,5 µl
TOPLAM	25 µl

Karışım içinde 2x master miktardan 12,5 µl, her bir primerden 1 µl (20 pmol), MgCl₂ (50mM)'den 0,5 µl, deiyonize su-ddH₂O'dan 8 µl, template (hedef) DNA'dan 2 µl bulunmaktadır (Eissa ve diğerleri, 2018).

PCR basamakları, 94°C'de 5 dakika 1 siklus ön denaturasyon, akabinde 35 siklus olacak şekilde 94°C'de 30 sn denaturasyon, 55°C'de 30 sn bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama, 72°C'de 7 dakika son uzama 1 siklus ve 4°C'de sonsuz süreyle bekletme aşaması şeklindedir (Tablo 7).

Tablo 7. *Photobacterium damsela*e CPS geni PCR ısıl döngü ve süreleri.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç	1	94°C	5 dk
Denatürasyon			
Denatürasyon		94°C	30 sn
Bağlanma	35	55°C	30 sn
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	7 dk
Bekletme	-	4°C	∞ dk

3.4.3. Üreaz (URE C) Geninin PCR Yöntemi ile Teşhisi

*Photobacterium damsela*e subsp. *damsela*e alt türüne has bir gen olan üreaz genini (URE C) belirlemek için hazırlanan moleküler analiz karışımı Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. *Photobacterium damsela*e subsp. *damsela*e URE C geni için PCR karışım oranları.

Malzeme	İstenen son miktar µl
Master Mix (2x)	12,5 µl
URE C F (50 pmol)	1 µl
URE C R (50 pmol)	1µl
Template DNA	1 µl
ddH ₂ O	9 µl
MgCl ₂ (25 nm)	0,5 µl
TOPLAM	25 µl

Karışım içinde 2x master miskten 12,5 µl, her bir primerden 1 µl (50 pmol), MgCl₂ (25 nm)’den 0,5 µl, deiyonize su-ddH₂O’dan 9 µl, template (hedef) DNA’dan 1 µl bulunmaktadır (Eissa ve diğerleri, 2018).

PCR basamakları, 95°C’de 7 dakika 1 siklus ön denaturasyon, akabinde 35 siklus olacak şekilde 95°C’de 30 saniye denaturasyon, 60°C’de 30 saniye bağlanma, 72°C’de 1 dakika uzama, 72°C’de 7 dakika son uzama 1 siklus ve 4°C’de sonsuz süreyle bekletme aşaması şeklindedir (Tablo 9).

Tablo 9. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* URE C geni ısıt döngü ve süreleri.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç	1	95°C	7 dk
Denatürasyon			
Denatürasyon		95°C	30 sn
Bağlanma	35	60°C	30 sn
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	7 dk
Bekletme	-	4°C	∞ dk

3.4.4. PCR ürünlerinin elektroforez tankına yüklenmesi

PCR işleminden sonra elde edilen ürünlerden 10'ar µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl 6x loading dye solüsyonu ile karıştırılmıştır. 10 µl DNA ürünü ve boya birlikte %2'lik hazırlanan agaroz jelde uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklenmiştir. İlk kuyucuğa 6 µl'lik marker koyulmuştur, bu marker, marker boyası ve ddH₂O'dan oluşmuştur.

3.4.5. Jelde yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 80V 500A akımda 15 dakika ve sonrasında 40V 500A akımda 40 dakika yürütülmüştür.

3.4.6. Görüntüleme ve değerlendirme

Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarılmıştır. Yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirilmiştir. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant büyüklükleri değerlendirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin görüntüleme ve değerlendirilmesinde *Photobacterium damsela* varlığı için 16S rRNA PCR ürünlerinde 267

bp aralığındaki bant, CPS geni PCR ürünlerinde 410 bp aralığında bant oluşumları aranmıştır. *Photobacterium damsela* varlığı tespit edildikten sonra alt türlerin ayırımında URE C geni kullanılarak ürünler bir kez daha jelde yürütülmüştür. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* URE C geni taşıdığı için 448 bp bant aralığında pozitiflik sonucu verdiği izlenmiştir.

3.5. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testi öncesi *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ve *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* izolatları TSA'ya pasajlanmıştır. Üreyen 24 saatlik koloniler Brain Heart infusion brothda dilüe edildikten sonra Mueller Hinton agara geçilmiştir. Her bir izolat için ayrı ayrı hazırlanan her bir besi yerine 8'er adet antimikrobiyal diskler yerleştirilmiştir. Diskler yerleştirildikten sonra besi yerleri 25°C'de 72 saate kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda izolatların antibiyotiklere karşı gösterdiği duyarlılık ya da direnç değerleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına göre değerlendirilmiştir (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2017). Değerlendirmede kullanılan CLSI (2017) standart zon değerleri Tablo 10'da verilmiştir.

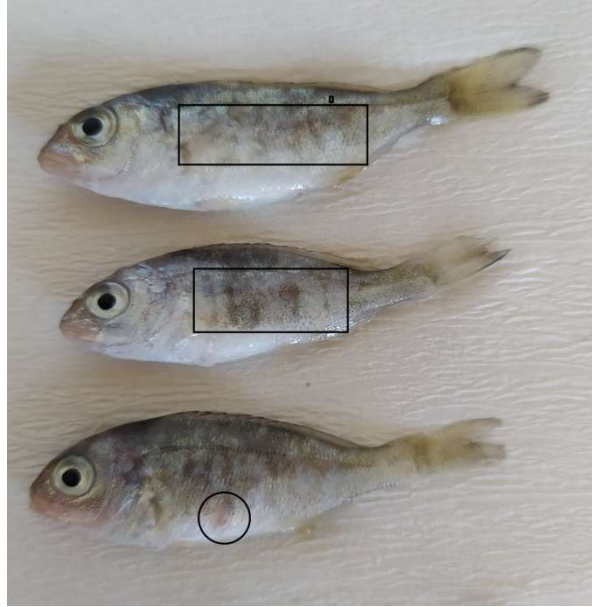
Tablo 10. CLSI standartları.

Antimikrobiyotikler	CLSI Standart Değerleri		
	D (Duyarlı)	OD (Orta duyarlı)	Dİ (Dirençli)
Amoksisilin- Klavulanik asit 30 µg	≥20	15-19	≤14
Ampisilin 10 µg	≥17	14-16	≤13
Gentamisin 10 µg	≥15	13-14	≤12
Siprofloksasin 5 µg	≥21	16-20	≤15
Sulfametoksazol- Trimetoprim 25 µg	≥16	11-15	≤13
Tetrasiklin 30 µg	≥19	15-18	≤14
Sefotaksim 30 µg	≥26	23-25	≤22
Seftizoksım 30 µg	≥25	22-24	≤21

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

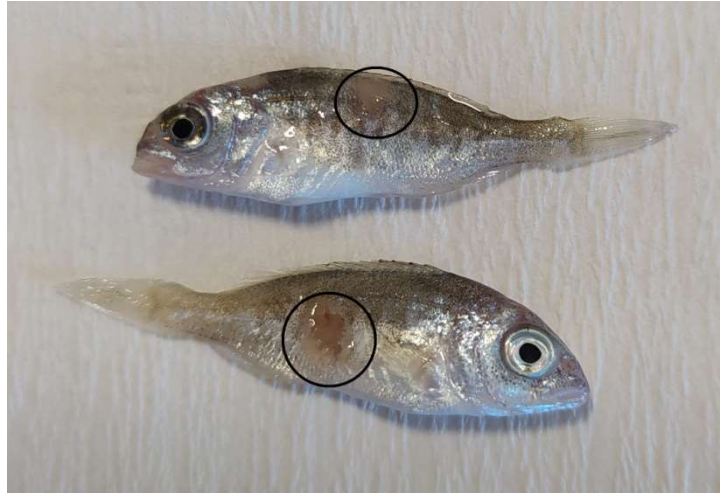
Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen hastalık şüpheli balık örneklerinde özellikle 1 gr civarı çipura yavruları belirgin klinik bulgular sergilemiştir. Bu balıklarda göze çarpan ilk klinik bulgu deride gelişen hafif kararmış alanlardır. Ayrıca deride pullarda kalkma ve lezyonların varlığına bağlı olarak yamalı bir görüntü izlenmiştir (Resim 1, 2, 3). Solungaçlarda solgunluk izlenmiş olup, karın açılıp iç organlar izlendiğinde öncelikle dalaktaki büyüme göze çarpmıştır. Büyümüş dalaklara beyaz tüberküler bir yapının eşlik ettiği dikkat çekmiştir (Resim 4, 5).



Resim 1. Örneklenen balıklarda deride görülen yamalı görüntü.



Resim 2. Örneklenen balıklarda yamalı görüntü ve deri lezyonları.



Resim 3. Örneklenen balıklarda deride belirgin lezyon gelişimi.



Resim 4. Örneklenen balıklarda abdomen görüntüsü ve büyümüş dalak görünümü.



Resim 5. Photobacteriosis şüpheli balıklarda dalak görüntüsü.

4.2. İzolatların Besi Yerinde Üremesi ve Gram Boyama Sonuçları

İzolasyonun ilk basamağında TSA ve kanlı agara yapılan ekimler sonucunda üreyen karışık koloniler (Resim 6, 7), saflaştırıldıktan sonra tek düşen koloniler gram boyama yapılarak biyokimyasal testlere karar verilmiştir. Gram boyama sonunda Gram negatif bipolar boyanan koloniler (Resim 8) tekrar TSA'ya pasajlanarak etken yeniden üretilmiştir. Yeniden üreyen suşlarda biyokimyasal testlere geçilmiştir. Araştırmamızda 100 adet çipura (*Sparus aurata*) örneğinden 35 (%35) şüpheli suş izole edilmiş ve 26 (%26) *Photobacterium damsela*

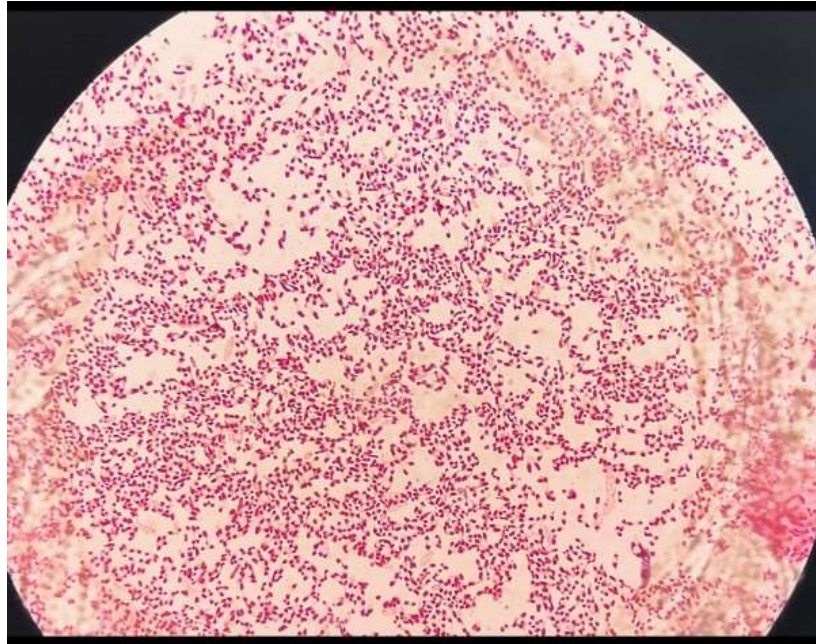
izolatu identifiye edilmiştir. 100 adet levrek (*Dicentrarchus labrax*) örneğinden *Photobacterium damsela* izolasyonu yapılmamıştır.



Resim 6. Bir *Photobacterium* spp. şüpheli izolatının kanlı agarda görüntüsü.



Resim 7. Bir *Photobacterium* spp. şüpheli izolatının TSA'da görüntüsü.



Resim 8. Bir *Photobacterium* spp. şüpheli izolatın Gram negatif bipolar görüntüsü.

4.3. Biyokimyasal Test Sonuçları

Biyokimyasal test olarak *Photobacterium* spp. şüpheli izolatlar oksidaz ve katalaz testleri uygulanmış olup *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* ve *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* suşlarının hepsi oksidaz ve katalaz testinde pozitif sonuç vermiştir.

4.4. BD Phoneix™ 50 Otomatize İdentifikasyon Cihazı ile İdentifikasyon

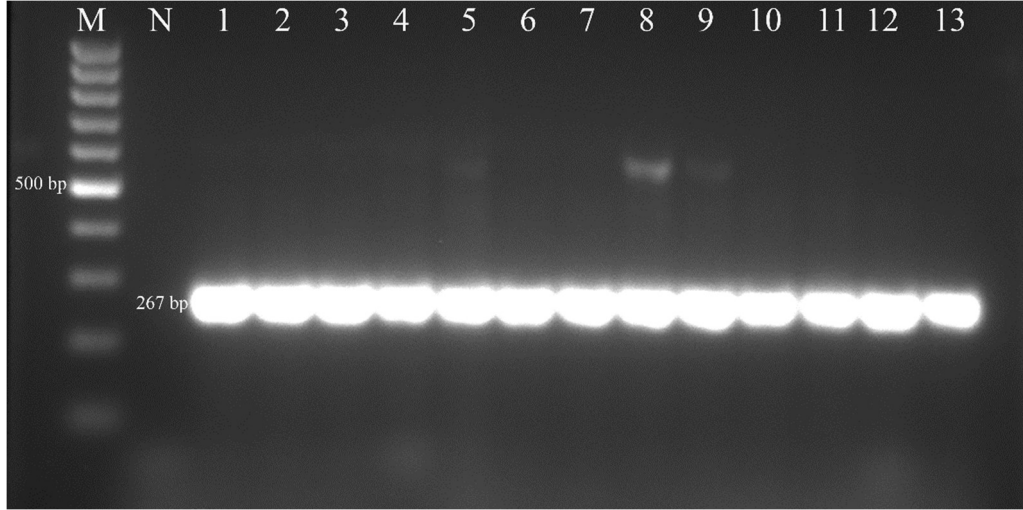
Araştırmamızda örneklenen çipura balık dokularından 35 (%35) *Photobacterium damsela* şüpheli suş izole edilmiştir. Bu şüpheli Gram negatif izolatların BD Phoneix™ 50 otomatize identifikasyon cihazına yüklenmesi sonucunda 26 (%26) *Photobacterium damsela* izolatı tanımlanmıştır.

4.5. PCR Bulguları

4.5.1. *Photobacterium damsela* 16S rRNA PCR Bulguları

Çalışmamızda BD Phoenix™ 50 otomatize identifikasyon cihazı ile tanımlenen 26 (%26) *Photobacterium damsela* izolatına 16S rRNA tür spesifik geni ile polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi uygulanmıştır. 16S rRNA tür spesifik geni belirlemek için yapılan analizde 26 *Photobacterium damsela* izolatı 267 bp aralığında bant verdi ve *Photobacterium damsela* pozitif olarak değerlendirildi (Resim 9). Bu 16S rRNA PCR pozitif sonuç veren 26 adet izolatın tamamı çipura (0,8- 1,3 g) örneklerine aittir.

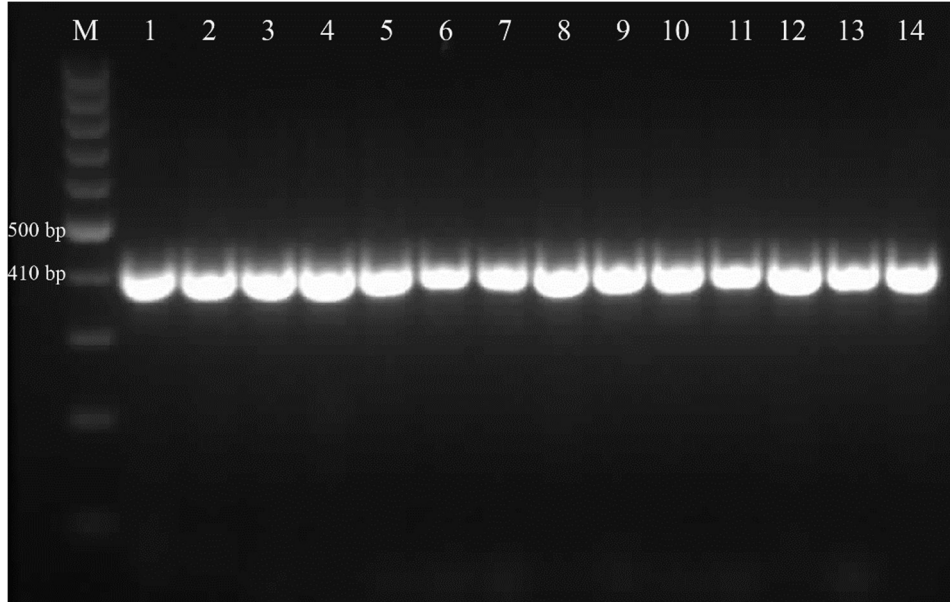
Photobacteriosis şüpheli balıklara yaz ve yaz sonu rastlandığı için örnekleme bu aylarda yapılmıştır. Örnekleme sahamızda hastalığa en sık yaz aylarında ya da su sıcaklığının yaz mevsimi deniz su sıcaklığında sabit tutulduğu kuluçkahanelerde rastlandığı sonucuna varılmıştır.



Resim 9. *Photobacterium damsela* 16S rRNA PCR elektroforez görüntüsü. M: Moleküler marker 100bp; N: Negatif kontrol; 1-13: *Photobacterium damsela* pozitif örnekler

4.5.2. *Photobacterium damsela* CPS Geni PCR Bulguları

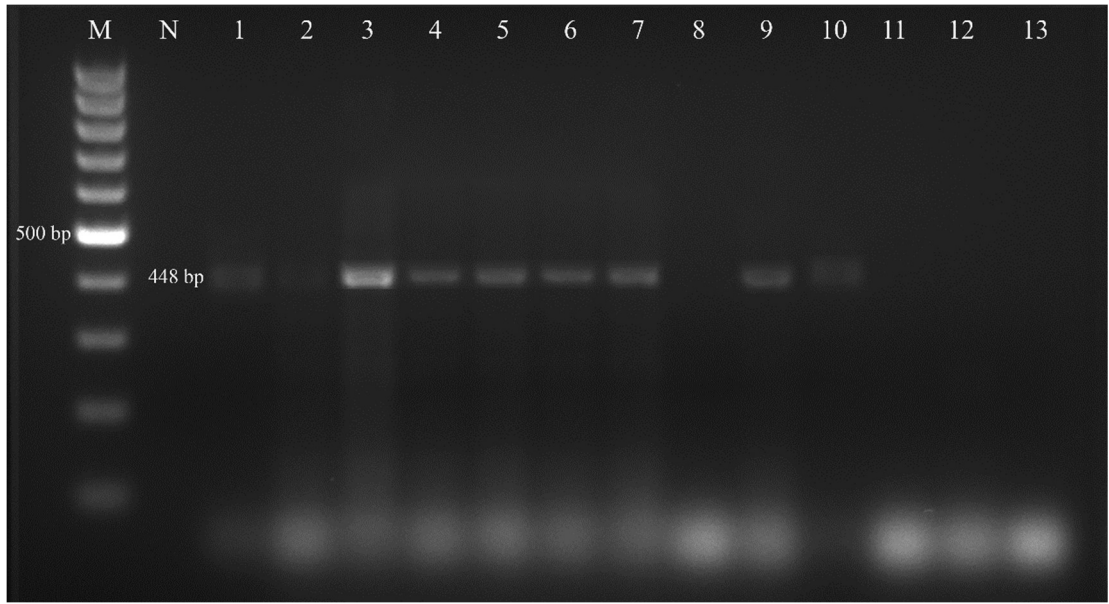
Photobacterium damsela'nin her iki alt türünde de mevcut olan CPS geni 26 adet izolatta 410 bp aralığında bant vermiştir (Resim 10).



Resim 10. *Photobacterium damsela* CPS geni PCR elektroforez görüntüsü. M: Moleküler marker 100bp; 1-14: *Photobacterium damsela* CPS geni pozitif örnekler

4.5.3. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* URE C Geni PCR Bulguları

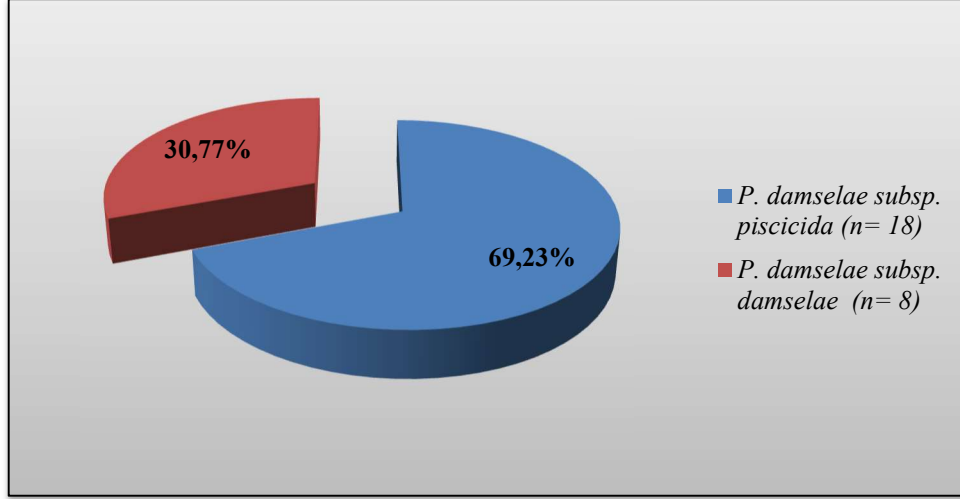
Daha önceki çalışmalarda belirtildiği üzere, yalnızca *P. damsela* subsp. *damsela* URE C genine sahiptir ve çalışmamızda 448 bp bant aralığında çoğalarak pozitif sonuç veren izolatlar *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* olarak tanımlanmıştır (Resim 11). Bu bantı vermeyen izolatlar ise *P. damsela* subsp. *piscicida* olarak tanımlanmıştır.



Resim 11. *P. damsela* subsp. *damsela* URE C geni PCR elektroforez görüntüsü.

M: Moleküler marker 100bp; N: Negatif kontrol; 1-13: *Photobacterium damsela* URE C geni pozitif örnekler

P. damsela izolatlarının (n= 26), moleküler identifikasyon sonuçlarına göre 18 (%69,23)'i *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ve geri kalan 8 (%30,77)'i de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* olarak identife edilmiştir. Şekil 1'de izolatların yüzde oranları gösterilmiştir.



Şekil 1. PCR ile identifiye edilen *P. damsela* izolatlarının yüzdeleri.

Araştırmamızın genel değerlendirilmesinde, elde edilen biyokimyasal, BD-Phoenix hızlı teşhis sistemi ve PCR sonuçları Tablo 11’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre kültür ve BD-Phoenix hızlı teşhis sistemi ile *P. damsela*’yı tür bazında tanımlarken, PCR yöntemi ile *P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela* olarak alt tür ayrımı yapılmaktadır. Moleküler identifikasyonda 16S rRNA, CPS ve URE C genlerinden hepsi pozitif sonuç vermişse izolatın *P. damsela* subsp. *damsela* olduğu, yalnızca 16S rRNA ve CPS geni pozitif sonuç vermişse *P. damsela* subsp. *piscicida* olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 11. *Photobacterium damsela* izolatlarının biyokimyasal, BD-Phoenix ve PCR identifikasyon sonuçları.

Sıra No	Catalase	Oxidase	BD- PHOENIX	PCR			Moleküler identifikasyon
				16S PCR (<i>Photobacterium damsela</i> sp.)	CPS PCR	UREC PCR	
1	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
2	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
3	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
4	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
5	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
6	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
7	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
8	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
9	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
10	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
11	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
12	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
13	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
14	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
15	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
16	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
17	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
18	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
19	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
20	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
21	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
22	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
23	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
24	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
25	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
26	+	+	<i>P. damsela</i>	Pozitif	Pozitif	Negatif	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>

4.6. Antibiyogram Sonuçları

Mueller Hinton agara ekilen izolatların üzerine yerleştirilen antibiyotik disklere karşı duyarlılık ya da direncini gösteren sonuçlar Tablo 12’de verilmiştir. Antibiyotik etkinliklerinin belirlenmesinde CLSI (2017) standart zon çapları dikkate alınmıştır (Tablo 10). Kullanılan antibiyotikler ve kısaltmaları şu şekidedir, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, AMP: Ampisilin, CN: Gentamisin, CIP: Siprofloksasin, SXT: Sulfametoksazol-trimetoprim, TET: Tetrasiklin, CTX: Sefotaksim, ZOX: Seftizoksim.

Tablo 12. *Photobacterium damsela*e pozitif izolatların antibiyogram duyarlılık sonuçları.

Balık No	Moleküler identifikasyon	AMC (30 µg)	AMP (10 µg)	CN (10 µg)	CIP (5 µg)	SXT (25 µg)	TET (30 µg)	CTX (30 µg)	ZOX (30 µg)
1	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	OD	Du	Du	Du	Du	OD	Du	Du
2	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>damsela</i> e	OD	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
3	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	Du	OD	Du	Du
4	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	Di	Di	Du	Du
5	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>damsela</i> e	Du	Du	Du	Du	Di	Di	Du	Du
6	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	Di	Di	OD	Du
7	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
8	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>damsela</i> e	Du	Du	Du	Du	Du	OD	Du	Du
9	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>damsela</i> e	OD	Du	Du	Du	OD	OD	Du	Du
10	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>damsela</i> e	Du	Du	Du	Du	OD	Di	Du	Du
11	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>damsela</i> e	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Di
12	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Di	Du	Du	Du	Du	OD	Du	Du
13	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	OD	OD	Du	Du
14	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	OD	OD	Du	Du
15	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>damsela</i> e	OD	Du	Di	Du	OD	Du	Du	OD
16	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Di	Di	Du	Du	Du	Di	Di	Du
17	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	Di	Du	Du	Du
18	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>damsela</i> e	Du	Du	Du	Du	Di	OD	Du	Du
19	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	Di	Di	Du	Du
20	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	OD	Du	Du	Du	Di	OD	Du	Du
21	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	Di	OD	Du	Du
22	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Di	Di	Du	Du	Di	OD	Di	Du
23	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	Di	Di	OD	Du
24	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	Du	Du	Du	Du	Du	Du	OD	Di
25	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	OD	Du	Du	Du	OD	Du	Di	OD
26	<i>P.damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i>	OD	Du	Du	Du	Di	Du	OD	Du

Du: Duyarlı, OD: Orta duyarlı, Di: Dirençli

Araştırmamızda identifiye edilen izolatların antibiyotiklere karşı duyarlılık ve direnç sonuçları Tablo 13'te verilmiştir.

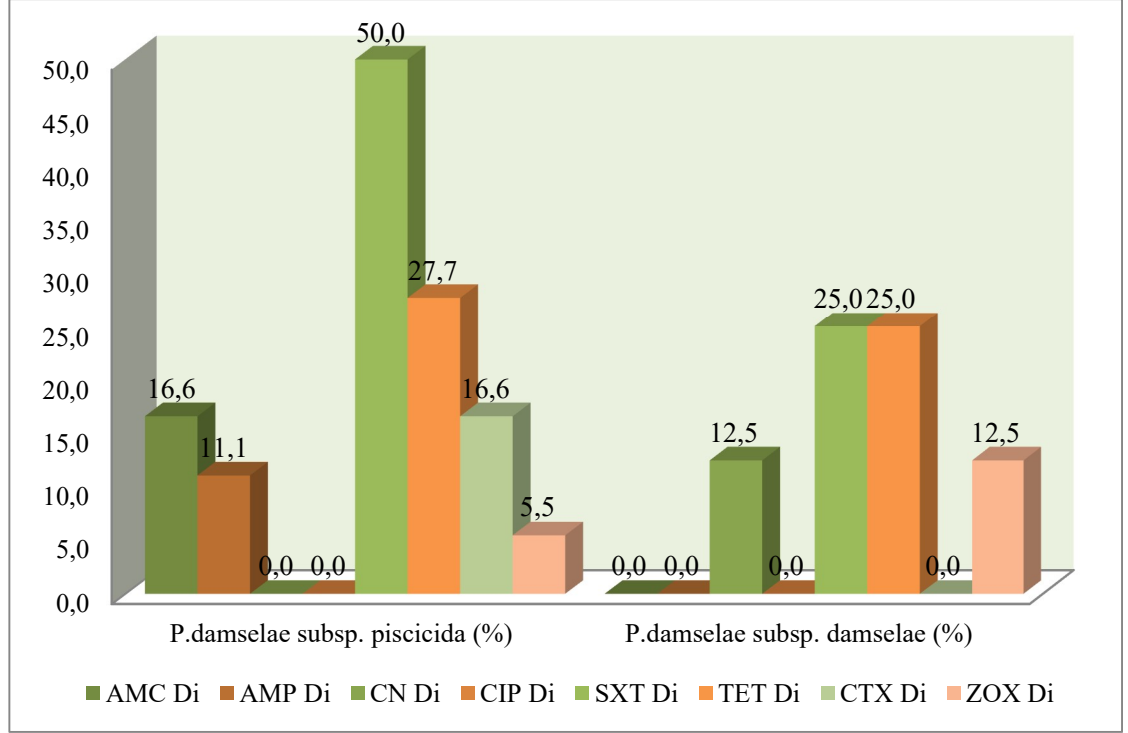
Tablo 13. İdentifiye edilen *P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.

Antibiyotikler	Antibiyotik Etkinlikleri	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
AMC	Du	11	5
	OD	4	3
	Di	3	0
AMP	Du	16	8
	OD	0	0
	Di	2	0
CN	Du	18	7
	OD	0	0
	Di	0	1
CIP	Du	18	8
	OD	0	0
	Di	0	0
SXT	Du	6	3
	OD	3	3
	Di	9	2
TET	Du	5	3
	OD	8	3
	Di	5	2
CTX	Du	11	8
	OD	4	0
	Di	3	0
ZOX	Du	16	6
	OD	1	1
	Di	1	1

SXT: Sulfametoksazol-trimetoprim, CTX: Sefotaksim, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, CN: Gentamisin, AMP: Ampisilin, CIP: Siprofloksasin, TET: Tetrasiklin, ZOX: Seftizoksım

Bu sonuçlara göre *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatları gentamisine (10 µg) karşı %100 duyarlı, *P. damsela* subsp. *damsela* izolatları ve *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatları siprofloksasine (5 µg) karşı %100 duyarlı bulunmuştur. *P. damsela* subsp. *piscicida*

izolatları sulfametoksazol-trimetoprim (25 µg) karşı %50, *P. damsela* subsp. *damsela* izolatları ise %25 oranında dirençlidir. Ayrıca *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatları tetrasikline (30 µg) karşı %27,7 oranında *P. damsela* subsp. *damsela* izolatları %25 oranında dirençli bulunmuştur (Şekil 2).



Şekil 2. *P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela* izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç yüzde oranları.

AMC Di: Amoksisilin-klovulanik asit direnç oranı; AMP Di: Ampisilin direnç oranı; CN Di: Gentamisin direnç oranı; CIP Di: Siprofloksasin direnç oranı; SXT Di: Sulfametoksazol-trimetoprim direnç oranı; TET Di: Tetrasiklin direnç oranı; CTX Di: Sefotaksim direnç oranı; ZOX Di: Seftizoksime direnç oranı

Bu sonuçlara göre, *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatlarının (n= 18) hepsi gentamisin (10 µg) ve siprofloksasine (5 µg) karşı %100 duyarlı, ampisilin (10 µg) ve seftizoksime (30 µg) karşı %88,8 duyarlı (%5,5 orta duyarlı), amoksisilin-klavulanik asit (30 µg) ve seftoksime (30 µg) karşı %61,1 duyarlı ve %22,2 oranında orta duyarlı, tetrasikline (30 µg) %27,7 oranında duyarlı ve %44,4 oranında orta duyarlı bulunmuştur. *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatları sulfametoksazol-trimetoprim (25 µg) karşı %50, tetrasikline (30 µg) karşı %27,7 oranında ve hem amoksisilin-klavulanik asit (30 µg), hem de seftoksime (30 µg) karşı %16,6 oranında dirençli bulunmuştur. *P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela*

subsp. *damselae* izolatlarının antibiyotiklere karşı direnç yüzde oranları Şekil 2'de gösterilmiştir.

Antibiyoqram sonuçlarımıza göre, *P. damsela*e subsp. *damsela*e izolatlarının (n= 8) hepsi amoksisilin-klavulanik asit (30 µg), ampisilin (10 µg), siprofloksasin (5 µg) ve sefotaksime karşı %100 duyarlı, gentamisine (10 µg) karşı %87,5 oranında duyarlı, seftizoksime (30 µg) karşı %75 duyarlı ve %12,5 oranında orta duyarlı, amoksisilin-klavulanik asite (30 µg) karşı %62,5 oranında duyarlı ve %37,5 oranında orta duyarlı, hem sulfametoksazol-trimetoprim (25 µg) hem de tetrasikline (30 µg) karşı %37,5 oranında duyarlı ve %37,5 oranında orta duyarlıdır. Ayrıca sulfametoksazol-trimetoprim (25 µg) ve tetrasikline (30 µg) karşı %25 oranında, gentamisin (10 µg) ve seftizoksime (30 µg) karşı %12,5 oranında dirençli bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* ve *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* denizlerde zaman zaman yaygın olarak bulunan, balıktan balığa ya da sudan balığa geçme özelliği gösteren ve geniş konakçı çeşitliliğine sahip patojen etkenlerdir. Bu hastalık etkenleri balıklarda yüksek mortaliteyle seyretmekte ve çeşitli antibiyotiklere karşı direnç gösterebilmektedir. Bu bakteriyel etkenler özellikle aşılama programının verimli uygulanmadığı zamanlarda kültür balıkları için önemli tehdit oluşturmaktadırlar (Magarinos ve diğerleri, 1994; Andreoni ve Magnani, 2014; Teru ve diğerleri, 2017). Günümüzde Avrupa (Labella ve diğerleri 2006, 2011; Mladineo ve diğerleri, 2006), Türkiye (Korun ve Timur, 2005; Uzun ve Öğüt, 2015), ve Kuzey Afrika ülkesi Mısır (Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013; Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018; Mahmoud ve diğerleri, 2018), Amerika (Teru ve diğerleri, 2017), Avustralya, Uzak Doğu ülkelerinde Çin (Wang ve diğerleri, 2013), Japonya (Nagano ve diğerleri, 2009), Tayland (Kanchanopas-Barnetta ve diğerleri, 2009) ve Tayvan'da (Liu ve diğerleri, 2003; Rajan ve diğerleri, 2003) ve Hindistan'da (Krupesha Sharma ve diğerleri, 2017; Petchimuthu ve diğerleri, 2021) *P. damsela*'nın alt türlerinin sebep olduğu hastalık vakalarının izlendiğine dair çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Kuzey Afrika ülkelerinden Mısır'da yapılan çalışmada hastalık şüphesiyle örneklenen levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipuralardan (*Sparus aurata*) levreklerin sırasıyla %38,32'si ve %16,20'si *P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela* ile, çipuraların %44,47 ve %26,46'sı yine sırasıyla *P. damsela* subsp. *piscicida* ve *P. damsela* subsp. *damsela* ile infekte olduğu tespit edilmiştir. Doğal şekilde gelişen infeksiyonlar en fazla yaz aylarında (%77,56), en düşük ise kış aylarında (%11,16) izlenmiştir (Essam ve diğerleri, 2016).

Mısır'da yapılan başka bir çalışmada çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve kefal (*Mugil capitus*) oluşan 202 adet balık örneklenmiş, bunların 51 tanesi *P. damsela* subsp. *piscicida* ile infekte olup, en çok etkilenen balık türünün levrek olduğu tespit edilmiştir (23 adet- ort 159±3,4 g). Prevalanlar levrek için %45,09, çipura (18 adet- ort 163±2,8 g) için %35,29 ve kefal (10 adet- ort 267±6,7 g) için %19,6'dır. Diğer yandan 91 adet balığın *P. damsela* subsp. *damsela* ile infekte olduğu tespit edilmiş olup, levrek (36 adet) yine en fazla etkilenen balık olmuştur. Prevalanlar sırasıyla levrek için %39,56, çipura için %35,16 ve kefal için %25,27'dir. Buna göre balıkların %25,24'unda *P. damsela* subsp.

piscicida, %45,04'ünde *P. damsela* subsp. *damsela* izole edilmiştir. İki alt türe de en yoğun yaz mevsiminde, en düşük kış mevsiminde rastlanmıştır (Eissa ve diğerleri, 2018).

Yine Mısır'da yapılan bir diğer çalışmada levrekte (*Dicentrarchus labrax*) %14,61 oranında *V. alginolyticus* ve %19,34 oranında *P. damsela* subsp. *damsela* izole edilmiştir. Mevsimsel olarak ele alındığında *V. alginolyticus* ve *P. damsela* subsp. *damsela* en yüksek yaz aylarında izlenmiş olup tüm vakaların %63,33'ünde *V. alginolyticus* ve %83,33'ünde *P. damsela* subsp. *damsela* izlenmiştir (Mahmoud ve diğerleri, 2018). Doğadan toplanan 320 adet farklı boyda hasta çipura (*Sparus aurata*) ve levreklerden (*Dicentrarchus labrax*) *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus* ve *P. damsela* subsp. *damsela* izole edilmiştir. Çipuraların %7,54'ünde levreklerin ise %5,93'ünde *P. damsela* subsp. *damsela* izole edilmiştir. Yetişkin balıklarda bu oranlar asırasıyla %44 ve 28 olarak belirlenmiştir (Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013).

Güney Hindistan'da hastalık şüpheli balıklardan elde edilen 289 adet izolatın 61 tanesi (%21,1) *P. damsela* subsp. *damsela* olarak tanımlanmıştır. Örneklenen balıklardan en yüksek oranda *P. damsela* subsp. *damsela*'ya rastlanan tür papağan balığıdır (*Scarus globiceps*) (34 izolat-%55,73). Elde edilen 61 izolatın %13,09'luk kısmı kafes kültürü balıklarından (%1,63; 1 izolat-*Epinephelus* spp., %9,83; 6 izolat-*Lates calcarifer* ve %1,63 oranıyla, 1 izolat-*Chaetodon octofasciatus*), geriye kalan %86,91'lik kısmı doğadan toplanan balık türlerinden (%55,73; 34 izolat-*Scarus globiceps*, %22,95; 14 izolat-*Lutjanus sebae* ve %8,19 oranıyla, 5 izolat-*Brama brama*) elde edilmiştir (Petchimuthu ve diğerleri, 2021).

Ülkemizde Bodrum'da izlenen vakalarda 45 adet hastalık şüpheli levrekten elde edilen 10 adet izolat *P. damsela* subsp. *piscicida* olarak tanımlanmıştır (Korun ve Timur, 2005). Bir diğer çalışmada Karadeniz'de kültürü yapılan levreklerden iki çiftlikten 477 adet balık örneklenmiştir, balıklardan %65,2 oranında *Aeromonas veronii* biovar *sobria* ve %19,1 oranında *P. damsela* subsp. *damsela* izole edilmiştir (Uzun ve Ögüt, 2015).

Çalışmamızda hastalık şüpheli olarak örneklenen balıklar arasından *P. damsela* teşhis edilen balıkların hepsi çipura (*Sparus aurata*) türü olarak tespit edilmiştir. Teşhis edilen toplam 26 adet izolatın 18 adedi (%69,23) *P. damsela* subsp. *piscicida* ve geri kalan 8 adedi (30,77) *P. damsela* subsp. *damsela* alt türü olarak belirlenmiştir. Photobacteriosis şüpheli balıklara yaz veya yaz suyu sıcaklığındaki tank ortamında rastlandığı için sonuçlarımız mevsimsel olarak görülme sıklığı açısından diğer çalışmalarla benzerlik göstermiştir. Eissa ve diğerleri (2018)'ne göre iki alt türden de en fazla etkilenen tür levrek olmuştur, Essam ve

diğerleri (2016)'ne göre ise çipura daha fazla etkilenmiştir. Araştırmamızda örnekleme mevkiine bağlı olarak en çok etkilenen tür çipura olmuştur ve bu sonuç Eissa ve diğerleri (2018)'nden farklılık göstermekle beraber Essam ve diğerleri (2016)'nin sonucuna benzerlik göstermiştir.

Türkiye'de karşılaşılan *P. damsela* subsp. *piscicida* vakalarında izlenen klinik bulgularda kefallerde (*Mugil cephalus*, *Chelon labrosus*) deride kararan bölgelerle beraber ventral bölgede hemorajiler, pul dizelerinde dökülmeler ve dalakta büyüme bildirilmiştir (Tanrıkul ve Çağırğan, 2001). Levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) letarji, iştah kaybı gibi bulgular yanında deride koyulaşma ve yer yer ülserler, karında şişlik, solgun hemorajik operkul ve post mortem iç organlarda karaciğerde peteşiyal hemoraji ile beraber, karaciğer, dalak ve böbrekte gri-beyaz tüberküler gelişmeler izlenmiştir (Korun ve Timur, 2005). Diğer *P. damsela* subsp. *piscicida* vakalarında Mısır'da levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) vücut yüzeyinde yaygın hemorajiler, gözde opaklaşma ve abdominal bölgede şişlik bildirilmiştir. Mortalite sonrası incelemede solungaç, böbrek ve dalakta solgunluk ve bazı durumlarda konjesyon, karaciğerde büyüme ve abdominal boşlukta sıvı izlenmiştir (Eissa ve diğerleri, 2018). İspanya'da ise Senegal dil balığında (*Solea senegalensis*) deride koyu renk pigmentleşme, karın boşluğunda şişlik, iç bakıda karaciğer ve böbrekte solgunluk ve dalakta beyaz tüberküller izlenmiştir (Zorrilla ve diğerleri, 1999).

P. damsela subsp. *damsela* vakalarında ülkemizde Karadeniz'de levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) deride koyulaşma, ekzoftalmus, erratik yüzme, operkul ve ağız çevresi ülseratif lezyonlar, ve abdominal şişlik bildirilmiştir (Uzun ve Ögüt, 2015). Mısır'da yapılan çalışmalarda çipura (*Sparus aurata*) ve levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) klinik bulgularda deride koyulaşma, pullarda kalkmalar, yüzgeç erozyonları, iskelet deformasyonu, pektoral yüzgeç dibinde, ağız çevresinde ve operkulumda hemorajiler ve solgunluk, deride yüzeysel ülserler ve hemorajiler, abdominal bölgede şişlik izlenmiştir. Post mortem incelemede konjestif böbrek, dalak, beyin, solgun ya da rengi koyulaşmış ve büyümüş karaciğer, büyümüş ve hemorajik safra kesesi, solgun ve aşırı mukus sekresyonu gösteren solungaçlar, abdominal boşlukta asidik bir sıvı ve bazı vakalarda hemorajik bölgeler ve hava kesesinde kalınlaşma, bağırsakta sarımsı bir sıvı bildirilmiştir (Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013; Mahmoud ve diğerleri, 2018). Tayland'da Asya levreğinde (*Lates calcarifer*) dış bakıda ölmek üzere olan balıkların karnı şiş, anüs çevresi sarı, solungaçlarında kararma ve gözlerinde ekzoftalmus bildirilmiştir (Kanchanopas-Barnette ve diğerleri, 2009). Hindistan'da kültür kobialarında (*Rachycentron canadum*) ise hemorajilerle birlikte şişkin abdomen, karın içinde abdominal

boşlukta sarı bir sıvı, karaciğer ve böbreklerde hemorajik bir görüntü izlenmiştir (Krupesha Sharma ve diğerleri, 2017).

Alt tür ayrımı yapılmadan İspanya'da çizgili mercandan (*Pagrus auriga*) elde edilen klinik verilerde dış muayenede ekzoftalmus ve deride koyulaşma, iç organlarda abdominal boşlukta asidik bir sıvı, ve genişlemiş ve koyu renk lekeli solgun karaciğerde belirgin konjestif kan damarları ve genişlemiş dalak ve dolu safra kesesi izlenmiştir (Labella ve diğerleri, 2006). İran'da yapılan çalışmada ise yüksek mortalite izlenen kefallerden (*Mugil cephalus*) ölmek üzere olan balıklarda deride hemorajik septisemi ve ülser, solungaçlarda hiperemi ve iç organlarda hemoraji izlenmiştir (Naseri ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda da benzer şekilde alt tür ayrımı yapılmadan önce çipuralardan elde edilen klinik verilerde deride gelişen lezyonlar, deride farklı alanlarda renkte hafif kararmalar ve yamalı bir görüntü, iç organlarda ise bazı balıklarda dalakta izlenen irileşme ve tüberküler oluşumlar önceki çalışmalarla (Korun ve Timur, 2005; Zorrilla ve diğerleri, 1999; Liu ve diğerleri, 2011) benzerlik göstermiştir.

Teşhisin ilk basamağında çeşitli çalışmalarda farklı besi yerleri kullanılmıştır. Bu çeşitli çalışmalarda solungaç, kalp, beyin ve ağırlıklı olarak karaciğer, dalak ve böbrekten yapılan ekimlerde %2 NaCl eklenen TSA, TSB (Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013), kanlı agar, BHIA ve marine agar (Kanchanopas-Barnette ve diğerleri, 2009; Abu-Elala ve diğerleri, 2015; Essam ve diğerleri, 2016), %3 NaCl eklenmiş Brain heart infusion broth (BHIB) (Eissa ve diğerleri, 2018), %1NaCl eklenmiş braine heart infusion agar (BHIA), TSA, marine agar, kanlı agar (Amagliani ve diğerleri, 2009; Essam ve diğerleri, 2016), %1,5 NaCl eklenmiş kanlı agar ve muller hinton agar (Uzun ve Öğüt, 2015) kullanılmış ve izolatlar 24-37°C'de 24-72 saat ve bir çalışmada 120 saat (Uzun ve Öğüt, 2015) süreyle inkübe edilmiştir (Mladineo ve diğerleri, 2006; Amagliani ve diğerleri, 2009; Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013; Abu-Elala ve diğerleri, 2015; Eissa ve diğerleri, 2018). *P. damsela* subsp. *piscicida* kolonileri 25°C'de 48 saat sonunda 1- 2,5 mm çapa sahip koloniler şeklinde üremiştir (Mladineo ve diğerleri, 2006).

Alt tür ayrımında ise örnekler %1-3 NaCl eklenmiş kanlı agar (%5 koyun kanlı) ve TCBS'ye ekim yapılmış ve 25-27°C'de 24-48 saatte üreme izlenmiştir (Abu-Elala ve diğerleri, 2015; Eissa ve diğerleri, 2018). Başka bir çalışmada kan ve doku örnekleri %2 NaCl eklenmiş TCBS ve TSB'ye ekilerek 30°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Brothdaki kültürler %2 NaCl eklenmiş TSA'ya transfer edilmiş ve 30°C'de 24 saatte saf koloniler elde edilmiştir (Krupesha Sharma ve diğerleri, 2017). Benzer şekilde şüpheli *P. damsela* subsp. *damsela* kolonileri %2-3 NaCl eklenmiş TSA'da 27°C'de kültüre alınmış ve 24-48 saatte

saflaştırılmıştır (Kanchanopas-Barnette ve diğerleri, 2009; Mahmoud ve diğerleri, 2018; Petchimuthu ve diğerleri, 2021).

Araştırmamızda da benzer şekilde öncelikle %1 NaCl eklenmiş kanlı agar (%5 koyun kanı ilave edilmiş) ve TSA'ya ekilen organ örnekleri karışık şekilde üredikten sonra saflaştırılmak üzere tekrar TSA'ya geçilmiştir. Besi yerleri 25°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir.

Teşhiste kullanılan basamaklardan biri olan biyokimyasal testlere bakıldığında çeşitli çalışmalarda benzer testler uygulanmıştır. *P. damsela* subsp. *piscicida* teşhisinde kullanılan biyokimyasal testlerde nitrat, üreaz, jelatinaz, indol ve hidrojen sülfid testi negatif sonuç vermiştir. Ayrıca API 20E test sonucuna göre arginin di-hidrolaz ve glukoz fermentasyon testi pozitif sonuç vermiştir (Abu-Elala ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışmada glukozdan asit üretimi pozitif, mannitol, sorbitol, sükroz, citrate kullanımı ve jelatinaz üretimi negatif sonuç vermiştir. Diğer yandan bakteri O/129 Vibriostat'a karşı duyarlıdır ve NO₃ ile NO₂ indirgemedi negatif sonuç vermiştir (Mladineo ve diğerleri, 2006).

Bir çalışmada iki alt türün ayrımını ortaya koymak için şu testler yapılmıştır: oksidaz, katalaz, O/129, beta galaktosidaz, hareketlilik, üreaz, indol ayrıca nitrat indirgeme, sitrat kullanımı, mannitol melibioz ve amigdalin fermentasyonu, LDC ve ODC. *P. damsela* subsp. *damsela* hareketlilik, NO₂, üreaz, nitrat indirgeme açısından pozitif sonuç vererek *P. damsela* subsp. *piscicida*'ya kıyasla farklılık göstermiştir (Essam ve diğerleri, 2016).

Başka bir çalışmada ADH, TDA, aseton, jelatinaz üretimi ve glukoz, mannitol, inositol, sorbitol, rhaminoz, sükroz, melibioz, amigdalin, arabinozdan asit oluşumu testleri uygulanmıştır. *P. damsela* subsp. *damsela* asit üretimi testlerinde glukozdan asit üretimi dışında testlerin tümünde negatif sonuç vermiştir. *P. damsela* subsp. *piscicida* sitrat kullanımı ve *P. damsela* subsp. *damsela* için ise üreaz üretimi pozitif farklılık göstermiştir (Eissa ve diğerleri, 2018). Diğer bir çalışmada *P. damsela* subsp. *damsela* diğer alt türden farklı olarak hareketlilik üreaz, lizin dekarboksilaz, aseton üretimi, glukozdan gaz üretimi ve nitrat indirgeme testleri için pozitif sonuç vermiştir (Kanchanopas-Barnette ve diğerleri, 2009).

P. damsela subsp. *damsela*'nın çalışıldığı çalışmalarda hareketsiz, katalaz ve nitrat indirgeme pozitif, ADH (Arginin dihidrolaz), üreaz, GLU (Glukoz asimilasyon), MNE (mannoz asimilasyon) ve oksidaz testi pozitif sonuç vermiştir (Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013; Krupesha Sharma ve diğerleri, 2017). Benzer bazı çalışmalarda ise hareketlilik pozitif,

katalaz, oksidaz pozitif, O/129 (10, 150 µg) pteridine duyarlı, üreaz ve simmons sitrat testleri değişken ya da üreaz pozitif, arginin, lizin dekarboksilaz pozitif sonuç vermiştir (Krupesha Sharma ve diğerleri, 2017; Mahmoud ve diğerleri, 2018; Petchimuthu ve diğerleri, 2021). Bir çalışmada *P. damsela* subsp *damsela* için farklı olarak üreaz testinin pozitif, oksidaz testinin ise negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (Naseri ve diğerleri, 2014).

Araştırmamızda şüpheli izolatlara oksidaz ve katalaz testi uygulanmış olup alt türlerin bütün izolatları iki test için de pozitif sonuç vererek önceki çalışmalarla (Essam ve diğerleri, 2016; Krupesha Sharma ve diğerleri, 2017; Mahmoud ve diğerleri, 2018; Petchimuthu ve diğerleri, 2021) benzerlik göstermiştir. Teşhisin devamı için suşlar BD Phoenix hızlı tanı sistemine yükleyerek teşhise devam edilmiştir.

Teşhisin en önemli basamaklarından biri olan moleküler teşhis günümüzde mikrobiyoloji çalışmalarının neredeyse tamamında uygulanmaktadır. *P. damsela* ya da alt türlerinin teşhisinde de moleküler teşhis uygulanmaktadır. *P. damsela* alt türlerinin teşhisi için yapılan PCR çalışması öncesinde DNA izolasyonunda lizozim enziminden yararlanılmıştır. Çalışmada 16S rRNA geninin 1016 ile 1033 sırasına tekabül eden forward primer Car1 (18-mer 5'-GCTTGAAGAGATTCGAGT-3') ve 1266 ile 1283 sırasına denk gelen reverse primer Car2 (18-mer 5'-CACCTCGCGGTCTTGCTG-3') kullanılmıştır. Multipleks PCR'da ayrıca alt tür ayırımında 448 bp uzunluğunda ure-5 ve ure-3 primerleri kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı (100 µl), her bir primerden 160 pmol, taq polimerazdan 2 U, 1x Taq polimeraz buffer, 2 mM MgCl₂, her bir deoksinükleotid trifosfattan 200 µM ve 100 ng hedef DNA'dan oluşmuştur (Osorio ve diğerleri, 2000b).

Mısır'da yapılan bir çalışmada DNA izolasyonu Osorio ve diğerleri (2000b) gibi lizozim ile gerçekleştirilmiştir. Tür teşhisinde 16S rRNA geninin 267 bp uzunluğundaki CAR1 ve CAR2 primerleri ve alt tür ayırımında üreaz C (ure C) geni kullanılarak multipleks PCR yöntemi uygulanmıştır (Essam ve diğerleri, 2016).

DNA izolasyonun reaktif ajan kullanılarak gerçekleştirildiği bir çalışmada multipleks DNA için 16S rRNA geninin Car1-F ve Car2-R primerleri ve üreaz C geni sekansından dizayn edilen primerler kullanılmıştır. PCR karışım oranlarına bakıldığında 25 µl'lik reaksiyon içinde 2 µl'lik forward ve reverse primerler, 6,5 µl'lik saf su, 12,5 µl'lik master mix ve 2 µl'lik hedef DNA bulunmaktadır. Termal döngü programı toplamda 30 döngü 95°C'de 4dak, 95°C'de 1dak, 60°C'de 1 dak ve 72°C'de 40 saniye şeklinde gerçekleşip final 72°C'de 5 dakikada sonlanmıştır. Çoğaltılan üründen 10 µl alınarak %1'lik agaroz jele yüklenip,

elektroforezde 100V'da 50-90 dak koşturulmuştur ve bu analizde boyut referansı olarak 100bp'lik bir DNA işaretleyici kullanılmıştır. Bu jel daha sonra 0,5 µg/ml etidyum bromit solusyonu ile 20 dak sũreyle boyanmıştır ve UV floresan ile gũrũnũr hale gelmiştir. *P. damsela* subsp. *damsela* izolatlarının hem 267 bp bazlık 16S rRNA, hem de 448 bp bazlık ure C geni için çoğaldığı bildirilmiştir (Petchimuthu ve diğerleri, 2021).

Bazı çalışmalarda tũr teşhisinde kapsũler polisakkarit geninin CPS forward (5'-AGGGGATCCGATTATTACTG-3') ve CPS reverse (5'-TCCCATGAGAAGATTTGAT-3') primerleri ve alt tũr ayırımında ũreaz C (ure C) geni kullanılmıştır (Rajan ve diğerleri, 2003; Eissa ve diğerleri, 2018).

P. damsela subsp. *damsela*'nın Ure C geni için 448 bp uzunluğundaki ũrũn elde etmek için 20 bazlık forward primer Ure-5' (5'-TCCGGAATAGGTAAAGCGGG-3') ve 22 bazlık reverse Ure-3'(5'-CTTGAATATCCATCTCATCTGC-3') kullanılmıştır (Osorio ve diğerleri, 2000b; Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018).

Çalışmamızda DNA izolasyonu için kullanılan yũntem Eissa ve diğerleri (2018) ile aynı yũntem olup, tũr teşhisinde (Osorio ve diğerleri, 2000b; Rajan ve diğerleri, 2003; Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018; Petchimuthu ve diğerleri, 2021), ve alt tũr ayırımında kullanılan genler (Osorio ve diğerleri, 2000b; Essam ve diğerleri, 2016; Eissa ve diğerleri, 2018) ũnceki çalışmalarla benzerlik gũstermiřtir.

P. damsela'nın ve alt tũrlerinin teşhisi yapıldıktan sonra antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını da ortaya koyan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Çipura (*Sparus aurata*) ve levreklerden (*Dicentrarchus labrax*) elde edilen *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatları ile yapılan çalışmada izolatlar ampisiline (10 µg) karşı dirençli, oksitetrasiklin (30 µg), enrofloksasin (5 µg) ve florfenikole (30 µg) karşı duyarlılık gũstermiřtir (Parın ve diğerleri, 2016). Levreklerden elde edilen tũm *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatları kanamisine (30 µg) duyarlı bulunmuştur (Korun ve Timur, 2005).

Senegal dil balığmdan (*Solea senegalensis*) elde edilen *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatları ise streptomisin (10 µg), eritromisin (15 µg) ve kanamisine (30 µg) karşı dirençli, ampisilin (10 µg), tetrasiklin (30 µg) ve trimetoprim-sulfametaksazola (23,75+1,25 µg) karşı duyarlı bulunmuştur (Zorrilla ve diğerleri, 1999).

izgili mercanlardan (*Pagrus auriga*) elde edilen *P. damsela* subsp. *damsela* izolatları trimetoprim-sulfametoksazole (25 µg) karşı duyarlı, ampisilin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), amoksisiline (25 µg) karşı dirençlidir. *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatları ise

eritromisin (15 µg), kanamisin (30 µg) ve streptomisine (10 µg) karşı dirençli, ampisilin (10 µg), tetrasiklin (30 µg) ve oksitetrasikline (30 µg) karşı duyarlı sonuç vermiştir (Labella ve diğerleri, 2006).

Çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve gri kefalle (*Mugil capitus*) yapılan araştırmada hem *P. damsela* subsp. *damsela* hem de *P. damsela* subsp. *piscicida* siprofloksasine (5 µg) karşı duyarlı, eritromisin (15 µg) ve spektinomisine (10 µg) karşı dirençlilik göstermiştir. Ayrıca *P. damsela* subsp. *damsela* farklı olarak linkomisin (2 µg), ampisilin (10 µg), novobiosin (30 µg) ve oksitetrasikline (30 µg) karşı dirençli, siprofloksasine (5 µg) karşı duyarlı sonuç vermiştir (Eissa ve diğerleri, 2018).

Çipura (*Sparus aurata*) ve levrekten (*Dicentrarchus labrax*) elde edilen *P. damsela* subsp. *damsela* izolatları siprofloksasin (5 µg), kloramfenikol (30 µg), enrofloksasin (5 µg), oksitetrasiklin (30 µg), trimetoprim–sulfametaksazol (25 µg) ve oksolinik asite (2 µg) karşı duyarlı, ampisilin (10 µg), amoksisilin (25 µg), tetrasiklin (30 µg), gentamisin (10 µg), streptomisin (10 µg) ve linkomisine (2 µg) karşı dirençlidir (Abdel-Aziz ve diğerleri, 2013).

Levreklerden elde edilen *P. damsela* subsp. *damsela* izolatları florfenikol (30 µg), sulfametaksazol-trimetoprim (25 µg) karşı duyarlı, ampisilin (10 µg), sefotaksim (30 µg), gentamisin (10 µg) ve nitrofurantoine (300 µg) karşı dirençli sonuç vermiştir (Mahmoud ve diğerleri, 2018).

Karadeniz’de levreklerden elde edilen *P. damsela* subsp. *damsela* izolatları ise trimetoprim (1,25 µg), vankomisin (30 µg) ve sulfametaksazol/trimetoprim (25 µg) karşı dirençli, ancak oksolinik asit (2 µg) ve enrofloksasine (5 µg) karşı duyarlı bulunmuştur (Uzun ve Ögüt, 2015).

Çalışmamızda elde edilen *P. damsela* subsp. *piscicida* izolatları Parın ve diğerleri (2016)’nden farklı, Zorrilla ve diğerleri (1999) ve Labella ve diğerleri (2006) ile benzer şekilde ampisiline (10 µg) duyarlı (% 88,8), Zorrilla ve diğerleri (1999)’nden farklı şekilde trimetoprim-sulfametaksazole (25 µg) karşı dirençli (%50), Zorrilla ve diğerleri (1999) ve Labella ve diğerleri (2006)’nden farklı şekilde tetrasikline dirençlidir (%27,7). Ayrıca Eissa ve diğerleri (2018) ile benzer olarak siprofloksasine (5 µg) karşı %100 duyarlıdır.

Elde ettiğimiz *P. damsela* subsp. *damsela* izolatları ise Labella ve diğerleri (2006), Abdel-Aziz ve diğerleri (2013), Mahmoud ve diğerlerinden (2018) ve Uzun ve Ögüt (2015)’ten farklı olarak trimetoprim-sulfametaksazole (25 µg) karşı dirençlidir (%25), Labella ve diğerleri (2006), Abdel-Aziz ve diğerleri (2013), Mahmoud ve diğerleri (2013) ve Eissa ve

diğerleri (2018),’nden farklı olarak ampisiline (10 µg) karşı duyarlıdır (%100). Labella ve diğerleri (2006) ve Abdel-Aziz ve diğerleri (2013) ile benzer olarak tetrasikline (30 µg) karşı dirençlidir (%25), Abdel-Aziz ve diğerleri (2013) ve Eissa ve diğerleri (2018) ile benzer şekilde siprofloksasine (5 µg) karşı duyarlıdır (%100). Abdel-Aziz ve diğerleri (2013)’nden farklı olarak gentamisine (10 µg) duyarlı (%87,5), Mahmoud ve diğerleri (2018)’nden farklı olarak sefotaksime (30 µg) karşı duyarlıdır (%100).

Photobacterium damsela’nın alt türleri özellikle Avrupa’da ve ülkemizde denizde kültürü yapılan balıklar için önemli birer tehdit unsurudur. Doğal deniz ortamında hayatta kalan, doğal balıklarda ve kafes sisteminde yetiştirilen balıklarda yayılımı yaygın olan etkenler için, yavru balıktan itibaren yapılan aşılama oldukça önemli olmakla beraber bazı durumlarda aşılar da etkili olamamaktadır. *Photobacterium damsela*’nın alt türlerine ait klinik bulgular belirgin olmakla birlikte bu etkenlerin hızlı teşhisi ve tedavisi de oldukça önemlidir. Bu çalışmada *Photobacterium damsela*’nın alt türleri için hızlı teşhis yöntemleri ve bu türlerin tedavide kullanılacak antibiyotiklere karşı duyarlılıkları ortaya koyulmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* ve *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* günümüzde deniz kültür balıkçılığında oldukça önemli iki farklı balık patojenidir. Tek başına ya da birlikte veya diğer hastalık etkenleri ile birlikte hastalık geliştirebilirler. Klinik bulgu olarak balıklarda özellikle deride neden oldukları değişimlerle tanımlanırlar. Ayrıca *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*'nın dalakta ve böbrekte sebep olduğu tüberküller teşhis için spesifik bir bulgudur. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* balıktan başka çeşitli memeli hayvanlarda ve insanlarda da gelişebilir ve deri tüberküllerine sebep olabilir. Her iki etken de özellikle yaz aylarında yayılım gösterir ve hastalık kontrol altına alınmadığında balıklarda yoğun ölümlere sebep olabilir.

Hem *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* hem de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* klinik olarak belirti göstermekle beraber kesin teşhis için, klinik bulgu gösteren yeni ölmüş balıklar hızlıca muayene edilip taze balık örnekleri derhal besi yerine ekilmelidir. Koloni morfolojisi şüpheli olan izolatlardan Gram boyama yapılmalı ve Gram negatif basil bipolar boyanan koloniler hızlıca biyokimyasal testlere tabii tutulmalıdır. Biyokimyasal testler sonucunda teşhis edilen izolatlar moleküler teşhis yoluyla identife edilebilir.

Araştırmamızda 200 adet balık örneğinden 35 adet şüpheli suş ve 26 adet identife edilmiş izolat elde edilmiştir. Bu izolatların 18 adedi (%69,23) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ve geri kalan 8 adedi (%30,77) de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* alt türü olarak teşhis edilmiştir. Ayrıca bu izolatlar yalnızca şüpheli çipura yavrularından elde edilmiştir. Bununla beraber hem *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* hem de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* izolatları sulfametoksazol-trimetoprim (25 µg) ve tetrasikline (30 µg) karşı dirençli ve siprofloksasine (5 µg) karşı duyarlı (%100) bulunmuştur. Ayrıca *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* ampicilin (10 µg) ve sefotaksime (30 µg), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ise gentamisine (10 µg) karşı %100 duyarlıdır.

Bu çalışma sonunda, *Photobacterium damsela* türü ile *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ve *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* teşhisi için kullandığımız moleküler teşhis yöntemi uygulanabilir bulunmuştur. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ve *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* izolatlarının ele alınan antibiyotiklere karşı farklı duyarlılık göstermeleri de değerli bulunmuştur. Sonuç olarak elde edilen bulgulara

göre ipura yavruları hem *P. damselae* subsp. *piscicida* hem de *P. damselae* subsp. *damselae* açısından daha duyarlı bulunmuştur. Örneklemenin yapıldığı yaz mevsimi hastalığın ortaya çıktığı ve yoğun izlendiği dönemdir. Hızlı teşhisin önemi, korunma ve hızlı tedavi ile kayıpların önlenmesi adına oldukça önemlidir. Karşılaşılan vakalarda antibiyogram testi sonucunda antibiyotik uygulaması yapılması tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz, M., Eissa, A.E., Hanna, M., Okada, M.A. (2013). Identifying some pathogenic *Vibrio/Photobacterium* species during mass mortalities of cultured Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from some Egyptian coastal provinces. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(2), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.10.004>
- 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. doi: 10.1111/jwas.12237
- Altınok, İ. ve Kurt, I. (2003). Molecular diagnosis of fish diseases: a Review. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3(2), 131-138.
- Akaylı, T. (2001). *Kültür Çipura Balıklarında (Sparus auratus L 1758) Vibriosis'in ELISA ve Bakteriyolojik Yöntemlerle Teşhisi*. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Amagliani, G., Omiccioli, E., Andreoni, F., Boiani, R., Bianconi, I., Zaccone, R., Mancuso, M., Magnani, M. (2009). Development of a multiplex PCR assay for *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* identification in fish samples. *Journal of Fish Diseases*, 32(8), 645–653. doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01027.x
- Andreoni, F., Boiani, R., Serafini, G., Amagliani, G., Dominici S., Riccioni, G., Zaccone, R., Mancuso, M., Scapigliati, G., Magnani, M. (2013). Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate. *Vaccine*, 31(5), 820–826. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.064.
- Andreoni, F. ve Magnani, M. (2014). Photobacteriosis: Prevention and Diagnosis, Review Article. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Immunology Research*, Volume 2014, Article ID 793817, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/793817>
- Arda, M. (1997). Pratik Bakteriyoloji, Mikroskoplar İçin Preparat Hazırlanması. M. Arda (Ed.), *Temel Mikrobiyoloji içinde* (1. bs., ss. 246-266). Ankara: Medisan Yayınları.
- Avcı, H., Birincioğlu, S., Epikmen, E.T., Dereli, M. (2013). Comparative histopathological and immunohistochemical evaluations in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea

- bream (*Sparus aurata*) naturally infected with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 164 (2), 72-79.
- Ayaz, A. (2006). *Kültür Koşullarında Levrek (Dicentrarchus labrax l. 1758) Balığı Larvalarında Dominant Aerobik Bakteriyel Bağırsak Florası*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H. (1995). Some Biochemical Properties and antibiotic Sensitivities of *Pasteurella piscicida* Isolated in Greece and Comparison with Strains from Japan, France and Italy. *Journal of Fish Diseases*, 18(1), 1–7. [http:// doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb01260.x](http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1995.tb01260.x)
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Papapanagiotou, E., Richards, R., Galleotti, M., Adams, A. (1997). Development of a ELISA to detect *Pasteurella piscicida* in cultured and in ‘spiked’ fish tissue. *Aquaculture*, 156(3-4), 359-366. doi:10.1016/S0044-8486(97)00137-3.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Gusmani, L., Galeotti, M., Adams, A., Dimitriadis, G.J. (2003). Vaccination trials of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, using novel vaccine mixtures. *Journal of Fish Diseases*, 26(2), 77–90. doi: 10.1046/j.1365-2761.2003.00438.x.
- Balado, M., Lages, M.A., Fuentes-Monteverde, J.C., Martinez-Matamoros, D., Rodriguez, J., Jimenez, C., Lemos, M.L. (2018). The siderophore Piscibactin is a relevant virulence factor for *Vibrio anguillarum* favored at low temperatures. *Frontiers in Microbiology*, 9-1766, 1-16. doi: 10.3389/fmicb.2018.01766.
- Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Borrego, J.J. (1995). Role of extracellular products in the pathogenicity of *Vibrio strainson* cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). *Microbiologia SEM*, 11(4), 439-446.
- Balebona, M.C., Andreu, M.J., Bordas, M.A., Zorrilla, I., Moriñigo, M.A., Borrego. J.J. (1998a). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4269-4275. doi: 10.1128/aem.64.11.4269-4275.1998
- Balebona, M.C., Zorrilla, I., Moriñigo, M.A., Borrego, J.J. (1998b). Survey of bacterial pathogens affecting farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture*, 166(1998): 19-35. doi:10.1016/S0044-8486(98)00282-8
- Baptista, T., Romalde, J.L., Toranzo, A.E. (1996). First Occurrence of Pasteurellosis in Portugal Affecting Cultered Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16(3), 92–94.

- Barnes, A.C., dos Santos, N.M.S., Ellis, A.E. (2005). Update on bacterial vaccines: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Developments in Biologicals*, 121, 75–84.
- Berthe, F.C.J., Michel, C., Bernardet, J.F. (1995). Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21(2), 151-155. doi: 10.3354/dao021151
- Boran, H., Terzi, E., Altinok, I., Capkin, E., Bascinar, N. (2013). Bacterial diseases of cultured mediterranean Horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) in sea cages. *Aquaculture*, 396-399(1 June 2013): 8-13. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.02.025
- Borrego, J.J., Labella, A.M., Castro, D., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C. (2017). Updated of the pathologies affecting cultured gilthead seabream *Sparus aurata*. *Annals of Aquaculture and Research*, 4(2):1033, 1-14.
- Botella, S., Pujalte, M.J., Macian, M.C., Ferrus, M.A., Hernandez, J., Garay, E. (2002). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biochemical typing of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 681–688. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01748.x.
- Bowden, T.J., Bricknell, I.R., Preziosi, B.M. (2017). Comparative pathogenicity of *Vibrio* spp., *Photobacterium damsela* spp. *damsela* and five isolates of *Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes* in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Journal of Fish Diseases*, 41, 79-86. doi: 10.1111/jfd.12679.
- Buller, N. (2004). Biochemical identification Tables. In N.B. Buller (Ed.), *Bacteria from Fish and other aquatic animal. A practical identification manual* (pp. 137–177). Amerika: CABI Publishing. doi:10.1079/9780851997384.0000
- Candan, A. (1991). *Çipura (Sparus aurata l. 1758) yetiştiriciliğinde mevsimsel olarak görülen hastalık etkenlerinin tespit ve tedavi yönteminin geliştirilmesi*. Doktora Tezi, İstanbul University Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Candan, A., Küçüker, M.A., Karataş, S. (1996). Pasteurellosis in Cultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bulletin- European Association of Fish Pathologists*, 16(5), 150-153.
- Chatzigeorgiou, K., Sergentanis, T.N., Tsiodras, S., Hamodrakas, S.J., Bagos, G. (2011). Phoenix 100 versus Vitek 2 in the Identification of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: a Comprehensive Meta-Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9), 3284-3291. doi:10.1128/JCM.00182-11
- Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. (2017). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-sixth informational supplement*. CLSI document M100-S26. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute

- Colorni, A. ve Padros, F. (2011). Diseases and health management. In M.A. Pavlidis, C.C. Mylonas (Ed.), *Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and other Species* (pp. 321-357). Oxford: Wiley-Blackwell. doi:10.1002/9781444392210.ch10
- Crespo, S., Zarza, C., Padros, F., Marín de Mateo, M. (1999). Epitheliocystis agents in sea bream *Sparus aurata*: morphological evidence for two distinct chlamydia-like developmental cycles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37(1), 61-72. doi: 10.3354/dao037061
- Cruz-Silva, M.P., Freitas, M.S., Orge, M.L. (1997). Co-infection by monogenetic trematodes of the genus *Microcotyle* V. Beneden & Hesse 1863, *Lamellodiscus ignoratus* Palombi, 1943, the protozoan *Trichodina* sp. Ehrenberg, 1838 and the presence of epitheliocystis, *Vibrio alginolyticus* and *V. vulnificus* in cultured sea bream (*Sparus aurata* L.) in Portugal. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 17(2), 40-42.
- Çağırğan, H. (1993a). Kültürü yapılan Çipura (*Sparus aurata* L.) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Çağırğan, H. (1993b). The First Isolation of *Pasteurella piscicida* from Cultured Sea Bream (*Sparus auratus*) in Turkey. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 3(2), 82-83.
- Çanak, Ö. (2011). *Kültür Çipura (Sparus aurata, L. 1758) Balıklarından İzole Edilen Bazı Patojen Bakterilerin Protein Profillerinin Tespiti*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul University Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Del Castillo, C.S., Jang, H.B., Hikima J.-I., Jung, T.S., Morii, H., Hirono, I., Kondo, H., Kurosaka, C., Aoki, T. (2013). Comparative analysis and distribution of pP9014, a novel drug resistance IncP-1 plasmid from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(1), 10–18. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.02.027.
- Do Vale, A., Silva, M.T., dos Santos, N.M.S., Nascimento, D.S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., Ellis, A.E., Azevedo, J.E. (2005). AIP56, a novel plasmid encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology*, 58(4), 1025–1038. doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04893.x.
- Dolapçı, İ. (2016). *Bakterilerde izolasyon, tanı ve identifikasyon yöntemleri*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Ders Notu, Şubat 2016. <https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/20.500.12575/41250/Bakterilerde%20izolasyon%2C%20tan%C4%B1%20ve%20identifikasyon.pdf?sequence=1&isAllowed=y> adresinden erişildi.

- Duman, M., Mulet, M., Altun, S., Saticioglu, I.B., Özdemir, B., Ajmi, N., Lalucat, J., Garcia-Valdes, E. (2021). The diversity of *Pseudomonas* species isolated from fish farms in Turkey. *Aquaculture*, 535(736369), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736369>
- Eissa, I.A.M., Derwa, H.I., Ismail, M., El-lamie, M., Dessouki, A.A., Elsheshtawy, H., Bayoumy, E.M. (2018). Molecular and Phenotypic Characterization of Photobacterium damsela Among Some Marine Fishes in Lake Temsah. *Microbial Pathogenesis*, 114, 315-322. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.006
- Essam, H.M., Abdellrazeq, G.S., Tayel, S.I., Torky, H.A., Fadel, A.H. (2016). Pathogenesis of Photobacterium damsela Subspecies Infections in Sea Bass and Sea Bream. *Microbial Pathogenesis*, 99, 41-50. doi: 10.1016/j.micpath.2016.08.003
- Farmer III, J.J. ve Hickman-Brenner, F.W. (2006). The genera Vibrio and Photobacterium. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes* (pp. 508–563). New York: Springer.
- Finkelstein, R.A., Boesman-Finkelstein, M., Chang, Y., Hase, C.C. (1992). *Vibrio cholera* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infection and Immunity*, 60(2), 472-478. doi: 10.1128/iai.60.2.472-478.1992
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2022a). Global Aquaculture Production for species (tonnes). *Food and Agriculture Organization of United Nations*. https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/en/en_giltheadseabr.htm
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2022b). Global Aquaculture Production for species (tonnes). *Food and Agriculture Organization of United Nations*. https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/dicentrarchus_labrax/en
- Fouz, B., Larsen, J. L., Nielsen, B., Barja, J. L., Toranzo, A.E. (1992). Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12,155–156. doi: 10.3354/DAO012155.
- Fouz, B., Barja, J. L., Amaro, C., Rivas, C., Toranzo, A.E. (1993). Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. *Current Microbiology*, 27, 341–347. doi: 10.1007/BF01568958.
- Fouz, B., Toranzo. A. E., Biosca, E. G., Mazoy, R., and Amaro, C. (1994). Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiology Letters*, 121, 181–188. doi: 10.1111/j.1574- 6968.1994.tb07097.x

- Fouz, B., Toranzo, A., Marco-Noales, E., Amaro, C. (1998). Survival of fish-virulent strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in seawater under starvation conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 168(2), 181-186. doi: 10.1016/S0378-1097(98)00436-4.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M., Christen, R. (1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 139-144. doi: 10.1099/00207713-45-1-139
- Goodell, K.H., Jordan, M.R., Graham, R., Cassidy, C., Nasraway, S.A. (2004). Rapidly advancing necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium (Vibrio) damsela*: a hyperaggressive variant. *Critical Care Medicine*, 32(1), 278-281. doi: 10.1097/01.CCM.0000104920.01254.82
- Haldar, S., Maharajan, A., Chatterjee, S., Hunter, S.A., Chowdhury, N., Hinenoya, A., Asakura, M., Yamasaki, S. (2010). Identification of *Vibrio harveyi* as a causative bacterium for a tail rot disease of sea bream *Sparus aurata* from research hatchery in Malta. *Microbiological Research*, 165(8), 639-648. doi: 10.1016/j.micres.2009.12.001
- Hastein, T., Gudding, R., Evensen, Q. (2005). Bacterial Vaccines for Fish: An Update of the Current Situation Worldwide. In P.J. Midtlyng (Ed), *Progress in Fish Vaccinology. Developments in Biologicals*, 121, 55–74. Basel, İsviçre: Karger.
- Ho, L.P., Han-You, L.J., Liu, H.C., Chen, H.E., Chen, T.Y., Yang, H.L. (2011). Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1), 412–419. doi: 10.1016/j.fsi.2010.11.029
- Ho, L.P., Chang, C.J., Liu, H.C., Yang, H.L., Lin, J.H.Y. (2014). Evaluating the protective efficacy of antigen combinations against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* infections in cobia, *Rachycentron canadum* L. *Journal of Fish Diseases*, 37(1), 51-62. doi: 10.1111/j.1365-2761.2012.01424.x.
- Kanchanopas-Barnette, P., Labella, A., Alonso, C.M., Manchado, M., Castro, D., Borrego, J.J. (2009). The First Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from Asian Seabass *Lates calcarifer*. *Fish Pathology*, 44(1), 47-50.
- Karataş, S., Candan, A., Demircan, D. (2005). Atypical aeromonas infection in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Black Sea. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 57(4): 255-263
- Kayış, S., Çapkin, E., Altınok, I. (2009). Bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Black Sea Region of Turkey - A survey. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 61 (4), 339-344. doi.org/10.46989/001c.20564.

- Khouadja, S., Lamari, F., Bakhrouf, A., Gaddour, K. (2014). Virulence properties, biofilm formation and random amplified polymorphic DNA analysis of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolates from cultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microbial Pathogenesis*, 69-70, 13-19. doi: 10.1016/j.micpath.2014.03.007.
- Kim, M.J., Hirono, I., Kurokawa, K., Maki, T., Hawke, J., Kondo, H., Santos, M.D., Aoki, T. (2008). Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R plasmids) from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates collected in Japan and the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 606–611. doi: 10.1128/AAC.01216-07
- Korun, J. (2004). *Kültür Levrek Balıklarında (Dicentrarchus labrax) Vibriosis ve Pasteurellosis' in bazı diagnostik kitler ve laboratuvar yöntemleri ile teşhisi üzerinde bir çalışma*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Korun, J. ve Akaylı, T. (2004). Kültür levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarında paraziter bir isopod: *Ceratothoa oestroides* ve sekonder bakteriyel infeksiyonlar olgusu. *İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30(2), 123-132. doi:10.16988/IUVFD.06072
- Korun, J. ve Timur, G. (2005). The First Pasteurellosis Case in Cultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at Low Marine Water Temperatures in Turkey. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*. 57(3), 197-206.
- Korun, J., Akgun, K., Yazici, M. (2009). Isolation of *Shewanella putrefaciens* from cultured European sea bass, (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Revue de Medecine Veterinaire*, 11(1), 532-536.
- Kralik, P. ve Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8(108), 1-9. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108
- Kreger, A.S. (1984). Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infection and Immunity*, 44(2), 326–331. doi: 10.1128/iai.44.2.326-331.1984.
- Kreger, A.S., Bernheimer, A.W., Etkin, L.A., Daniel, L.W. (1987). Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. *Infection and Immunity*, 55(12), 3209-3212. doi: 10.1128/iai.55.12.3209-3212.1987.
- Krupesha Sharma, S.R., Pradeep, M.A., Sadu, N., Dube, P.N., Vijayan, K.K. (2017). First report of isolation and characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from cage-farmed cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Fish Diseases*, 40(7), 953–958, doi:10.1111/jfd.12557

- Kubilay, A. ve Uluköy, G. (2004). First isolation of *Staphylococcus epidermidis* from cultured Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24(3), 137-143.
- Labella, A., Vida, M., Alonso, M.C., Infante, C., Cardenas, S., Lopez-Romalde, S., Manchado, M., Borrego, J.J. (2006). First isolation of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* from cultured redbanded seabream, *Pagrus auriga Valenciennes*, in Spain. *Journal of Fish Diseases*, 29, 175-179. doi:10.1111/J.1365-2761.2006.00697.X.
- Labella, A., Manchado, M., Alonso, M.C., Castro, D., Romalde, J.L., Borrego, J.J. (2010a). Molecular intraspecific characterization of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* affecting cultured marine fish. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 2122-2132. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04614.x.
- Labella, A., Sanchez-Montes, N., Berbel, C., Aparicio, M., Castro, D., Manchado, M., Borrego, J.J. (2010b). Toxicity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains isolated from new cultured marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92: 31-40. doi: 10.3354/dao02275.
- Labella, A., Berbel, C., Manchado, M., Castro, D., Borrego, J.J. (2011). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an Emerging Pathogen Affecting New Cultured Marine Fish Species in Southern Spain. In F. Aral (Ed.), *Recent Advances in Fish Farms* (pp. 135-152). InTech, <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-fish-farms/photobacterium-damsela-subsp-damsela-an-emerging-pathogen-affecting-new-cultured-marine-fish-species>
- Labella, A.M., Arahal, D.R., Castro, D., Lemos, M.L., Borrego, J.J. (2017). Revisiting the genus *Photobacterium*: taxonomy, ecology and pathogenesis. *International Microbiology*, 20(1), 1-10. doi:10.2436/20.1501.01.280. ISSN (print): 1139-6709. e-ISSN: 1618-1095
- Liu, P., Lin, J., Lee, K. (2003). Virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in cultured cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology*, 43(6), 499-507. doi:10.1002/jobm.200310301
- Liu, L.C., Hung, S.W., Chen, M.H., Cheng, C.F., Lin, C.C., Chang, C.H., Lin, S.L., Tu, C.Y., Lin, Y.H., Wang, W.S. (2011). Highly virulent *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from Taiwan paradise fish, *Macropodus opercularis* (L.), in Taiwan. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (15) 2107–2113. doi:10.5897/AJMR11.303
- Love, M.S., Fisher, D., Hose, J.E., Farmer, J.J., Hickman F.W., Fanning, G.R. (1981). *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science*, 214(4525), 1139–1140. doi:10.1126/science.214.4525.1139

- Magarinos, B., Santos, Y., Romalde, J.L., Rivas, C., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1992). Pathogenic activity of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *Journal of General Microbiology*, 138(12), 2491-2498. doi:10.1099/00221287-138-12-2491
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1994). Iron Uptake by *Pasteurella piscicida* and Its Role in Pathogenicity for Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 2990-2998. doi: 10.1128/aem.60.8.2990-2998.1994.
- Magarinos, B., Toranzo, A.E., Romalde, J. L. (1996a). Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annual Review of Fish Diseases*, 6:41–64. doi:10.1016/S0959-8030(96)90005-8.
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Noya, M., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1996b). Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters*, 138(1), 29–34. doi:10.1111/j.1574-6968.1996.tb08139.
- Magarinos, B., Bonet, R., Romalde, J.L., Martinez, M.J., Congregado, F., Toranzo, A.E. (1996c). Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microbial Pathogenesis*, 21(4), 289–297. doi: 10.1006/mpat.1996.0062
- Magarinos, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A.E., Lamas, J. (2001). Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 195(1-2), 17-21. doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00547-0
- Magarinos, B., Romalde, J.L., López-Romalde, S., Morinigo, M.A., Toranzo, A.E. (2003). Pathobiological characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23(4), 183-190.
- Mahmoud, S.A., El-Bouhy, Z.M., Hassanin, M.E., Fadel, A.H. (2018). *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *Damsel*: Prevalence, Histopathology and Treatment in sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 5(4): 354-364.
- Martins, P., Navarro, R.V.V., Coelho, F.J.R.C., Gomes, N.C.M. (2015). Development of a molecular methodology for fast detection of *Photobacterium damsela* subspecies in water samples. *Aquaculture*, 435(1), 137-142. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.028
- Mladineo, I., Miletic, I., Bocina, I. (2006). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Outbreak in Cage-Reared Atlantic Bluefin Tuna *Thunnus thynnus*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 18:000-000, 72-76. doi: 10.1577/H05-012.1

- Moi, I.M., Roslan, N.N., Leow, A.T.C., Ali, M.S.M., Abd. Rahman, R.N.Z.R., Rahimpour, A., Sabri, S. (2017). The Biology and the Importance of Photobacterium species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 4371-4385. doi:10.1007/s00253-017-8300-y
- Morris, J.G., Wilson, R., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Miller, H.G., Tacket, C.O., Hickman, F.W., Blake, P. (1982). Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio holisae*. *The Lancet*, 319(8284), 1294-1297. doi. 10.1016/S0140-6736(82)92853-7
- Nagano, I., Inoue, S., Kawai, K., Oshima, S. (2009). Repeatable immersion infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* reproducing clinical signs and moderate mortality. *Fisheries Science*, 75, 707-714. doi:10.1007/s12562-009-0099-8
- Naseri, F., Amiri, A.A., Hosseini, M., Heidarzadeh, M., Zahedi, R., Arabzadeh, P. (2014). Molecular and Phenotypic Characterization of *Photobacterium damsela*, a pathogen of the grey mullet *Mugil cephalus*, in Iran. *International Journal of Advanced Life Sciences*, 7(3), 452-462.
- Norqvist, A., Norrman, B., Wolf-Watz, H. (1990). Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity*, 58(11), 3731-3736. doi: 10.1128/iai.58.11.3731-3736.1990.
- Noya, M., Magarinos, B., Toranzo, A.E., Lamas, J. (1995) Sequential pathology of experimental pasteurellosis in gilthead seabream, *Sparus aurata*. A light-and electron microscopic study. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21, 177–186. doi:10.3354/dao021177
- Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Romalde, J.L. (1999). 16S rRNA Gene Sequence Analysis of *Photobacterium damsela* and Nested PCR Method for Rapid Detection of the Causative Agent of Fish Pasteurellosis, *Applied and Environmental Microbiology*, 0099-2240/99/\$04.0010 July 1999, 65(7), 2942–2946
- Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Barja, J.L. (2000a). 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. doi:10.3354/DAO040177.
- Osorio, C.R., Romalde, J.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (2000b). Presence of phospholipase D (*dly*) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Microbial Pathogenesis*, 28(2), 119–126. doi: 10.1006/mpat.1999.0330.
- Osorio, C.R., Juiz-Rio, S., Lemos, M.L. (2006). A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* highpathogenicity island. *Microbiology*, 152:3327–3341. doi.org/10.1099/mic.0.29190-0.

- Osorio, C.R., Rivas, A.J., Balado, M., Fuentes-Monteverde, J.C., Rodriguez, J., Jimenez, C., Lemos, M.L., Waldor, M.K. (2015). A Transmissible Plasmid-Borne Pathogenicity Island Confers Piscibactin Biosynthesis in the Fish Pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17), 5867-5879.
- Özden, O., Saka, Ş., Suzer, C. (2020). Current status of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) production in Turkey. D. Çoban, M.D. Demircan, D.D. Tosun (Eds.), *Marine Aquaculture in Turkey: Advancements and Management*, Turkish Marine Research Foundation içinde (1. bs., ss. 50-68). İstanbul: Turkish Marine Research Foundation.
- Öztürk, R.Ç. ve Altınok, İ. (2014). Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14: 275-297. doi: 10.4194/1303-2712-v14_1_30
- Parın, U., Erbaş, G., Savaşan, S., Yüksel, H.T., Gürpınar, S., Kırkan, Ş. (2016). Investigation of antimicrobial resistance of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *International Journal of Recent Scientific Research*, 7(5), 10882-10886.
- Pedersen, K., Dalsgaard, I., Larsen, J.L. (1997). *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3711–3715. doi: 10.1128/aem.63.9.3711-3715.1997.
- Petchimuthu, M., George, M.R., Rijijohn, K., Santhanakumar, V. (2021). Isolation, Molecular Characterization and Virulence Study (Pathogenesis) of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* Isolated from Sea-cage and Wild Fishes. *Indian Journal of Animal Research*, 55(6), 679-688. doi: 10.18805/ijar.B-4012
- Rajan, P.R., Lin J.H.Y., Ho M.S., Yang, H.L. (2003). Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1375–1380. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02119.x.
- Rivas, A.J., Balado, M., Lemos, M.L., Osorio, C.R. (2011). The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* Hemolysins Damselysin and HlyA Are Encoded within a New Virulence Plasmid. *Infection and Immunity*, 79(11), 4617–4627. doi: 10.1128/IAI.05436-11
- Rivas, A.J., Balado, M., Lemos, M.L., Osorio, C.R. (2013). Synergistic and additive effects of chromosomal and plasmid-encoded hemolysins contribute to hemolysis and virulence in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infection and Immunity*, 81(9), 3287–3299. doi.org/10.1128/IAI.00155-13.
- Rivas, A.J., von Hoven, G., Neukirch, C., Meyenburg, M., Qin, Q., Füser, S., Boller, K., Lemos, M.L., Osorio, C.R., Husmann, M. (2015). Phobalysin, a small β -pore forming toxin of

- Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infection and Immunity*, 83(11), 4335-4348. doi: 10.1128/IAI.00277-15
- Roberts, R.J. (2012). The Bacteriology of Teleosts. In R.J. Roberts (Ed.), *Fish Pathology* (pp.339-382). Glasgow, İskoçya: Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1002/9781118222942
- Romalde, J.L. ve Magarinos, B. (1997). Immunization with bacterial antigens: Pasteurellosis. *Developments in Biology Standardization*, 90: 167-177.
- Romalde, J.L., Magarinos, B., Lores, F., Osorio, C.R., Toranzo, A.E. (1999). Assessment of a magnetic bead-EIA based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis. *Journal of Microbiological Methods*, 38(1-2), 147–154. doi: 10.1016/s0167-7012(99)00088-3.
- Romalde, J.L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: An Integrated View of a Bacterial Fish Pathogen. *International Microbiology*, 5(1), 3-9. doi: 10.1007/s10123-002-0051-6.
- Savaş, H., Altınok, I., Cakmak, E., Firidin, S. (2006). Isolation of *Renibacterium salmoninarum* from cultured Black Sea Salmon (*Salmo trutta labrax*): First report in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 26(6), 238-246.
- Savaş, H. ve Türe, M. (2007). Bölgemizde doğal ve kültürü yapılan balıklarda görülen hastalıklar. *SUMAE Yunus Araştırma Bülteni*, 7(2), 10-13.
- Sniezsko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., Boone, J.G. (1964). Pasteurella sp. from an Epizootic of White Perch (*Roccus Americanus*). *Journal of Bacteriology*, 88, 1814–1815.
- Sukui, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., Yamamoto, S. (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(Pt 5), 1639-1652. doi: 10.1099/00207713-51-5-1639
- Takahashi, H., Miya, S., Kimura, B., Yamane, K., Arakawa, Y., Fujii, T. (2008). Difference of genotypic and phenotypic characteristics and pathogenicity potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between clinical and environmental isolates from Japan, *Microbial Pathogenesis*, 45(2), 150-158. doi: 10.1016/j.micpath.2008.04.008
- Tanrikul, T.T. ve Çağırğan, H. (2001). Doğadaki Kefal Balıklarında Görülen Pasteurellosis Salgını. *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(3-4), 509-512.
- Tanrikul, T.T., Çağırğan, H., Toksen, E. (2004). Levreklerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) izole edilen vibrio türlerinin API 20E yöntemiyle identifikasyonu. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21(3), 243-247.

- Terceti, M.S., Ögüt, H., Osorio, C.R. (2016). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish 5 pathogen in the Black Sea: evidences of a multiclonal origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3736-3745. doi:10.1128/AEM.00781-16, 1-24.
- Teru, Y., Hikima, J., Kono, T., Sakai, M., Takano, T., Hawke, J.P., Takeyama, H., Aokie, T. (2017). Whole-Genome Sequence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Strain 91-197, Isolated from Hybrid Striped Bass (*Morone* sp.) in the United States. *American Society for Microbiology, Genome Announcements, Prokaryotes*, 5(29), 1-2. doi: 10.1128/genomeA.00600-17.
- Thune, R.L., Fernandez, D.H., Hawke, J.P., Miller, R. (2003). Construction of a safe, stable, efficacious vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57(1-2), 51–58. doi: 10.3354/dao057051.
- Thyssen, A., Grisez, L., van Houdt, R., Ollevier, F. (1998). Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(Pt 4), 1145-1151. doi: 10.1099/00207713-48-4-1145
- Thyssen, A. ve Ollevier, F. (2005). Genus II. *Photobacterium* Beijerinck 1889, 401AL. In D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp.546-552). Springer, New York.
- Timur, G., Timur, M., Akayli, T., Korun, J., Erkan, M. (2008). The first observation of viral erythrocytic infection associated with pathogenic bacteria and some ectoparasites in cultured Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 28 (2), 58-65.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B., Barja, J.L. (1991). Pasteurellosis in Cultured Gilthead Seabream (*Sparus auratus*): First report in Spain. *Aquaculture*, 99(1-2),1-15. doi: 10.1016/0044-8486(91)90284-E.
- Toranzo, A.E. ve Barja, J.L. (1993) Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 5-36. doi.org/10.1016/0959-8030(93)90027-9
- Türk, N. (2002). Çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) yavrularından bakteri izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 27, 7-14.
- Urbanczyk, H., Ast, J.C., Dunlap, P.V. (2011). Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35 (2), 324-342. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00250.x

- Uzun, E. ve Ögüt, H. (2015). The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Southeastern Black Sea. *Aquaculture*, 437 (1 February 2015), 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.017>
- Varvarigos, P. (2020). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. In S. Zrncic (Ed.), *Diagnostic Manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream* iç, *Aquaculture*. Zaragoza: CIHEAM Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 75, (pp. 83-96).
- Wang, R., Feng, J., Su, Y., Ye, L., Wang, J. (2013). Studies on the Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from Diseased Golden Pompano (*Trachinotus ovatus* Linnaeus) and Antibacterial Agents Sensitivity. *Veterinary Microbiology*, 162(2-4), 957-963. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.09.020.
- Yaman, F., Seçer, S., Halkman, A.K. (2003). Ağ Kafeslerde Yetiştiriciliği Yapılan Çipura (*Sparus aurata* L.) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) Balıklarında Vibriosiz ve Pasteurellosis'in Araştırılması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(2), 1-36.
- Yamane, K., Asato, J., Kawade, N., Takahashi, H., Kimura, B., Arakawa, Y. (2004). Two cases of fatal necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium damsela* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1370–1372. doi: 10.1128/JCM.42.3.1370–1372.2004
- Yazıcı, M. (2004). *Levrek Balıklarında (Dicentrarchus labrax) Pastörellozis'e Karşı Alternatif Aşılama Yöntemleri Üzerine Bir Araştırma*. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Zappulli, V., Patarnello, T., Patarnello, P., Frassinetti, F., Franch, R., Manfrin, A., Castagnaro, M., Bargelloni (2005). Direct identification of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* by PCR-RFLP analysis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65(1), 53–61. doi: 10.3354/dao065053.
- Zorrilla, I., Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Sarasquete, C., Borrego. J.J. (1999). Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 22(3), 167-172. doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00157.x

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

‘Levrek ve Çipuralardan İzole Edilen *Photobacterium damsela* Suşlarının Moleküler Karakterizasyonlarının ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi’ başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurullar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uyum olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Sema MİDİLLİ

1/07/2022

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Midilli, Sema
Uyruk : T.C.
Telefon : 05327170289
Doğum yeri ve tarihi : İzmir / 07.05.1986
E-mail : sema.ozturk@adu.edu.tr
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2015
Y. Lisans	Veterinerlik Patolojisi Ege Üniversitesi	2011
Lisans	Su Ürünleri Yetiştiricilik Ege Üniversitesi Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü	2008

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2010 - ...	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Öğr. Gör.

AKADEMİK YAYINLAR

1.MAKALELER

- Midilli, S., Çoban, D., Güler, M., Küçük S. 2019. Kültür koşullarında nil tilapyası ve melez kırmızı tilapiya (Cichlidae, Oreochromis spp.)'xxda görülen gaz kabarcığı hastalığı. *Su Ürünleri Dergisi*, 36(3), 285-291.
- Küçük, S., Midilli, S., Güler, M., Çoban, D. 2019. Histological Changes of Electric Yellow Cichlid (Labidochromis caeruleus) Exposed to Acute and Chronic Cadmium Concentrations. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(8), 1216-1221. doi: 10.24925/turjaf.v7i8.1216-1221.2677
- Yıldırım, Ş., Midilli, S., Güler, M., Yurttaş, R.C., Çoban, D. 2019. A study on oocyte development of the Atlantic bluefin tuna(Thunnusthynnus, Linnaeus 1758) under farming conditions. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43(4), 516-522. doi: 10.3906/vet-1901-11
- Küçük, S., Midilli, S., Güler, M., Çoban, D. 2018. Kadmiyuma Maruz Bırakılmış Sarı Prenses (Labidochromis caeruleus) Balıklarında Saptanan Histolojik Değişiklikler Üzerine Bir Ön Çalışma. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 35(3), 261-266. doi: 10.12714/egejfas.2018.35.3.05
- Yılmaz, E., Çoban, D., Kırım, B., Güler, M., Öztürk, S. 2017. The Effects of the Carvacrol and Thymol Addition to Pangasius Hypophthalmus Feeds in Different Amount on the Growth Performance. *Yunus Araştırma Bülteni*, 17(2), 157-162. doi: 10.17693/yunusae.v17i27092.270200
- Solovyev, M.M., Campoverde, C., Öztürk, S., Moreira, C., Diaz, M., Moyano, F.J., Estevez, A., Gisbert, E. 2016. Morphological and functional description of the development of the digestive system in meagre *Argyrosomus regius* An integrative approach. *Aquaculture*, 464, 381-391. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.07.008
- Gisbert, E., Moreira, C., Castro-Ruiz, D., Öztürk, S. Fernandez, C., Gilles S., Nunez, J., Duponchelle, F., Tello, S., Renno, J.F., Garcia-Davila, C., Darias, M.J. 2014. Histological development of the digestive system of the Amazonian pimelodid catfish *Pseudoplatystoma punctifer*. *Animal*, 8(11), 1765-1776. doi: 10.1017/S1751731114001797
- Öztürk, S., Avcı, H. 2017. Gökkusagi Alabalıklarında *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792 bakır sülfat pentahidrat ile oluşturulan akut ve kronik bakır toksikasyonunda patolojik incelemeler. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*. 33(2), 97-106.
- Küçük, S., Öztürk, S., Çoban, D. 2016. Su Ürünlerinde Kullanılan Anestezikler. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(2), 79-85.

2.PROJELER

Farklı Tank Ortamlarının ve Yem İçeriklerinin Çipura Sparus aurata Yavrularının Büyüme Parametreleri Üzerine Etkisi, Araştırmacı. (BAP Araştırma Projesi- ZRF-15038, Sonuçlandı/2015).

3.BİLDİRİLER

1.Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

- Kırım, B., Keskin, D., Midilli, S., Güler, M., Yılmaz, E., Çoban, D., Yıleri, K.A. (2018). Hayatdan zevk almak, Yavas yemek, Yavas balık. Uluslararası Tarım, Sağlık ve Çevre Kongresi (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)
- Midilli, S., Güler, M., Çoban, D. (2018). Kültür Kosullarında Asya Kedi Balığı (*Pangasius hypophthalmus*) Ve Avrupa Yılan Balıklarında (*Anguilla anguilla*) Meydana Gelen Süpersatürasyon Vakası. ICAEH Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi International Agriculture, Environment and Health Congress (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- Kırım, B., Keskin, D., Güler, M., Midilli, S., Yılmaz, E., Çoban, D., Yıleri, K.A. (2018). Sülüklerin genel biyolojisi ve alternatif tıpta kullanımı. Uluslararası Tarım, Sağlık ve Çevre Kongresi (Özet Bildiri/Poster)
- Küçük, S., Öztürk, S., Güler, M., Çoban, D. (2017). Histological Changes on Electric Yellow Fish (*Labroabidochromis caeruleus*) Exposed to Acute and Chronic Cadmium and Recovery. Aquaculture Europe 17 Cooperation for Growth (Özet Bildiri/Poster)
- Kırım, B., Yılmaz, E., Midilli, S., Güler, M., Çoban, D. (2017). Recirculation Aquaculture Systems (RAS) in Aquaculture. II. Uluslararası İçdir Sempozyumu (Özet Bildiri/Poster)
- Öztürk, S., Çoban, D., Kırım, B., Güler, M., Yılmaz, E., Önder, C., Ilgaz, S. (2017). Effects of Different Growing Parameters On The Growth Parameters of The Young Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). VIII International Agriculture Symposium AGROSYM 2017 (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)
- Güler, M., Çoban, D., Öztürk, Y., Küçük, S., Kırım, B., Yılmaz, E., Öztürk, S. (2017). Desiccation Tolerances of Freshwater Mussels from Çine River (Western Anatolia, Turkey). I st International Symposium on Limnology and Freshwater Fisheries (Özet Bildiri/Poster)
- Öztürk, S., Birincioğlu, S.S., Avcı, H., Önder, C. (2014). Pathological Findings in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792 Naturally Infected with *Lernaea* spp. FABA 2014: International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences (Tam Metin Bildiri/Poster)

Öztürk, S., Saka, Ş., Fırat, M.K., Suzer, C., Çoban, D. (2011). Ontogeny of the Alimentary Tract in Cultured Shi Drum *Umbrina cirrosa* L Larvae. European Aquaculture 2011 Larvanet Meeting (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

2.Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Küçük, S., Midilli, S., Çoban, D. (2019). Nakil aşamasında asya kedi balıklarında (*Pangasius hypthalmus*) stres parametrelerinin değişimi. 20. Su Ürünleri Sempozyumu (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Çoban, D., Midilli, S., Kırım, B., Güler, M., Yılmaz, E., Önder, C., Ilgaz, S. (2017). Stok Yoğunluğu, Farklı Besleme Rejimi ve İyot İlavesinin Endüstriyel Çipura (*Sparus aurata*) Yetistireciliğine Etkisi. 19. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Sinop (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Öztürk, S., Avcı, H. (2017). Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Bakır Sülfat Pentahidrat ile Oluşturulan Bakır Toksikasyonunda Patolojik İncelemeler. 19. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Küçük, S., Öztürk, S., Güler, M., Çoban, D. (2017). Kadmiyuma Maruz Bırakılmış Sarı Prenses (*Labidochromis caeruleus*) Balıklarında Dokusal Değişiklikler Üzerine Bir Çalışma. 19. Su Ürünleri Sempozyumu (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Öztürk, S., Yıldırım, Ş., Yurttaş, C., Suzer, C., Çoban, D. (2015). Ağ Kafeslerde Yetistirilen Mavi Yüzgeçli Orkinos'un *Thunnus thynnus* Linnaeus 1758 Kültür Kosullarındaki Cinsiyet Gelişimi. 18. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Midilli, S., Epikmen, E.T., Avcı, H. (2012). Gökkuşuğu alabalığında *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792 nefrokalsinosis olgusu. FABA 2012 Balıkçılık ve Akvatik Bilimler Sempozyumu (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Midilli, S., Saka, Ş., Fırat, M.K., Suzer, C., Çoban, D. (2011). Minekop *Umbrina cirrosa* L Larvalarında 0-40 gün Gastrointestinal Sistem Gelişimi. 16. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

4.YAZILAN ULUSAL/ULUSLARARASI KİTAPLARDAKİ BÖLÜMLER

Demircan, M.D., Midilli, S., Dereli Gür, M., Otgucuoglu, Ö. 2020. Disease problems of marine cultured fish in Turkey: Agents, detection and treatments, D. Çoban, M.D. Demircan, D.D. Tosun (Eds.), *Marine Aquaculture in Turkey: Advancements and Management*, Turkish Marine Research Foundation içinde (1. bs., ss. 50-68). İstanbul: Turkish Marine Research Foundation.