



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



IRAK'TA AYNALI SAZANLARDA (*Cyprinus Carpio* L)
SEPTİSEMİYE NEDEN OLAN *AEROMONAS HYDROPHILA*
BAKTERİSİNİN DENEYSEL ENFEKSİYONUN PATOLOJİK VE
ÖNLEYİCİ OLARAK İNCELENMESİNE YÖNELİK BİR
ÇALIŞMA

Dhamyaa ALFARAG

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK

ANKARA
2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IRAK'TA AYNALI SAZANLARDA (*Cyprinus Carpio* L)
SEPTİSEMİYE NEDEN OLAN *AEROMONAS HYDROPHILA*
BAKTERİSİNİN DENEYSEL ENFEKSİYONUN PATOLOJİK VE
ÖNLEYİCİ OLARAK İNCELENMESİNE YÖNELİK BİR
ÇALIŞMA

Dhamyaa ALFARAG

VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİRİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK

İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. M. Luay Abbas Al-TEMIMY

ANKARA
2024

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Fakültesi Müdürlüğü'ne

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “İrak'ta Aynalı Sazanlarda (*Cyprinus Carpio* L) Septisemiye Neden Olan *Aeromonas Hydrophila* Bakterisinin Deneysel Enfeksiyonun Patolojik ve Önleyici Olarak İncelenmesine Yönelik Bir Çalışma” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim

Öğrencinin adı ve soyadı: Dhamyaa ALFARAG

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında

Dhamyaa ALFARAG tarafından hazırlanan “Irak'ta Aynalı Sazanlarda (*Cyprinus Carpio* L)

Septisemiye Neden Olan *Aeromonas Hydrophila* Bakterisinin Deneysel Enfeksiyonun

Patolojik ve Önleyici Olarak İncelenmesine Yönelik Bir Çalışma " adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Raportör

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Irak'ta Aynalı Sazanlarda (*Cyprinus Carpio* L) Septisemiye Neden Olan *Aeromonas Hydrophila* Bakterisinin DeneySEL Enfeksiyonun Patolojik ve Önleyici Olarak İncelenmesine Yönelik Bir Çalışma

Bu tezde *Cyprinus carpio* adi sazan balığında *Aeromonas hydrophila*'nın korunmasında Doksisisiklinin rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma, enfekte balıklardan *A.hydrophila*'nın izolasyonunu içermektedir. Bu çalışma, Bağdat'ın güneyindeki Zafaraniya'da bulunan Bilim ve Teknoloji Bakanlığı, Tarımsal Araştırma Dairesi, Hayvan ve Balıkçılık Merkezi, Balık Bölümü, Balık Besleme Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Geleneksel bakteri karakterizasyonu koloni şekli, mikroskopi ve biyokimyasal yöntemlerle sağlanmıştır.

Deney Nisan 2023 ile Eylül 2023 arasındaki dönem içinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, ortalama 250 ± 5 g ağırlığında 96 adi sazan örneği toplanmıştır. *Aeromonas hydrophila*'nın ortalama öldürücü doz LD50'sini belirlemek için 36 balık kullanıldı. LD50 15 gün boyunca $1,57 \times 10^6$ (CFU / ml) idi ve 60 balık rastgele üç tedavi grubuna dağıtıldı. Pozitif kontrol grubu, negatif kontrol grubu ve birbirini izleyen beş gün boyunca 20mg/kg/besin Doksisisiklin verilen tedavi grubu. Negatif grup dışındaki tüm gruplara 15 gün boyunca 0,1 ml LD50 enjekte edilmiştir.

Adi sazanda *A. hydrophila* enfeksiyonunun klinik semptomları arasında pul kaybı, kanama, deride koyulaşma ve ülserasyon yer almaktaydı. Ayrıca, iç organlarda karaciğer soluk renkte, büyümüş ve böbreklerde nekrotik odaklar ile hemorajiler gözlemlendi.

In vitro olarak *A. hydrophila* tarafından geliştirilen inhibisyon zonu farklı antibiyotiklere karşı farklı tepkiler göstermiş, gentamisin, siprofloksasin, amikasin ve doksisisikline karşı sırasıyla 42,44, 41,74, 39,00 ve 35,30 mm'lik inhibisyon zonuyla duyarlı iken, trimetoprim ve ampisiline karşı direnç göstermiştir. Bunun yanı sıra, *A. hydrophila*'nın farklı konsantrasyonlarda antibiyotik Doksisisiklin ile karşılaştırıldığında MIC değeri 1,56 µg/mL olarak bulunmuştur.

Hematolojik parametreler (kırmızı kan hücreleri, % dolu hücre hacmi ve hemoglobin) kontrol negatif grup ve tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında (G2) da anlamlı ($P \leq 0,05$) bir düşüş göstermiştir. Ayrıca, sonuçlar kontrol pozitif grupta (G2) tedavi edilen ve kontrol negatif gruplara kıyasla beyaz kan hücrelerinde anlamlı bir artış ($P \leq 0,05$) olduğunu göstermiştir.

Karaciğer enzimleri (AST, ALT ve ALP) için sonuçlar sırasıyla G3 ve G1 gruplarıyla karşılaştırıldığında G2'de anlamlı ($P \leq 0,05$) artış olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, G1 grubu ile karşılaştırıldığında G3'te anlamlı bir artış ($P \leq 0,05$) olduğu görülmüştür. Ayrıca, albumin seviyelerinin sonuçları G1 grubunda sırasıyla G3 ve G2 gruplarına kıyasla anlamlı ($P \leq 0,05$) artış göstermiştir. Buna ek olarak, total protein seviyeleri G1 grubunda sırasıyla G3 ve G2 gruplarına kıyasla anlamlı ($P \leq 0,05$) bir artış gösterirken, G3 grubunda G2 grubuna kıyasla anlamlı ($P \leq 0,05$) bir artış görülmüştür. G2 ve G3 gruplarında plazma kolesterol seviyeleri kontrol negatif grubuna (G1) kıyasla önemli ölçüde ($P \leq 0,05$) artarken, glukoz seviyeleri kontrol negatif grubuna (G1) kıyasla sırasıyla G2 ve G3 gruplarında önemli ölçüde ($P \leq 0,05$) artış göstermiştir. Sonuç olarak, bu çalışma doksisisiklinin adi sazan balıklarında *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı etkili olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: *Aeromonas hydrophila*, Balık, *Cyprinus carpio*, Doksisisiklin, Septisemi

SUMMARY

A Study On Pathological and Preventive Examination of Experimental Infection of *Aeromonas Hydrophila* Bacteria Causing Septicaemia in Mirror Carp (*Cyprinus Carpio* L) in Iraq

The study aimed to know the role of Doxycycline in the protective of *Aeromonas hydrophila* in carp fish *Cyprinus carpio*. The study included the isolation of *A. hydrophila* from infected fish. This study was carried out in the Fish Nutrition Laboratory, Fish Department, Animal and Fisheries Center, Agricultural Research Department, Ministry of Science and Technology in Zafaraniya south of Baghdad. Conventional bacterial characterization was achieved by colony shape, microscopy and biochemical methods.

The experiment was carried out for the period between April 2023 to September 2023. For this purpose, 96 samples of common carp were collected at average weight of 250 ± 5 g. Where 36 fish were used to determine the median lethal dose LD₅₀ of *Aeromonas hydrophila*, the LD₅₀ was 1.57×10^6 (CFU/ml) for 15 days, and 60 fish were randomly distributed to three treatment groups. As follows: a negative control group, a positive control group and treatment group given 20mg/kg/diet of Doxycycline for five consecutive days. All groups except the negative group were injected with 0.1 ml LD₅₀ for 15 days in all treatments.

Clinical symptoms of *A. hydrophila* infection in common carp included Loss of scales, hemorrhage and darkening of the skin and ulceration. Furthermore, internally the liver was enlarged with pale color and there was congestion in the internal organs, and the kidneys showed hemorrhagic with necrotic patches.

In vitro, the zone of inhibition developed by *A. hydrophila* presented various responses for different antibiotics, it was sensitive to Gentamicin, Ciprofloxacin, Amikacin and Doxycycline with a zone of inhibition (42.44, 41.74, 39.00 and 35.30 mm) respectively, while it was resistance to Trimethoprim and Ampicillin. As well as, the MIC of *A. hydrophila* when challenged with different concentrations of antibiotic Doxycycline was found 1.56µg/mL.

Hematological parameters (red blood cells, % of packed cell volume and hemoglobin) showed a significant ($P \leq 0.05$) decrease in (G2) as compared to the control negative group and treated group. Moreover, the results indicated a significant increased ($P \leq 0.05$) in white blood cells in control positive group (G2) as compared to treated and control negative groups.

For liver enzymes (AST, ALT and ALP) the results revealed significant ($P \leq 0.05$) increase in G2 as compared with G3 and G1 groups, respectively. In addition, it was noticed a significant increases ($P \leq 0.05$) in G3 when compared with G1 group. Furthermore, the results of Albumin levels showed significant ($P \leq 0.05$) increase in G1 group as compared with G3 and G2 groups respectively. In addition, total protein levels significantly increased ($P \leq 0.05$) in G1 as compared to G3 and G2 respectively as well as there was a significant ($P \leq 0.05$) increase in G3 as compared with G2 group. The results of plasma cholesterol levels in G2 and G3 groups increased significantly ($P \leq 0.05$) as compared to the control negative group (G1) the results of glucose levels revealed that there were a significant ($P \leq 0.05$) increase in G2 and G3 groups respectively as compared with control negative group (G1). In conclusion, the present study showed that Doxycycline could be used as an effective treatment against *A. hydrophila* infection in common carp fish.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Cyprinus carpio*, Doxycycline, Fish, Septicemia

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	2
1.2. Etiyoloji	3
1.2.1. Sınıflandırma	3
1.2.2. Morfoloji ve Boyama	4
1.2.3. Koloni Morfolojisi	5
1.2.4. Biyokimyasal Özellikleri	5
1.2.5. Fiziksel ve Kimyasal Faktörlere Karşı Duyarlılık	6
1.2.6. Antijenik Yapı	6
1.2.7. Virülan Faktörler	7
1.2.7.1. Tip II Sekresyon Sistemi ve Efektör Proteinleri	7
1.2.7.2. Tip III Sekresyon Sistemi ve Efektör Proteinler	7
1.2.7.3. Tip VI Sekresyon Sistemi ve Efektör Proteinler	8
1.2.7.4. Biyofilm Oluşumu	9
1.2.7.5. Flagella ve Pilus	9
1.2.7.6. Yapısal Proteinler, Fosfolipidler ve Polisakkaridler	10
1.2.7.7. Hemolizinler	10
1.2.7.8. Kollajenaz, Serin Proteaz, Metalloproteaz, Enolaz ve Lipaz	10
1.2.7.9. Diğer Virülans Faktörleri	11
1.3. Patojenez ve Epidemiyoloji	11
1.3.1. Klinik Bulgular	11
1.3.2. Patolojik Sonuçlar	13
1.4. Tanı ve Ayırıcı Tanı	14
1.5. Tedavi Stratejileri	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. Gereçler	18
2.2. Yöntemler	19
2.2.1. Kullanılan <i>A. hydrophila</i> Suşu	19
2.2.2. İzolasyon ve Karakterizasyon	20
2.2.2.1. Gram Boyama	20
2.2.2.2. Mikroskopik morfoloji	20
2.2.2.3. Hareket Muayenesi	20
2.2.3. Biyokimyasal Özellikler	20
2.2.3.1. Oksidaz Testi	20
2.2.3.2. Katalaz Testi	21
2.2.3.3. Hemolitik Aktivite	21
2.2.3.4. Jelatin Sıvılaştırma Testi	21
2.2.3.5. Laktoz Testi	21

2.2.3.6. Üçlü Şekerli Demir (TSI) Agarlarında Reaksiyonlar	21
2.2.4. Rimler ve Shotts Ortamı	22
2.2.5. Kanlı Agar	22
2.2.6. MacConkey Agarı	22
2.2.7. Medyan Ölümcül Dozun Saptanması (LD50)	22
2.2.8. Yayma Yöntemi ile Bakteri Sayımı	23
2.2.9. Doksisilinin Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonu	23
2.2.10. Antibiyotik Duyarlılık Testi	24
2.3. Deneysel Balık	24
2.4. Besinlerin Üretimi	25
2.5. Çalışma Planı	26
2.6. Kan Alma	27
2.7. Hematolojik Parametreler	28
2.7.1. Toplam Kırmızı Kan Hücresi (Eritrosit veya RBC) Sayımları	28
2.7.2. Toplam Beyaz Kan Hücresi (WBC) Sayımı	29
2.7.3. Kan Hücresi Değerinin Belirlenmesi	29
2.7.4. Hemogloblin (Hb) İçeriği	29
2.8. Biyokimyasal Parametreler	30
2.8.1. Karaciğer Enzimleri (ALT, AST ve ALP)	30
2.8.2. Toplam Proteinler	30
2.8.3. Albumin	30
2.9. İstatistiksel Analiz	30
3. BULGULAR	31
3.1. <i>A. hydrophila</i> 'nın <i>C. Carpio</i> 'dan İzolasyonu	31
3.1.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikler	31
3.1.2. <i>A. Hydrophila</i> 'nin LD50 Değerinin Saptanması	33
3.2. Tedavi Öncesi Klinik Belirtiler	33
3.3. <i>A. hydrophila</i> 'nın Antibiyotik Duyarlılık Bulguları	34
3.4. Doksisiklinin <i>A. hydrophila</i> 'ya Karşı Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonu (MIC)	35
3.5. Hematolojik Parametreler	35
3.5.1. Kırmızı Kan Hücreleri (RBC) Sayımı	35
3.5.2. Beyaz Kan Hücreleri Sayımı	36
3.5.3. Kan Hücresi Oranı (PCV %)	36
3.5.4. Hemogloblin İçeriği (Hb g/dl)	36
3.5. Karaciğer Hasarı Enzimleri (ALT, AST ve ALP)	37
3.6. Toplam Protein, Albumin, Glukoz ve Kolesterol	38
4. TARTIŞMA	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49
EKLER	66
ÖZGEÇMİŞ	66

ÖNSÖZ

Bu çalışmada sazan balığı *Cyprinus carpio*'da *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonuna karşı Doksisisiklinin koruyucu rolü değerlendirilmiştir. Bu çalışma, Bağdat'ın güneyindeki Zafaraniya'da bulunan Bilim ve Teknoloji Bakanlığı, Tarımsal Araştırma Dairesi, Hayvan ve Balıkçılık Merkezi, Balık Bölümü, Balık Besleme Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Enfekte balıklardan alınan örneklerden bakteri izolasyonu, ardından koloni şekli, mikroskopi ve biyokimyasal yöntemlerin yanı sıra antibiyotik duyarlılık testi ve Doksisisiklin için MIC ile geleneksel bakteri karakterizasyonu sağlanmıştır. Bu Tez çalışmasında, *Aeromonas hydrophila*'nın *in vivo* ortalama öldürücü doz (LD50)'si belirlenmiştir. Ayrıca, mevcut çalışma deney grupları arasında kan ve biyokimyasal parametrelerdeki (RBC, Hb, PCV%, WBC, ALP, AST, ALT, Total protein, Albumin, Kolesterol ve Glikoz) farklılıkları göstermiştir.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman yol gösteren, tez konusunu seçerken de isteklerimi dikkate alıp bana yardımcı olan danışmanlarıma teşekkür ederim. Bu süreç boyunca tüm sorularıma içtenlikle cevap veren, yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen ilk danışmanım Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK'a teşekkürlerimi sunarım. Ankara Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine, Irak'tan Al-Qasim Green Üniversitesi'nden Dr. Ali IBRAHİM'e tavsiyeleri için ve iş arkadaşım Dr. Haider Salih'e teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarımı tamamlamam için bana maddi destek sağlayan Irak Hükümetine de teşekkür ederim. Son olarak, en büyük teşekkür ve minnettarlığımı ilk ve daimî destekçim olan eşim Luay ALARAJI'ye, çocuklarım Ahmed, Ameer ve Zahraa'ya, çocuklarımin eşlerine (Maryam ve Sara), kız ve erkek kardeşlerime sunarım. Çabalarımin meyvesini ilk öğretmenim, Allah'ın Elçisi Muhammed'e, babamın, annemin ve kardeşim şehit Maytham'ın ruhuna ithaf ediyorum.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AerA	Aerolizin A
AHH1	Hücre dışı ısıya dayanıklı hemolizin
AHL	N-hekzanoil-L-homoserin laktonlar
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
BHI	Beyin-Kalp İnfüzyonu
BHL	N-(bütanoil)-L-homoserin laktonlar
EUS	Epizootik ülseratif sendrom
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FlaN	Flagella sayısını düzenler
Hb	Hemoglobin
Hcp	Hemolizinle düzenlenmiş protein
HlyA	Hemolizin A
IP	İntraperitoneal olarak inoküle edilmiş
Kg BW	Kilogram vücut Ağırlığı
LD50	Medyan Ölümcül Düz
LSD	En az anlamlı fark
MAS	Motil Aeromonas septisemi
PCA	Plaka agar besiyeri
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PCV	Kan hücresi oranı
RBCs	Kırmızı kan hücresi
RT	Gerçek zamanlı
SAP	Yüzey dizi proteini
SAS	İstatistiksel Analiz Sistemi
T2SS	Tip II sekresyon sistemi
T3SS	Tip III sekresyon sistemi
TCBS	Tiyosülfat sitrat safra tuzları sukroz
TSA	Trypton soya agarı
TSI	Üçlü şeker demiri
VpsT	Transkripsiyonel yanıt regülatörü
VrgG	Valin glisin tekrarı G
VS	Yayılma hacmi
WBCs	Beyaz kan hücreleri

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Yayma yöntemi ile bakteri kolonilerinin sayımı	23
Şekil 2.2. Mevcut çalışmanın aşamaları	25
Şekil 2.3. Araştırmanın tüm aşamalarını gösteren bir diyagram	27
Şekil 3.1. TSA agarda üreyen <i>A. hydrophila</i> bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri	31
Şekil 3.2. Kanlı agarda (A) <i>A. hydrophila</i> kolonilerinin karakteristiği; MacConkey agarda (B) soluk (laktoz fermentörü olmayan) koloniler	31
Şekil 3.3. <i>A. hydrophila</i> izolatlarının biyokimyasal özellikleri: (1): Sitrat kullanımı için negatif sonuç (2): indol testi için pozitif sonuç. (3): Manitol testi için pozitif sonuç	32
Şekil 3.4. Patolojik değişiklikA: deri ülserasyonunu gösteren B: iç organların hemorajik olduğunu gösteren balık	34
Şekil 3.5. <i>A. hydrophila</i> 'nın farklı antibiyotiklerinin inhibisyon zonu	35

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Bu çalışmada kullanılan cihazlar	18
Çizelge 2.2. Mevcut çalışmada kullanılan kimyasallar	19
Çizelge 2.3. Mevcut çalışmada kullanılan kültür besiyerleri	19
Çizelge 2.4. Deneyde kullanılan besinlerin içerikleri	26
Çizelge 3.1. <i>A. hydrophila</i> 'nın biyokimyasal ve morfolojik özellikler	32
Çizelge 3.2. <i>A. hydrophila</i> 'nın LD50 besiyerinin sonuçları	33
Çizelge 3.3. Seçilen antibiyotiklere karşı <i>A. Hydrophila</i> 'nın hassasiyeti	34
Çizelge 3.4. Doksisiklin (20mg/kg/besin) ile tedavi edilen <i>A.hydrophilia</i> ile enfekte <i>C. carpio</i> 'nun bazı hematolojik parametrelerinin değerleri (Ortalama $\pm$ SE)	37
Çizelge 3.5. Doksisiklin (20mg/kg/besin) ile tedavi edilen <i>A.hydrophilia</i> ile enfekte <i>C. carpio</i> 'nun karaciğer enzimlerinin değerleri (Ortalama $\pm$ SE)	38
Çizelge 3.6. Doksisiklin (20mg/kg/besin) ile tedavi edilen <i>A.hydrophilia</i> ile enfekte <i>C. carpio</i> 'nun biyokimyasal parametrelerinin seviyeleri (Ortalama $\pm$ SE)	39

1. GİRİŞ

Su ürünleri teknikleri kapsamlı ve uzun bir geçmişe sahiptir, ancak sektörün bir besin kaynağı olarak kullanımı küresel ölçekte nispeten yenidir. FAO'ya (2016) göre, su ürünlerine atfedilebilecek küresel balık üretiminin oranı giderek artmıştır. Su ürünleri yetiştiriciliği şu anda dünyadaki toplam balık üretiminin 80 milyon tonunu oluşturmaktadır (FAO, 2018) ve insan protein tüketimindeki yüzdesinin artacağı tahmin edilmektedir (Bostock vd.,2010). Su ürünleri yetiştiriciliğinin son yirmi yılda muazzam bir şekilde genişlemesiyle birlikte, bulaşıcı hastalıklar da hızla yayılmıştır (Leung ve Bates, 2013).

Dünyada olduğu gibi Irak'ta da giderek gelişen balık üretimi, Irak'ta balık yetiştiriciliğinin tarihi geçen yüzyılın ortalarına kadar uzanmaktadır (Abid ve Al-Hamdani, 2016). Irak'taki balık çiftliklerinde bulunan başlıca balık türleri, ot sazanı (*Ctenopharyngodon idella*) adi sazan (*Cyprinus carpio* L.) ve gümüş sazan (*Hypophthalmichthys molitrix*) ile *Barbus xanthopterus*, *Barbus grypus* ve *Barbus sharpeyi* gibi yerel balık türleridir (Abid ve Al-Hamdani, 2016).

Su ürünleri yetiştiriciliği, özellikle yüksek besin değerine sahip hayvansal protein sağlaması, doğal kaynak stoklarını koruması, güçlendirmesi ve çevreyi koruması açısından, ülkelerin gıda güvenliğini sağlamak için güvenilebilecek birincil kaynak olarak önemlidir. (FAO, 2016). Su ürünleri yetiştiriciliği şu anda dünyanın en hızlı büyüyen gıda sektörüdür (Sudheesh vd., 2012) ve 2019 yılında küresel üretimi 85,3 milyon tondur. Dünya çapında birkaç milyon insanın geçimini sağlarken, özellikle gıda güvensizliğinin en yüksek olduğu bölgelerde beslenme ve gıda güvenliğine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır.

2018 yılında su ürünleri yetiştiriciliği küresel balık üretiminin %46'sına katkıda bulunmuştur, Asya ise miktar ve ekonomik değer bakımından küresel su ürünleri yetiştiriciliği üretiminin %80'ine hakim olmuştur. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), 2050 yılında insan nüfusundaki artışa paralel olarak dünyaki gıda ve yem arzında tahmini %70'lik bir artışın olacağını öngörmektedir. İnsan nüfusunun artması ve Asya-Pasifik bölgesindeki insanların giderek zenginleşen yaşam tarzının bir sonucu olarak, su ürünleri yetiştiriciliğine olan talebin 2030 yılına kadar %30 oranında artması beklenmektedir (De Bruijn vd.,2018).

Balıklarda salgınlara yol açan enfeksiyonlar, yüksek bulaşma ve ölümler sebebiyle ciddi ekonomik zararlara neden olabileceğinden su ürünleri yetiştiriciliği sektörü için büyük bir problemdir. Yoğun balık yetiştiriciliği nedeniyle patojen mikroorganizmaların bulaşması ve yayılması daha kolaydır. Genellikle bu tür yıkıcı salgınlara birincil nedenidir (Rohani vd., 2022). Bazı balık enfeksiyonları epidemiyolojik olarak önem arz etmekte ve zoonotik hastalıklar olarak insanlara aktarılabilmektedir (Woertz, 2017). *A. hydrophila*, birçok balık türünde kutanöz ülserasyona, hemorajik sepsis ve akut vakalarda %80'e varan yüksek ölüm oranına neden olan önemli bir bakteriyel hastalıktır (Janda ve Abbott, 2010).

Çevre, konakçı ve patojen arasındaki sıkı ilişki hastalığının ortaya çıkması ve ilerlemesi sağlar. Popülasyon yoğunluğu, su sıcaklığındaki değişimi ve oksijensizlik gibi stresli koşullar, patojenik bakterilerin yayılmasını hızlandırabilir ve büyük hastalık salgınlara neden olabilir (Hamed vd., 2018). *Aeromonas* türleri, *Aeromonas septicus* de (Thirumalaikumar vd., 2021) dahil olmak üzere bir çok semptomu neden olmaktadır. *Aeromonas* türleri, balık türlerindeki çeşitli bakteriyel enfeksiyonlar, tatlı su ve tropikal ortamlarda meydana gelen ve kültür balıklarında bakteriyel kanamaya neden olan çok sayıda balık türünde en yaygın bakteriyel patojen türleri arasındadır (Ramesh vd., 2018).

Aeromonas hydrophila daha çok tatlı su kültür balıkçılığında salgınlara sebep olarak küresel bazda gıda problemleri ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. (Mzula vd., 2019). *A. Hydrophila*; Japon balığı, adi sazan, yayın balığı, tilapia balıkları ve yılan balıkları gibi farklı yüzgeçlere sahip balık türlerini etkiler. Bu balıklarda hemorajik sepsis, hemorajik enterit, epizootik ülseratif sendrom (EUS) ve kırmızı cisim hastalığı gibi çeşitli semptomlarla kendini belli eder (Thirumalaikumar vd., 2021).

1.1. Tarihçe

Hastalığın ilk raporlanması 1891'e dayanmakta olup, Sanarelli (1891) tarafından ilk izolatlar *Bacillus hydrophilus fuscus* (şimdi *Aeromonas hydrophila*) olarak adlandırılmıştır. Organizma Aeromonadaceae familyasına aittir ve *Aeromonas* cinsi ilk olarak Almanya'da Chemnitz'in içme suyu kaynağından bakteri çıkarmak için jelatin agar kullanan Zimmermann (1890) tarafından tanımlanmıştır. Organizmaya verilen isim "*Bacillus punctatus*" olmuştur. Sanarelli (1891) kurbağa kanı ve lenfinden benzer bir bakteri tanımlamış ve buna "*Bacillus*

hydrophilus fuscus” adını vermiştir, ancak Chester 1901’de bu adı “*hydrophilium*” olarak değiştirmeyi önermiştir.

Fakat, Bergey’s Manuel’in ilk baskısında bu tür, yanlışlıkla “*Proteus hydrophilus*” olarak adlandırılmıştır. *Aeromonas* cinsi, kurbağalardaki septisemilerden ve hasta balıklardan ilk izolasyonundan bu yana bir hayvan patojeni olarak kabul edilmektedir (Beaz-Hidalgo vd., 2010) Önemli balık patojeni türleri *A. salmonicida* ve *A. hydrophila* olup, özellikle salmonidleri etkileyerek ülser, kanama, frunkuloz ve septisemilere neden olmaktadır (Beaz-Hidalgo vd., 2009). Bu hastalıklar su ürünleri yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Rasmussen-Ivey vd., 2016; Vincent vd., 2019) *A. hydrophila* ’nın hipervirülen bir suşunu sıcak su balıklarında dünya genelinde salgınlara neden olan bir ajan olarak tanımlamıştır.

Aeromonas hydrophila, gıda kaynaklı bir patojen olarak zoonotik hastalıklara neden olmaktadır (Guz ve Kozinska, 2004). Konak dokuda üzerinde lokalize patolojik problemlere neden olabilir. Konakta doku dejenerasyonu, doku proliferasyonu ve inflamasyon görülebilir. (Stratev vd., 2015). *A. hydrophila* yalnızca sürüngenler, balıklar ve amfibiler için değil, aynı zamanda memeli hayvanlar ve insanlar için de patojenik bir ajan olabilir (Hanson, 2011; Stratev vd., 2015; Trott, 2006). *A. hydrophila* tatlı ve tuzlu su balıklarından izole edilebilmektedir (Dias vd., 2016; Janda ve Abbott, 2010; Trott, 2006). Özellikle yüksek organik yüke sahip tatlı su ortamları *A. hydrophila*’nın doğal yaşam alanları olarak kabul edilmektedir. ABD ve Japonya’da yapılan son çalışmalar ise balıkların bağırsak florasının bir parçası olabileceğini göstermektedir (Sreedharan vd., 2012). Hareketli *Aeromonas septisemisi* kronik olarak haftalarca görülebilir. Bu süreçte mortalitede kademeli olarak bir artış şekillenebilir (Plumb ve Hanson, 2010; Zhang vd., 2020).

1.2. Etiyoloji

1.2.1. Sınıflandırma

Mevcut taksonomiye göre, *Aeromonas* şu anda 30’dan fazla cins spesifik olarak sınıflandırılmaktadır (Erdem vd., 2011). *A. hydrophila* çomak şeklinde, gram-negatif, heterotrofik, serbest yaşayan, 1,3-3,5 µm arasında çapa ve 1,0-3,5 µm arasında uzunluğa sahip bir bakteridir. Zaman zaman deniz suyunda izole edilmesine rağmen, bu bakteri en sık tatlı

suda bulunmuştur. Özellikle devir daim suyu olan sistemlerde en yaygın balık hastalıkları arasındadır (Laith ve Najiah, 2014).

Bakterilerdeki antibiyotik direnci dünya çapında bir sağlık sorunu haline gelmektedir. *A. hydrophila* mikroorganizması su, toprak ve gıda dahil olmak üzere çok çeşitli doğal ortamlarda tespit edilmiştir. Aeromonadaceae ailesi, *Aeromonas* türleri olarak bilinen gram negatif, fakültatif anaerobik bakterileri içerir. *Aeromonas*, *Oceanimonas* ve *Tolumonas* *Aeromonad*'ların hepsi *Gammaproteobacteria* cinsi *Aeromonas* türleridir (Janda ve Abbott, 2010). Aeromonaslar; sınıf olarak *Gammaproteobacterias* sınıfına, takım olarak *Aeromonadales* takımına ve ve familya olarak ise *Aeromonadaceae* familyasına aittir.

Aeromonas, yeraltı suları, göller, içme suyu ve atık sular dahil olmak üzere suda yaşayan bir bakteri cinsidir. Bu organizma, çeşitli beslenme ve su kaynaklarının yanı sıra suda rekreasyon yoluyla insanlara bulaşır (Mailafia, 2021). *Aeromonas* cinsi, yüksek riskli bir patojen taşıyıcısı olarak tanımlanmıştır (Reshma vd., 2015). Aynı zamanda doğal olarak birçok hayvanın flora bakterisi olarak da bulunur. İkincil bir biyolojik ajan olarak bu fırsatçı bakteri, balık hastalıklarının başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunur (FAO, 2016).

Aeromonas suşları, diğer virülans faktörlerinin yanı sıra enterotoksinler, hemolizinler ve sitotoksinler üretebilir (Kumar vd., 2015). Su ortamında 10 bakterinin yaygın varlığı ve yoğun üremenin neden olduğu stres, hastalık için risk faktörleridir. Bu bakteri su ürünlerinde hızlı bir şekilde yayılır ve predispozan bir stres faktörü mevcut olduğunda önemli kayıplara neden olabilir (Plumb ve Hanson, 2010). Çeşitli balık türlerinde deri ülserasyonuna, hemorajik sepsisemiye ve akut vakalarda %80'e varan yüksek ölüm oranına neden olur (Janda ve Abbott, 2010).

1.2.2. Morfoloji ve Boyama

A. hydrophila, 1,0-3,5 µm uzunluğunda, sporsuz, anaerobik, gram-negatif, oksidaz-pozitif filamentli bir bakteridir. (Martin-Carnahan ve Joseph, 2005). Virülans faktörlerinin iki kategorisi hücreyle ilişkili yapılar ve hücre dışı ürünlerdir. Flagella, dış membran proteinleri, lipopolisakkaritler ve kapsüller kılcal hücrelerle ilişkili yapılardan bazılarıdır. Sitotoksik ve hemolitik proteinlerin yanı sıra enterotoksik proteinler en önemli hücre dışı ürünlerdir (Washington, 2006).

Bakteriler, 20-25°C’de 24-48 saat inkübasyondan sonra Nutrient agar veya Triptik soya agar (TSA) gibi seçici olmayan besiyerlerinde veya Rimler-Shott’s besiyeri gibi seçici besiyerlerinde böbrek sürüntülerinden in vitro olarak izole edilmiştir (Austin vd., 2007). *A. hydrophila*’yı 28°C’de 18-24 saat boyunca TSA üzerinde koloniler oluşturmaktadır. *Aeromonas* izolatlarının biyotiplendirilmesi veya tanımlanmasında biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Genetik yaklaşımlar kullanılarak soyların yalnızca yüzde 28,5’i doğru bir şekilde tanımlanabilmektedir (Castro-Escarpulli vd., 2003).

1.2.3. Koloni Morfolojisi

Rimler Shotts besiyerinde *A. hydrophila*, sarı renkli koloniler oluşturur. Organizmalar RS besiyerine ekildiğinde, dört farklı türde koloni elde edilmiştir. İlk izole edilen koloni sarı renkte olup ve maltoz kullanımı pozitif. İkinci koloni sarı ve siyah renkli bir merkeze sahip olup, maltoz fermentasyonu ve H₂S pozitif. Üçüncü tür koloni, lizin veya ornitin dekarboksilasyonuna ya da her ikisine işaret eden yeşilimsi sarıdan yeşile kadar dönebilen tonlar ile karakterizedir. Dördüncü izole edilen koloni ise merkezi siyah renkli yeşil karakterde olup üçüncü izole edilen koloni ile aynı reaksiyonları göstermektedir. Ayrıca H₂S pozitif (Semwal vd., 2023).

RS agarda *A. hydrophila*’nın (CAHH14 suşu) küçük, küresel, pürüzsüz, dışbükey ve sarımsı koloniler oluşturmaktadır (Sahu vd., 2011). *A. hydrophila*’nın çeşitli suşları test edilen 6 besiyerinin hepsinde üremiştir. mA, McT, PXAm ve DNTA agarlarında 48 saat sonra bir suş gelişmiştir. Ancak, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerin gelişmesini önemli oranda azaltma yetenekleri nedeniyle, bu dört besiyeri en seçici olanlardır. (*Aeromonas* ve *Plesiomonas* türleri dışında) mA agar yüksek bir özgüllüğe sahiptir; *A. hydrophila* olarak tanımlanan koloniler %75’ten fazladır ve bu besiyerindeki kolonilerin yalnızca %3’ü yanlış negatif sonuç vermiştir (Arcos vd., 1988; Semwal vd., 2023).

1.2.4. Biyokimyasal özellikleri

İzole edilen kolonilerde; indol, katalaz testi, oksidaz testi, Voges prosakauar, sitrat kullanımı, Karbonhidrat kullanımı laktoz, glukoz, trehaloz, nişasta, jelatin hidrolizi ve üçlü şeker demir agar besiyeri gibi biyokimyasal testler pozitif. İzole edilen kolonilerin üreaz testi ve metil kırmızısı negatif olarak gözlenmiştir. Eosin metilen blue (EMB) agarda, izolat

yeşil metalik bir parlaklıkla  rer, bu durum da bakterinin laktozu kullandığını göstermektedir (Jayavignesh vd., 2011).

1.2.5. Fiziksel ve Kimyasal Faktörlere Karşı Duyarlılık

Sucul ortamlardaki mikroorganizmalar sıklıkla çeşitli stresli koşullara maruz kalmaktadır. Potansiyel stresler arasında besin sınırlaması, biyolojik etkileşimler, UV ışınları, ağır metaller, dezenfektanlar ve aşırı sıcaklık, pH ve tuz bulunmaktadır (McFeters ve Singh, 1991). Mikroorganizmalar  evresel strese belirli protein setlerini indükleyerek yanıt verir ve bir strese yanıt verme yeteneği genellikle aynı strese düşük dozda önceden maruz bırakılarak artırılır (Michel ve Starka, 1986; Parvis vd., 1996). Bazı durumlarda, aynı strese önceden maruz kalmak ya çapraz korumaya ya da farklı bir strese karşı duyarlılığın artmasına yol açabilir.

Deniz ve nehir ağzı sularında 500 Mm'a kadar çıkabilen yüksek tuz konsantrasyonlarına ve enfekte konağın düşük mide pH'ına maruz kalabildikleri için pH ve NaCl stresine yanıt enterik patojenler için özellikle önemlidir. Jayavignesh vd., (2011) *A. hydrophila* izolatının büyümesi üzerinde pH ve sıcaklığın etkisini araştırmış ve etkenin optimum üreme sıcaklığı olan 37 C'de iyi bir şekilde üreyebildiğini, aynı zamanda 4 C'de de üreme yeteneğine sahip olduğunu bildirmiştir.

Nispeten daha yüksek olan 41 C sıcaklıkta üremenin diğer sıcaklık derecelerine kıyasla az olduğu görülmüştür. Etken optimal olarak pH 9'da iyi bir şekilde üremektedir. Ancak pH 5 gibi düşük pH'larda az da olsa üreyebildiği bilinmektedir. Etken, İzolat, 50 C'lik bir sıcaklıkta üreme yeteneğine sahip değildir (Jayavignesh vd., 2011).

1.2.6. Antijenik Yapı

Aeromonas'ın patojenitesini hangi faktörlerin düzenlediğini belirlemedeki zorluklar, oldukça karmaşık bir taksonomiden (en az 11 farklı genetik grup) ve virülansla ilişkili özelliklerin çoğunun t re özgü olmayıp suş a özgü olmasından kaynaklanmaktadır. İnsanlarda *Aeromonas* kaynaklı gastroenterit vakalarında, ishal semptomlu hastalık sendromunu aslına uygun olarak yeniden üretebilecek uygun hayvan modelinin bulunmaması, bu organizmanın etiyolojik bir ajan olarak kesin bir şekilde belirlenmesinin önündeki engel olarak görülmektedir (Janda ve Duffey, 1988).

Bu fenotipin belirli bir alt grubunun üyeleri, ortak bir somatik antijen (serogrup O:11) ve fare patojenite çalışmalarıyla belirlendiği, hayvanlar için gelişmiş virülans dahil olmak üzere birkaç ek özelliği görülmektedir. Bugüne kadar, enfekte insanlardan elde edilen fenotipik olarak ilişkili bu O:11 suşlarının çoğu bakteriyemi ve peritonit vakalarından izole edilmiştir (Janda vd., 1987). Bu alt grubun bir diğer bağlantılı özelliği de hücre duvarının periferinde yer alan S tabakası şeklinde kristal bir yüzey dizi proteininin (SAP) varlığıdır (Paula vd., 1988); diğer oto-aglütinasyon fenotipleri bu bağlantılı özelliklerden yoksundur (sero grup O:11, fare patojenitesi ve S tabakası).

Dooley ve arkadaşları (Dooley vd., 1988) balıklarda (alabalık) açık patojeniteden sorumlu olan ve S tabakası pozitif olan benzer olmasa da benzer bir grup *A. hydrophila* suşu tanımlamıştır. Bu suşlar çalışmamızdaki suşlarımızla aynı antijenik özellikleri göstermektedir (serogrup O:11). Bu *A. hydrophila* izolatlarından birinin (TF7 suşu) S tabakası Dooley ve meslektaşları tarafından kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiş (Dooley vd., 1988) ve yaklaşık 52,000 molekül ağırlığında bir protein olduğu ve %41'i hidrofobik olan 520 amino asitten oluştuğu bulunmuştur. Bu diziler bakteri veya virülans faktörleri gibi görünmektedir (Dooley vd., 1988; Kokka vd., 1992).

1.2.7. Virülens Faktörleri

1.2.7.1. Tip II Sekresyon Sistemi ve Efektör Proteinleri

Korunan tip II sekresyon sistemi (T2SS) *A. hydrophila*'nın bilinen tüm üyelerinde mevcuttur ve aerolizin, amilazlar, DNazlar ve proteazlar dahil olmak üzere çok çeşitli virülans faktörlerinin hücre dışı salgılanmasında rol oynar (Pang vd., 2015; Peabody vd., 2003; Sandkvist, 2001; Tseng vd., 2009;). *A. dhakensis* SSU'da, T2SS tahmini en güçlü virülans faktörü olan aerolizin ile ilişkili olan sitotoksik enterotoksin Act'i salgılar (Galindo vd., 2004). Bununla ve T2SS ile etkileşime giren diğer virülans faktörleri için genler *A. hydrophila*'nın mevcut üyelerinde bulunsada, bu sistemin virülansa katkısı henüz tam olarak aydınlatılmamıştır (Cianciotto, 2005).

1.2.7.2. Tip III Sekresyon Sistemi ve Efektör Proteinler

Klinik izolatlarda sucul izolatlardan daha yüksek sıklıkta bulunan (Aguilera-Arreola vd., 2005; Pang vd., 2015) tip III sekresyon sistemi (T3SS), efektör toksinleri konak hücrelere

enjekte eden moleküler bir iğne işlevi görür (Galan ve Collmer, 1999; Sha vd., 2002; Sierra vd., 2010). *A. hydrophila*'nın kamuya açık genomik verilere sahip üyelerinde herhangi bir çalışma yapılmamış olmasına rağmen, T3SS'nin *Aeromonas* türlerinde konak hücrelerle temas, sitotoksik enterotoksin Act, DNA adenin metiltransferaz, flagella, lipopolisakkaritler, DNA metilasyonu, sıcaklık, kalsiyum/magnezyum seviyeleri ve quorum sensing ile birlikte düzenlendiği ve efektörlerin uygun salgılama sinyaline sahip olmasını gerektirdiği gösterilmiştir (Braun vd., 2002; Burr vd., 2003; Ebanks vd., 2006; Erova vd., 2006; Vilches vd., 2009).

A. hydrophila için yapılan bir çok çalışmada T3SS ve efektör proteinlerini virülans ile ilişkilendirmiştir. Halka açık nükleotid verilerine sahip bir mavi gurami (*Trichopodus trichopterus*) izolatu olan *A. hydrophila* AH-1'de (tüm genom mevcut değildir), aopB (T3SS translokatoru) ve aopD'nin (integral T3SS transmembran bileşeni) insersiyonel mutajenezi sitotoksitede azalmaya ve fagositozda artışa neden olur çünkü T3SS artık efektör proteinleri transloke edemez (Yu vd., 2004).

Yapılan başka bir çalışmada *A. hydrophila*'nın klinik izolatlar ile çevresel izolatlar karşılaştırılmış, bu karşılaştırma sonrasında T3SS yapısal genleri aopB ve ascV'nin *A. hydrophila* hastalık izolatlarında en sık görülen genler olduğunu belirlenmiştir (Carvalho-Castro vd., 2010). Bu durum da *A. piscicola* AH-3 ascV mutantlarında virülansın zayıflaması sonucunda desteklenen virülansla bir bağlantıdır (Vilches vd., 2004).

Ancak patojenik *A. hydrophila* izolatlarının genomik analizleri, çiftlik balıklarını enfekte eden hipervirulent *A. hydrophila* izolatlarının T3SS çekirdek bileşenlerinden yoksun olduğu göz önüne alındığında, alternatif sekresyon mekanizmalarının da patogeneze için kritik olabileceğini göstermektedir (Hossain vd., 2013; Pang vd., 2015).

1.2.7.3. Tip VI Sekresyon Sistemi ve Efektör Proteinler

Tip VI sekresyon sistemi (T6SS) bir faj kuyruğuna benzer şekilde işlev görür. Böylece virülans faktörlerinin valin glisin tekrar G (VrgG) proteinleri ve salgılandığında antimikrobiyal gözenek oluşturan bir protein veya yapısal bir protein olarak işlev gören hemolizin regüle eden protein (Hcp) aracılığıyla konakçı hücrelere enjekte edilmesini sağlar (Bingle ve ark, 2008). Yeni tanımlanan hipervirulent *A. hydrophila* patotipinin bazı üyeleri tatlı su balıklarında tam bir T6SS'ye sahipken, diğerleri yalnızca 4/13 çekirdek bileşenini

muhafaza etmektedir (Pang vd., 2015; Rasmussen-Ivey vd., 2016). GenBank'ta *A. hydrophila* olarak listeye giren 37 suşun 26 tanesinde dağılım gösteren T6SS'nin virülanstaki rolü, tam bir T6SS içeren bakterilerin çok daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir.

1.2.7.4. Biyofilm Oluşumu

Biyofilmler, bakterilerin hem antimikrobiyal ajanlara ve hem de konakçı savunmalarına karşı direnç sağlar (Costerton vd., 1995; Lynch vd., 2002). *Aeromonas* türleri virülans faktörlerinin üretimi ile yakın ilişkili olan biyofilm oluşumu için çoklu düzenleyici mekanizmalara sahiptir. Yeniden sınıflandırılan *A. piscicola* A1 (eski adıyla *A. hydrophila*) izolatının bakteriler arası iletişimin yanıt düzenleyicisi ahyRI, LuxRI homologları, N-(butanoyl)-L-homoserine lactones (BHL) ve N-hexanoyl-L-homoserine lactones (AHL) üretir; hücre bölünmesini düzenleyen otoindüktörlerdir (Swift vd., 1997).

Yakın zamanda karakterize edilen otoregülatör iki bileşenli sinyal iletim sistemi QseBC, *A. hydrophila* içinde yaygın olarak korunan bir sistemdir ve ilk olarak *A. dhakensis* SSU'da tanımlanmıştır, çünkü inaktif bir yanıt düzenleyicisine (QseB) sahip mutantlar yüzme ve sürü hareketliliğini azaltır, daha kalın biyofilmler oluşturur ve daha az virülans faktörü salgılar, bu da virülansın zayıflamasına neden olur. 1qseB mutantlarında aha 0701h geni aşırı eksprese edildiğinde, muhtemelen flhN (flagellar sayısını düzenler) ve vpsT (transkripsiyonel yanıt düzenleyici) genlerinin düzensizliği nedeniyle biyofilm oluşumu azalır (Khajanchi vd., 2012; Kozlova vd., 2012).

1.2.7.5. Flagella ve Pilus

A. hydrophila izolatları; lateral flagellayı yüzey hareketi/ısınma için ve polar flagellayı ise süspansiyonda hareket için üretir. Polar flagella üretimi *A. piscicola* AH-3 için incelenmiş, flaAB, flaH, fliA, fliM, maf1 ve flrC'deki mutasyonların polar flagella üretimini yok ederek yapışma ve biyofilm oluşumunun azalmasına sebep olmuştur (Canals vd., 2006). Flagellar glikozilasyonun Hep-2 hücrelerine yapışmanın yanı sıra biyofilm oluşturma kabiliyetiyle de bağlantılı olduğu göz önünde bulundurulduğunda, *Aeromonas* türleri arasında ciddi farklılıklar olduğunu bilmek gerekmektedir. *A. hydrophila* AH-1'de iki tane lateral flagellin bulunur ve yalnızca polar flagellum glikozillenmiştir. Bu sebeple, glikozilasyon negatif *A. hydrophila* AH-1 mutantlarında lateral flagellanın üretiminde bir aksama yoktur (Fulton vd., 2015).

1.2.7.6. Yapısal Proteinler, Fosfolipidler ve Polisakkaridler

Konak savunmasından kaçmak için kapsüller, O-antijenler ve S-tabakası proteinleri mekanizmalar sağlar. *Aeromonas* türlerinde kapsüller aynı zamanda anti-fagositik aktiviteye sahip olmasının yanında kompleman sistemine karşı direnci ve aderansı artırır (Martinez vd., 1995; Merino vd., 1997). O-antijenler, yapısal olarak çeşitli lipopolisakkaritlerden oluşan kolonizasyon faktörleri olarak işlev gören bir sınıftır.

1.2.7.7. Hemolizinler

Hemolizinler, *A. hydrophila* patogeneğinde rol oynayan ve enzimlerden oluşan bir gruptur (Asao vd., 1984; Wadstrom vd., 1976). Bu enzimlerin işlevleri çok fazladır. Hücre dışı ısıya dayanıklı hemolizin (AHH1), yaygın olarak dağılmış birkaç hemolizinin (AerA, AHH1, AhyA ve Asa1) en bol olanıdır ve en sitotoksik genotip aerA ve ahh1'in sinerjik bir kombinasyonudur (Hirono ve Aoki, 1991; Wang vd., 2003). *A. media* A6'da (eski adıyla *A. hydrophila*) Hemolysin A (hlyA) ve Aerolysin A (aerA), virülansın hem hlyA hem de aerA aktivitesi yok edildiğinde zayıflayan başka bir bileşenli hemolitik sistem oluşturur (Wong vd., 1998).

1.2.7.8. Kollajenaz, Serin Proteaz, Metalloproteaz, Enolaz ve Lipaz

A. hydrophila türleri elastaz, kollajenaz, lipaz, metalloproteaz, enolaz, ve serin proteaz dahil olmak üzere virülansa katkısı olacak çok çeşitli enzimleri eksprese eder. *A. piscicola* AH-3, *A. hydrophila* ATCC 7966T'nin açık okuma çerçevesi AHA_0517 sekans benzerliğine sahip bir kollajenaz içerir ve Vero hücreleri için sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Bu enzimin kaybı hücrelerin canlılığında %5-15'lik bir artışa neden olur; bununla birlikte, bu durum mutasyon sitotoksitenin tamamen yok olmasına neden olmaz (Duarte vd., 2015).

A. hydrophila AG2'nin ahpAB genleri (genomik verilere ulaşılamıyor) güçlü virülans faktörleri üretir: virülans için gerekli olmayan, ancak en virülan patotiplerde (AerA+Alt+Ahp+) bulunan bir hücre dışı proteaz, gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) test edildiğinde AhpB- mutantlarından 100 kat daha virülant bir LD50 ile ilişkili kazeinolitik ve elastolitik aktiviteye sahiptir (Cascon vd., 2000; Li vd., 2011; Rivero vd., 1991). Başka bir hücre dışı proteaz (epr) su kaplumbağa izolatu *A. hydrophila* AH1'de

keşfedilmiş ve hastalık görülen balıklarda en yaygın patotipte bulunduğu görülmüştür (Chang vd., 1997; Hu vd., 2012).

1.2.7.9. Diğer Virülans Faktörleri

A. hydrophila tarafından kodlanan virülans faktörleri, ortama bağlı olarak değişik şekillerde ifade edilen katalizörleri, yapışma proteinlerini, toksinleri ve nükleazları içermektedir. Adhezin minD'nin virülanstaki en önemli rolü, mukozal yapışmaya aracılık yapma, biyofilm oluşumunun artmasını sağlama, hareketliliği kolaylaştırma ve hücre bölünmesini kolaylaştırma yeteneğidir (Huang vd., 2015). Konakçıdan kaçmanın bir başka unsuru da *A. hydrophila* J-1'in *ahn* geni tarafından kodlanan nükleazdır. Bu nükleaz, in vitro hemolitik aktivite veya büyümede önemli bir değişiklik göstermez; fakat Δ *ahn* mutantları fare ve balık modellerine sokulduğunda virülansı zayıflar (Ji vd., 2015). *A. hydrophila*'nın yalnızca *A. dhakensis* SSU'da karakterize edilen bir diğer korunmuş geni, RNase R'yi kodlayan *vacB*'dir; 4°C'de büyümeye izin vermeyi (soğuk şok proteini) ve hareketliliği desteklemeyi içeren çoklu işlevlere sahip bir ekzoribonükleazdır. RNase R'nin izojenik mutantları virülansta %70'lik bir zayıflama göstermektedir (Erova vd., 2008).

1.3. Patogenez ve Epidemiyoloji

1.3.1. Klinik Bulgular

A. hydrophila, insanlarda ve diğer canlılarda sistemik enfeksiyonlar, gastroenterit ve bakteriyel endokardit şekillendirebilmektedir. Ayrıca etkenin sürüngenlerde, amfibilerde ve balıklarda nekrotik septisemik ve ülseratif bozukluklara neden olduğu bilinmektedir (Austin vd., 2007). Homeotermik ve poikilotermik konaklarda fırsatçı bir patojen olarak kabul edilmektedir (Thomas vd., 2009). *A. hydrophila* balıklarda Hemorajik septisemi, Motil Aeromonas Septisemi (MAS), Kırmızı yara hastalığı veya ülser hastalığına neden olmaktadır (Swann ve White, 1991). Bakteriyel enfeksiyonlar hem tatlı su kültür balıklarında hem de yabani balıklarda ciddi ölümlere neden olmaktadır. Balıklarda en sık görülen etkenler *A. hydrophila*, *A. sobria* ve *A. Caviae*'dir (Řehulka, 2002).

Taylor (2003)'a göre balıklarda ve diğer su canlılarında *A. hydrophila* ve *A. sobria*, Motil Aeromonas septisemisine (MAS) neden olan patojenlerdir. Suyun kalitesi bozulduğunda balıklar strese girer ve bu da *Aeromonas* türleri gibi fırsatçı patojenlerden kaynaklanan

enfeksiyonlara karşı duyarlılıklarını artırır (Karvonen vd., 2010; Tam vd., 2011). *A. hydrophila*'dan levrek türleri, yayın balıkları, tropikal süs balıkları ve tatlı su balıkları etkilenmektedir.

A. hydrophila balıklarda karın bölgesinde şişkinlik, ağızda kırmızımsı lezyonlar, dış yüzeyde ve anal pul çevresinde kanama ve sepsis ile karakterize enfeksiyonlara neden olur (Rashid vd., 2013). Zayıf durumdaki balıklara kas içi enjekte edilen etken, denge kaybına, anormal hareketlere, yüzgeç tabanlarında ve anal bölgede kırmızımsı lezyonlara ve kuyruk yüzgecine kadar uzanan grimsi beyaz bir lezyona sebebiyet verir. Yeni ölmüş balıkların diseksiyonundan sonra karaciğerin genişlemiş, pürüzsüz olmayan ve düzensiz olduğu görülmüştür (Ali vd., 2014).

Etkenin aynı zamanda Epizootik Ülseratif Sendroma (EUS) ve ölümcül Hemorajik sepsis ile de neden olduğu düşünülmektedir. (Rahman vd., 2007). *A. hydrophila* Meghalaya'da damla enfeksiyonu geçiren adi sazan balıklarından (*C. carpio*) izole edilmiş ve büyük ölümlere neden olmuştur (Sahu vd., 2011). *A. Hydrophila*, Güneydoğu Asya balık yetiştiriciliğinde ciddi ölümlere neden olduğundan önemli ekonomik kayıplar büyük olmaktadır (Thampuran vd., 1995).

Deri anormallikleri fronküloza benzemekte olup, yırtıldığında kanamalı olarak değişmiş kasları ortaya çıkaran berrak eksüda ile dolu çok büyük, göze çarpan şişkinlikler şeklini almıştır. Deri lezyonları, ülser oluşumuyla birlikte hiperemik bir bölge ile çevrili depigmente yamalar şeklinde başlamıştır. Bazı balıklarda ekzoftalmus, göğüs yüzgeçleri etrafında iltihaplanma, yüzme kesesi duvarında hiperemi ve karaciğerde peteşiyal kanamalar görülmüştür. Düşük eritrosit sayıları, düşük hematokrit ve hemoglobin seviyeleri şiddetli anemiyi tanımlamak için kullanılmıştır (Semwal vd., 2023).

Hasta balıkların biyokimyasal incelemelerinde kolesterol, toplam protein, triasilgliserol ve toplam kalsiyum seviyelerinde düşüşün yanı sıra ürede artış tespit edilmiştir. İncelenen enzim ve izoenzimler arasında laktat dehidrojenaz, alanin aminotransferaz, α -hidroksibütiril dehidrojenaz ve γ -glutamil transferaz değerlerinde artış gözlenmektedir (Řehulka, 2002).

Hayvandaki belirtiler, organizmanın virölansına, sepsisinin var olup olmadığına, balığın immun sistemine ve stres faktörlerine bağlı olarak değişir. Hastalık teşhisini yalnızca semptomlara bakılarak yapmak yanıltıcıdır (Swann ve White, 1991).

Daskalov (2006)'a göre *A. hydrophila* patojenitesi ve gastroenterit ile ilgili bileşenleri üretme kabiliyetine bağlıdır. Bunlara örnek olarak ekzotoksinler, sideroforlar, endotoksinler, adhezinler, invazinler, sitotoksinler, S-katmanları ve flagella verilebilir. Enolaz, lipaz, elastaz, metaloproteaz, kolajenaz ve serin proteaz *A. hydrophila* türlerinde bulunan ve virölansa katkıda bulunabilen enzimler arasında yer almaktadır (Barnett vd., 1997). *A. hydrophila*'nın virölans faktörleri arasında slime oluşumu, proteolitik aktivite, hemolizin, enterotoksin, lipolitik aktivite, antimikrobiyal peptitler, aerolizin, sitozin ve jelatinaz gelmektedir. Bu unsurlar etken tarafından , hayatta kalma, bir savunma ve patojenite oluşturma mekanizması olarak kullanılmaktadır (Asmat ve Gires, 2002). Patojeniteyi etkileyen başlıca virölans faktörleri arasında yapısal özellikler (pilli, S-tabakası ve lipopolisakkarit), hücre dışı toksinler (hemolizin, enterotoksin ve proteaz), invazyon ve adezyon gelmektedir (Janda ve Abbott, 2010). Soğuk ortamlarda *Aeromonas* türleri gelişebilir ve toksin üretebilir, bu durum soğutmanın enfeksiyonu kontrol etmede yetersiz kalacağını göstermektedir (Donlan, 2001).

1.3.2. Patolojik Bulgular

A. hydrophila ile deneysel olarak enfekte edilen sazanlarda patolojik bulgularla ilgili daha önce yapılan bir çalışmada (Erer, 1981; Yardımcı ve Aydın, 2011), intraperitoneal olarak enjekte edilen balıklarda daha çok visseral organlarda patolojik değişiklikler görülürken, intramusküler olarak enjekte edilen balıklarda ise daha çok deri ve kaslarda değişiklikler görülmüştür. Ayrıca, kültür sazanlarında (*Carassus auratus*) *A. hydrophila* enfeksiyonu ile ilgili bir çalışmada (Miyazaki ve Kaige, 1986), intraperitoneal olarak enjekte edilen balıklarda bakteriyel virölansın intramusküler olarak enjekte edilen balıklardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Yardımcı ve Aydın (2011) intraperitoneal enjeksiyon grubunda virölansın kas içi enjeksiyon grubuna göre daha yüksek olmasının nedeninin, intraperitoneal enjeksiyonun bakterinin iç organlarla doğrudan temasını sağlayan daha hızlı ve daha yüksek morbidite oranı olduğu; ayrıca, intraperitoneal enjeksiyonları takiben, lezyonların hem makroskopik hem de mikroskopik düzeyde böbrek, karaciğer ve kalp gibi iç organlarda odaklanması teorisini doğrulamaktadır.

Afifi vd. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, dalakta melano-makrofaj merkezlerinin fagositik aktivitesi ile ilişkili önemli splenomegali olduğu bildirilmiştir. Huizinga ve arkadaşları (1979), akut vakalarda kalp ve dalakta herhangi bir lezyon gözlenmediğini fakat karaciğer ve böbreklerde yaygın doku nekrozunun olduğunu bildirmiştir. Yardımcı ve Aydın (2011), yaptıkları çalışmada karaciğer, böbrek ve kalpte mikroskopik olarak en önemli bulguların gözlendiğini kaydetmişlerdir. Karaciğerde sinüzoidlerin genişlediği ve Remak kordonlarının ayrıştığı, hepatositlerde ve pankreas hücrelerinde fokal nekrozun gözlendiği ve hepatosit sitoplazmalarında keskin şekilli yağ vakuollerinin bulunduğu belirtilmiştir.

Grizzle ve Kiryu (1993), sadece deri enfeksiyonu olan balıklarda karaciğer ve dalakta lipofuscin ve hemosiderin miktarlarında artış dahil olmak üzere çeşitli gizli lezyonlar olabileceğini; ancak iç organların çoğunun nekrotik olmadığını bildirmiştir. Yardımcı ve Aydın (2011), yaptıkları çalışmada hiçbir vakada hemosiderin, lipofuscin ve hematoidin gibi pigmentleri hiçbir vakanın karaciğer ve dalağında gözlenmediğini bildirmiştir. Karaciğerde; kapsül altı, perivasküler ve peripakreatik lenfosit infiltrasyonunun saptanması literatürdekilerle uyumludur. Böbreklerde; subkapsüler ve interstisyel hemoraji, parankim dejenerasyonu ve sitoplazmik vakuol oluşumu, fokal lenfosit infiltrasyonu ile tübüler epitel nekrozu önceki çalışmalarla paralel olarak interstisyel nefrit ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir (Roberts, 2012). Hem makroskopik hem de mikroskopik düzeyde incelendiğinde böbrek, karaciğer ve kalpte yaygın kanama ve lenfosit infiltrasyonunun gözlenmesi viseral hemorajik septisemiye göstermektedir.

1.4. Teşhis

A. hydrophila'nın tanımlanması, koloni morfolojisi, biyokimyasal testler, Api20E sistemi ve tet-E geni için moleküler teşhise bağlıdır. *A. hydrophila* kolonileri sükröz fermentasyonuna bağlı olarak tiyosülfat sitrat safra tuzları sükröz (TCBS) agarda sarı-yeşil renkte olup çapları 2-3 mm arasında değişmektedir. Buna ek olarak, koloniler MacConkey agarda soluk şekilli veya renksiz üremektedir. Bu durum *A. hydrophila*'nın laktoz şekerini fermente edemediğini göstermektedir. Ancak kanlı agarda düzgün, dışbükey, yuvarlak S tipli ve hemolitik koloniler üreterek ve soluk beyazdan griye değişen renkte üreme göstermektedir (Abbott vd., 2003; Jayavignesh vd., 2011).

Diğer taraftan, *A. hydrophila*'yı izole etmek için selektif besiyeri olarak Rimler Shotts agar kullanılmıştır (HiMedia). Ekim sonrasında agarlar 37 °C 'de 28 saat boyunca inkübe edilmiştir. Otomatik mikrobiyal analiz cihazı kullanılarak tüm izolatlar tür düzeyinde tanımlanmıştır (Biolog, ABD). Daha fazla karakterizasyon için, seçilen *A. hydrophila* kolonileri Tryptic Soy Broth (Difco) içinde alt kültüre alınmıştır

API20E sistemi, çok sayıda kültür ortamına ihtiyaç duymadan bakterilerin hızlı bir şekilde tespit edilmesinin yanı sıra kültürel kontaminasyonu azaltması ile karakterize edilir ve tanımlanmasını doğrulamak için kullanılır (Naharro vd., 2009). Kullanılan teknikler arasında dot blot (blotlama teknikleri), enzim bağımlı immünoabsorbt testi (ELISA), western blot ve immünohistokimya (IHC), tam hücre aglütinasyon, Immune-India mürekkep tekniği lateks aglütinasyon, ve floresan antikor teknikleri (FAT ve IFAT) yer almaktadır. Fakat bu bahsedilen yöntemler, numunedeki bakteriyi konsantrasyonunun azlığında bakteriyi tespit etmekte yetersiz kalmaktadır (Adams ve Thompson, 2011).

Geleneksel yöntemlerin bu sınırlamaları, daha yüksek özgüllük ve hassasiyetlerine bağlı olarak moleküler tekniklerin kullanımının yaygınlaşmasına neden olmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), balık patojeni bakterilerin hızlı ve güvenilir bir şekilde tespiti açısından sıklıkla ve güvenle kullanılmaktadır. Diğer PCR tabanlı tanı testleri, çeşitli heterojen patojenik bakterilerin eşzamanlı ve kantitatif tespiti için uygulanan gerçek zamanlı (RT) PCR, yuvalanmış PCR, ters transkripsiyon PCR ve multipleks PCR'dir (Austin 2019; Cai vd., 2014).

Bununla birlikte, PCR tekniğinin en önemli dezavantajı, bu yöntemin genetik tipleme için bakteri kültürüne bağlı olmasıdır. (Narayana vd., 2018). Mısır'da, çizgili kefal *Mugil cephalus*'ta *A. hydrophila* ve *V. parahaemolyticus* koenfeksiyonunu tanımlamak için PCR kullanılmıştır (El-Son vd., 2021). Multiplex PCR tekniği bir çok bakterinin aynı anda araştırılmasına olanak sağlamaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada üç farklı patojenik bakterinin (*A. hydrophila*, *F. columnare* ve *E. ictaluri*), bir diğer çalışmada ise beş farklı patojenik bakterinin (*Y. ruckeri*, *A. salmonicida subsp. salmonicida*, *A. hydrophila*, *R. salmoninarum* ve *F. columnare*) eş zamanlı tanımlanması için uygulanmıştır (Farzadnia ve Naeemipour, 2020). Mısır'da yapılan bir çalışmada Real time PCR tekniğiyle Nil tilapisini enfekte eden farklı *Aeromonas* türleri tespit edilmiştir (Nicholson vd., 2017).

DNA mikro dizileri ayrıca balık çiftliklerinde normalde karşılaşılan sekiz farklı patojenin, yani *A. hydrophila*, *E. tarda*, *F. columnare*, *L. garvieae*, *P. damsela*, *Ps.*

anguilliseptica, *S. iniae* ve *V. anguillarum*'un eşzamanlı olarak tanımlanması için de kullanılmıştır (Chang vd., 2012). Bu yöntem aynı zamanda kültür balıklarını enfekte eden *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *A. hydrophila*, *S. iniae* ve *Nocardia seriolae* gibi farklı bakteriyel patojen türlerini ayırt etmek için de kullanılmıştır (Shi vd., 2012).

1.5. Tedavi Stratejileri

Su ürünlerinde balıkları sağlıklarını korumak için çeşitli kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Su ürünlerinde kullanılan kimyasallar arasında; kemoterapötik ajanlar, dezenfektanlar, antibiyotikler veya antimikrobiyaller, hormonlar ve anestezikler gelmektedir (Asean, 2013). *A. hydrophila* enfeksiyonunda sıklıkla oksitetrasiklin (OTC), sülfadimetoksin ve ormetoprim gibi antibiyotikler kullanılmakta ve başarılı sonuçlar alınmaktadır (Agnew ve Barnes, 2007). *A. hydrophila* fırsatçı bir patojen olduğundan, biyogüvenlik tedbirlerini sıkı şekilde yapmak ve hastalığa zemin hazırlayan faktörlerden kaçınmak önemlidir. Böylelikle hastalıktan etkilenme minimum seviyeye inecektir (Stratev ve Odeyemi, 2017).

Bakteriyel hastalıkları önlemek ve düzenlemek için kemoterapi ilaçlarının kullanımı artmıştır. En sık kullanılanlar topikal dezenfektanlar, antimikrobiyaller ve probiyotiklerdir. yetiştiriciler tarafından kullanılan çok çeşitli topikal dezenfektanlar bulunmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanları akriflavin, malaşit yeşili, formalin, hipoklorit, benzalkonyum klorür ve polivinilpirolidondur. Bu dezenfektanlardan akriflavin ve malaşit yeşili yalnızca kuluçkahanelerde kullanılırken, diğerleri hem kuluçkahanelerde hem de havuzlarda kullanılmaktadır (Mohamed vd., 2000).

Antibiyotiklerin aşırı kullanımı nedeniyle, ilaca dirençli suşlar hızla artmaktadır. Ayrıca, bakterilerin oluşturduğu biyofilmler antibiyotiklerin etkisini azaltmaktadır (Liu vd., 2020). *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Comamonas*, *Acinetobacter* ve *Edwardsiella* gibi bakterilere karşı antibiyotik direnci artmıştır. Balıkların yetiştirildiği havuzlardan ve sedimentten izole edilen *A. hydrophila* norfloksasin, seftazidime ve piperasilin karşı direnç geliştiği görülmüştür (Kathleen vd., 2016).

Kuala Terengganu, Terengganu ve Malezya'daki bir akvaryum dükkanından toplanan hastalıklı tatlı su süs balıklarından izole edilen *A. hydrophila* izolatları için bir antibiyotik duyarlılık testi yapılmıştır. Sekiz süs balığından ekimler yapılmış ve toplam on beş *A.*

hydrophila izole edilmiştir. Bu izolatların antibiyotik direncine bakmak için yedi farklı antibiyotik kullanılmıştır. Sonuçlara bakıldığında tüm suşların sülfametoksazole dirençli olduğunu görülmüştür. Suşların 13 tanesinde oksitetrasikline ve 8 tanesinde nalidiksik aside direnç görülmüştür. Altı suş furazolidona, iki suş kloramfenikole ve bir suş eritromisine direnç bulunmuştur. Tüm suşların kanamisine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Musa vd., 2008).

Antibiyotik direnciyle ilgili bu sorun, tüm hayvancılık endüstrisinde olduğu gibi su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisinde önem arz etmektedir. Bu durum balık hastalıklarıyla mücadele etmek için doğal kaynaklardan yeni antibakteriyel ajanların aranmasını teşvik etmektedir. (Razak vd., 2019). Fitoterapötik ajanlar olarak bilinen tıbbi bitkiler, çok eski zamanlardan beri hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalıkları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanada balıklardaki bakteriyel hastalıklar için de kullanılmaktadır. (Stratev ve Odeyemi, 2017).

Yapılan birçok araştırma, su ürünleri yetiştiriciliğinde bitkilerin alternatif biyotıp olarak antimikrobiyal potansiyeline işaret etmektedir (Citarasu 2010; Syahidah vd., 2019). Bitkilerin alkaloidler, terpenoidler, tanenler, saponinler, gliserol, flavonoidler, steroidler veya uçucu yağlar içermesi nedeniyle bitki özütlerinin balık ve karides yetiştiriciliğinde anti-stres, büyüme performansı artırıcı, iştah uyarıcı ve anti-patojen olarak hareket ettiği bildirilmiştir. Bazı bitki grupları başta bakteriyel olmak üzere viral ve parazitik balık hastalıkları üzerinde etkili olan ikincil metabolitler ve fitokimyasallar açısından zengindir. En önemli avantajı doğal kökenli olması ve insanlara, balıklara ve çevreye zarar vermemesidir. Bitki özleri kullanılarak bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi, çevreye zarar verebilecek antibiyotiklere kıyasla düşük maliyeti ve belirli bakterilere karşı yüksek etkinliği nedeniyle talep görmektedir (Stratev vd., 2018).

Bir çok antibiyotiğin kullanımı su ürünleri yetiştiriciliğinde yasaklanmıştır. Bu nedenle, spesifik olmayan bağışıklık sisteminin uyarılması, kültür türlerinin bağışıklığını ve büyüme performansını artırmak için mevcut akıllı bir seçimdir (Jana vd., 2018; Vinarukwong vd., 2018)ri.

Hastalığın ilerleyişini ve besin zinciri yoluyla insanlara ulaşmasını takip etmek, hastalığa neden olan ajanın neden olduğu klinik semptomlar ve patolojik lezyonlar hakkında bilgi edinmek. Kan ve enzimatik durum üzerindeki etkilerini ve balıkların bulundukları ortamdaki fizyolojik ve yaşam durumları hakkında bilgi edinme.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu tez çalışmasında , aşağıdaki tablolarda gösterildiği gibi, çeşitli cihazlar, kimyasallar ve kültür ortamları besiyerleri kullanılmıştır (Çizelge 2.1, 2,3).

Çizelge 2.1. Bu çalışmada kullanılan cihazlar

No	Cihazlar	Menşei
1	Otoklav	Wiseclave (Almanya)
2	Santrifüj	Griffenkamp (İngiltere)
3	Soğuk santrifüj	P-selecta high speed (İspanya)
4	Bileşen mikroskobu	Olympus (Japonya)
5	EDTA	Ürdün
6	Jel tüpü	Ürdün
7	Cam akvaryum (40×40×70) cm	Irak
8	Hemositometre haznesi	Neubauer (Çin)
9	Tank için ısıtıcılar	Çin
10	Baca	İngiltere
11	İnkübatör	Memmert(Almanya)
12	Manyetik karıştırıcı Sıcak Plaka	Sartorius (Almanya)
13	Mikrohematokrit santrifüj	Japonya
14	Mikroskopik slayt	Blue star (İngiltere)
15	Mikro kapak lamı	Blue star (İngiltere)
16	Mikro hematokrit tüpü	Çin
17	Milipor filtre kağıdı	ABD
18	Mikropipet	Witey (Almanya)
19	Oksijen ölçer	Çin
20	Oksijen motoru	Çin
21	PCV okuyucu	Çin
22	PH metre	lovibond (Almanya)
23	Hassas terazi	Çin
24	Spektrofotometre	Mettle (Japonya)
25	Termometre	Çin

Çizelge 2.2. Mevcut çalışmada kullanılan kimyasallar

No	Kimyasal	Menşei
1	Doksisiklin hidrat (Vibramycin®, kapsül)	Pfizer (ABD)
2	Etanol %70	Arege (U.E)
3	Etanol %99	Arege (U.E)
4	Eosin	HIMDIA (Hindistan)
5	Gram boyama ket	İngiltere
6	Gliserin	B.D.H (BK)
7	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Irak
8	Kovacs indol	Alpha Chemika
9	Normal salin çözeltisi (NSS)	Irak

Çizelge 2.3. Mevcut çalışmada kullanılan kültür besiyerleri

No	Kimyasal	Menşei
1	Koyun kanlı agarı	HiMedia (Hindistan)
2	MacConkey Agarı	HiMedia (Hindistan)
3	Beyin-kalp infüzyonu agarı	Oxoid (BK)
4	Triptik soya agarı	Oxoid (BK)
5	Muller Hinton besiyeri	Bio-Merieux, Fransa)

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan *A. hydrophila* Suşu

A. hydrophila izolatı Tarım Bakanlığı / Al-Nahda Merkez Veteriner Laboratuvarları aracılığıyla sağlanmıştır. Bu izolat, balıklar enfekte edildikten ve balıkların solungaç, böbrek ve deri örnekleri alındıktan sonra yeniden izole edilmiş ve doğrulanmıştır. Örnekler Triptik soya agar (TSA), Beyin kalp infüzyon agar (BHIA), %5 Koyun kanlı agar ve MacConkey agara ekilmiş ve aerobik koşullarda 28°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra saf hemolitik sarı koloniler oluşmaya başlamış ve koloni şekli, gram boyama ve bakterinin biyokimyasal özelliklerine dayanarak *A. hydrophila* olarak belirlenmiştir.

2.2.2. İzolasyon ve Karakterizasyon

2.2.2.1. Gram Boyama

Tek bir bakteri kolonisinden alınan örnek, lam üzerinde, kristal viyole solüsyonu kullanılarak bir dakika süreyle Gram boyama yapıldı ve ardından bir dakika süreyle iyot solüsyonu eklenerek %95'lik etil alkol ile 20-30 sn. ve safranin ile 2 dakika dekolorize edildi. Bir sonraki aşamaya geçmeden önce lam akan su ile iyice temizlendi. Slayt görüntülerini (X100) büyütmede analiz etmek için bir ışık mikroskobu kullanıldı.

2.2.2.2. Mikroskopik morfoloji

Trypton soya agarı (TSA) veya Beyin-Kalp İnfüzyonu agar (BHIA) kültürleri, bakterileri 28°C'de 24-48 saat boyunca kültürlemek için kullanıldı ve koloni oluşumu, şekil, renk, boyut ve doku açısından görsel olarak incelendi.

2.2.2.3. Hareket Muayenesi

Bakterinin hareketliliğini görmek için, etken yarı katı besiyerinde (SIM agar) 28 °C'de 24-48 saat inkübe edildi (Shields ve Cathcart, 2011).

2.2.3. Biyokimyasal Özellikler

2.2.3.1. Oksidaz Testi

Bu test, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan oksidase enziminin (sitokrom C oksidase) varlığını ortaya koymada kullanılır. TSA'da üretilen bakteriden bir miktar alınır. Bactident oksidaz test stripleri üzerine bakteriler sürülür. 20-30 sn bekledikten sonra rengim mavi-mora dönmesi pozitif olarak, rengin dönmemesi ise negative olarak değerlendirilir.

2.2.3.2. Katalaz Testi

Katalaz testi, BHI agardan alınan bir miktar bakteri kolonisinin bir mikro lam üzerine yerleştirilmesi ve 5 saniye içinde pozitif yanıt veren %3 hidrojen peroksit (v/v) eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir (Quinn ve Gauss, 2004).

2.2.3.3. Hemolitik Aktivite

%5 koyun kanlı agarda 28°C’de inkübe edilen bakteriler günlük olarak kontrol edilmiştir. Kolonileri çevreleyen berrak bir bölgenin ortaya çıkması veya opak yeşilimsi bir bölgenin varlığı hemoliz belirtisi olarak değerlendirilmiştir (görünüm 48-72 saat).

2.2.3.4. Jelatin Sıvılaştırma Testi

Jelatin besiyerinde bakteri kolonileri iğne uçlu öze ile ekilmiş ve daha sonra 28 °C’de 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda jelatinin sıvılaşması pozitif olarak değerlendirilmektedir. Tekrar 4 °C’de bekletildikten 10 dakika sonra jelatinin katılaşmaması iyi bir sonuçtur (Tille, 2015).

2.2.3.5. Laktoz Testi

Bakterinin laktozu fermente edip etmediğini anlamak için üreyen koloniden bir miktar alınarak Mac Conkey agara ekim yapılır. 28 °C’de 24-48 saat inkübasyon sonrasında pembe koloni oluşması pozitif olarak değerlendirilir. Rengin şeffaf olması negatif olarak değerlendirilmektedir.

2.2.3.6. Üçlü Şekerli Demir (TSI) Agarlarında Reaksiyonlar

TSI agarda üç farklı karbonhidrat (%0,1 glikoz, %1 laktoz ve %1 sukroz) ve ek olarak demir bulunmaktadır. Bu karbonhidratlar fermente edildiğinde, oluşan asit üretimi fenol kırmızısı indikatörü ile saptanır. Oluşan renk değişimleri asit üretimi için sarı renkte olup alkalinizasyon için kırmızı renktedir. Normal besi yerinin rengi kırmızıdır. Rengin sarıya dönmesi şekeri fermente ettiğini, kırmızıda kalması ise fermente etmediğini gösterir. Ayrıca siyah rengin oluşması, bakterinin demiri kullandığının göstergesidir.

2.2.4. . Rimler ve Shotts Ortamı

R-S agar, hareketli aeromonasların seçici izolasyonu için bir ortam oluşturmak amacıyla 1 litre hacminde bir çözelti oluşturmak üzere aşağıdaki bileşenler distile su ile birleştirilmiştir: maltoz (3,5 g), sodyum tiyosülfat (6,8 g), bromotimol mavisi (0,03 g), ferrik amonyum sitrat (0,8 g), sodyum deoksikolat (1,0 g) ve novobiosin (0,005 g) (13,5 g). Çözelti kaynama noktasına kadar ısıtıldı, bir dakika boyunca sürekli karıştırıldı ve pH'ı 7.0'a yükseltildi. Besiyeri 45°C'ye soğutulduktan ve steril petri kaplarına yerleştirildikten sonra, ihtiyaç duyulana kadar plastik kılıflar içinde buzdolabında saklanabilir. Rimler-Shotts agar inkübasyon periyodundan sonra, *A. hydrophila* karakteristik sarı koloni gelişimine sahiptir (Shotts ve Rimler, 1973). Mümkün olan en iyi bakteriyel farklılaşmayı sağlamak için R-S agar enjekte edilmiş ve 28 °C'de 24 ila 48 saat inkübe edilmiştir. Hareketli aeromonad kolonileri sarı renkteyken *Escherichia*, *Enterobacter* ve *Pseudomonas* kolonileri yeşil renkteydi. R-S agarda, *Proteus vulgaris* ve bazı *Citrobacter* kolonileri de aynı şekilde sarıydı, ancak bu kolonilerin siyah çekirdekleri vardı, bu da bu bakterilerin hidrojen sülfür gazı ürettiğini gösteriyordu. Buna karşılık, *Edwardsiella* kolonileri yeşil ve siyah merkezliydi

2.2.5. Kanlı Agar

Aeromonas türlerinin olduğu gibi birçok bakterinin genel besi yeri olarak kullanılmaktadır. Ekim yapıldıktan sonra 28 °C'de 24 ila 48 saat inkübe edilir ve inkübasyon sonrasında kenarları düzgün, grimsi ve hemolitik koloniler şekillenir.

2.2.6. MacConkey Agar

MacConkey agar laktoz fermente eden ve etmeyen enterik bakterilerin izolasyonu ve ayrımı için kullanılmıştır.

2.2.7. Ortalama Ölümcül Dozun Saptanması (LD50)

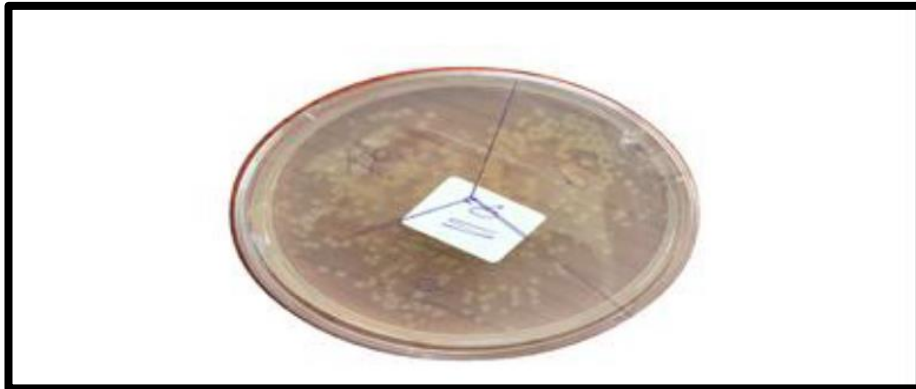
Bakteriyel patojeniteyi arttırmak amacıyla, bakteri izolatu sağlıklı balıklara iki kez geçirilmiştir. Bir balık enfekte olduğunda, bakteri izole edilmiş ve onu enfekte etmek için kullanılmıştır. TSA'da 28°C'de 24 saatlik üremenin ardından plakalardaki bakteriler sayılarak (yayma yöntemi). *C. carpio* (ortalama ağırlığı 250 ±5 g) kullanılarak, patojenlerin %50'sinin öldürücü dozu (LD50) bulunmuştur. Balıklar rastgele örnekleme prosedürü

kullanılarak altı grupta incelenmiştir. Her gruptan altı balığa (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 ve 10^8) canlı hücre/balık içeren 0,1 ml hacminde taze üretilmiş (*A. hydrophila*) bakteri süspansiyonu intraperitoneal (IP) olarak enjekte edilmiştir. Kontrol grubuna 0,1 ml steril tuzlu su enjekte edilmiş ve tüm gruplar 15 gün boyunca gözlemlenmiş ve ölü balıklar üzerinde standart patolojik ve mikrobiyolojik incelemeler yapılmıştır. LD50 değerini belirlemek için bu çalışmada Plumb ve Bowser (2010) tarafından teyit edilen Reed ve Muench (1938) yaklaşımı kullanılmıştır. Enjekte edilen *A. hydrophila* bakterisini enfekte balıkların böbreğinden yeniden izole etmek için TSA kullanılmış ve kimliğini doğrulamak için karakterizasyon testleri kullanılmıştır. kullanılmış ve kimliğini doğrulamak için karakterizasyon testleri kullanılmıştır. $\text{Log LD50} = ,5 + \log \text{ en yüksek konsantrasyon} - \text{toplam \%mortalite}$. $\text{LD50} = 10^6$ Nihai bakteri konsantrasyonu, seri seyreltmeden sonra 0,1 ml ($1,57 \times 10^6$) CFU/ml balığa ayarlandı ve bu da optimum LD50 konsantrasyonunu temsil ediyordu ve sataşma dozu olarak kullanıldı.

2.2.8. Yayma Yöntemi ile Bakteri Sayımı

Kültür süspansiyonunun on kat seri dilüsyonuyla bakteri sayımı yapılmıştır. Bu amaçla bakterinin 10 katlı dilüsyonları (10^{-1} - 10^{-9} CFU/ml) yapılmıştır. Dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak Plate count agara (PCA) ekimler yapılmış ve 28°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kolonile sayılmış ve aşağıdaki gibi formüle edilmiştir.

Bakteri yoğunluğunu hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır: $1/\text{VS} \times (\text{NB})$
 $10^x \cdot \text{VS} = \text{yayılma hacmi (ml)}$, NB = bakteri sayısı (CFU), $100x = \text{gözlemlenen plakanın seyreltilmesi}$ (Cruickshank, 1974) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Yayma yöntemi ile bakteri kolonilerinin sayımı.

2.2.9. Doksisisilin Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonu

Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) tayini balıklardan izole edilen *A. hydrophila*'ya karşı DOX'un MİK değeri, Klinik ve Biyolojik Araştırmalar Merkezi Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) broth makro-dilüsyon yöntemi (CLSI, 2008) tarafından üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 1 mL %0,1 DOX, 1 mL taze hazırlanmış Mueller Hinton Broth (MHB) besiyeri içinde tüp 1'de çözölmüştür. Daha tüp 1'den alınan 1 mL, içinde 1 mL MHB besiyeri içeren tüp 2'ye aktarılmıştır. serisi toplam 12 tüp için gerçekleştirilmiştir. Ardından, 20 µL ($1,57 \times 10^6$ CFU/mL) (Xu, 2013) *A. hydrophila* süspansiyonu, 2 kontrol tüpüyle birlikte 12 test tüpünün hepsine ayrı ayrı aşılanmıştır ve 30°C'lik (*A. hydrophila* suşunun optimum büyüme sıcaklığı) inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bakteriyel büyüme göstermeyen tüpler arasındaki en düşük ilaç konsantrasyonu ilacın MIC değeri olarak belirlenmiştir.

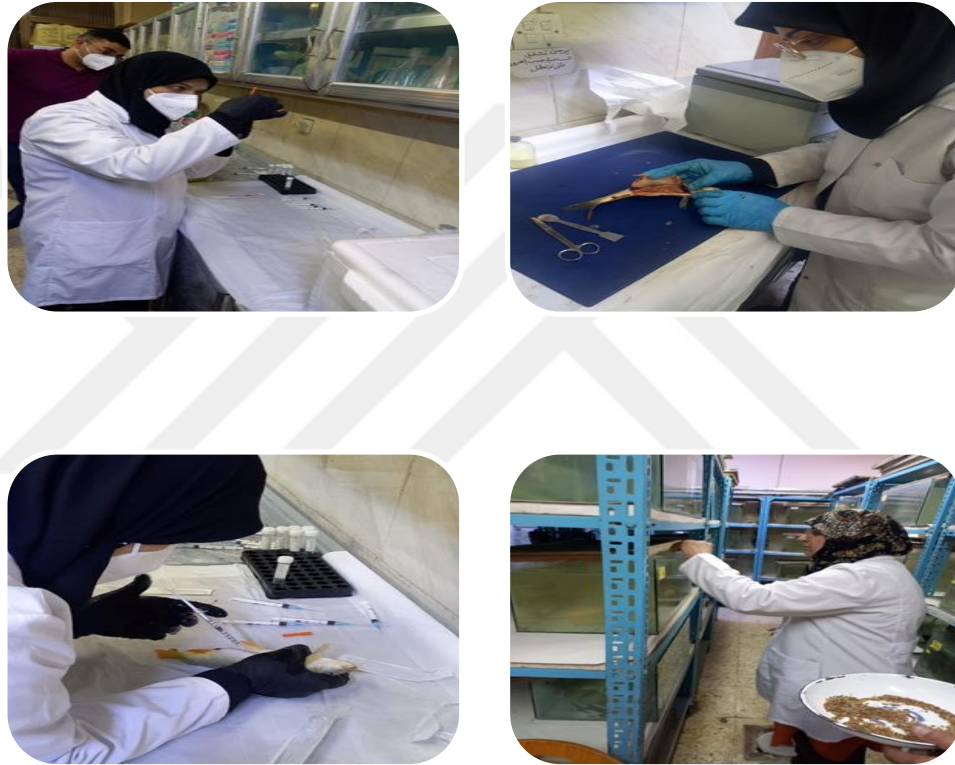
2.2.10. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Bakteriyel duyarlılık testi, Kirby-Bauer disk-difüzyon yöntemine (Bauer, 1966)'a göre yapılmıştır. Müller Hinton Broth agarda üretilen bakteriden Mc Farland 0,5 (10^8 mikroorganizma / ml)'e göre ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturuldu. Bu süspansiyondan 0,1 ml alınan örnekler Mueller-Hinton agar yüzeyine inoküle edildi. Steril bir drigalski spatülü ile iyive agar yüzeyine yayıldı. Takiben farklı antibiyotikleri içeren diskler steril bir pens yardımıyla eşit aralıklar ile agar yüzeyine yerleştirildi. Daha sonra besiyerleri 18-24 saat süreyle 28°C'de inkübe edildi ve oluşan inhibisyon zonları mm cinsinden ölçüldü (GLSI guideline 2020)'a göre

2.3. Kullanılan Balıklar

Bu çalışma, Bağdat'ın güneyindeki Zafaraniya'da bulunan Bilim ve Teknoloji Bakanlığı, Tarımsal Araştırma Dairesi, Hayvan ve Balıkçılık Merkezi, Balık Bölümü, Balık Besleme Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2). Mevcut çalışmada yaklaşık 250 ± 5 g ağırlığında toplam 60 adet sağlıklı *C. carpio* balığı kullanılmıştır. Balıklar Irak'ın Babil Vilayeti'ndeki Al-Musayyib'e yakın bir çiftlikten temin edilmiştir. Mevcut olabilecek olası dış parazitlerden kurtulmak için, balıklar stres belirtileri göstermeye başlayana kadar %3 NaCl içinde yıkandı. Balıklar, çalışma öncesinde düzenli yemleme yapılırken iki haftalık alıştırma aşamasından geçirilmiştir. Toplam boyutları 70'e 40'a 40 cm olan iki tank

akvaryumuna balıklar yerleştirilmiştir. Daha sonra, 12 küvet rastgele seçilen balıklarla doldurulmuştur. Balıklar (n-60). Adi sazanlar üç gruba ayrılmıştır: negatif kontrol, pozitif kontrol tedavi edilmemiş (*A. hydrophilia* ile mücadele edilmiş) ve üç tedavi edilmiş (*A. hydrophilia* ile mücadele edilmiş ve beş ardışık gün boyunca yemde 20mg/kg Doksisiklin ile tedavi edilmiş). Her tank 50 L su ile doldurulmuştur. Sıcaklık (22 ± 2 °C, pH (7 ± 1) ve çözülmüş oksijen konsantrasyonu gibi fiziko-kimyasal özellikler $6,25 \pm 1$ mg/l idi. Uygun oksijen ile sağlıklı bir ortam sağlamak için, balıklar çalışma süresi boyunca günde iki kez vücut kütlelerinin %2'si oranında beslendi.



Şekil 2.2. Mevcut çalışmanın aşamaları

2.4. Besinlerin Üretimi

Besinler, (Çizelge 2.4)'te gösterildiği gibi yerel pazarda bulunan yem malzemelerinden yapıldığı için deney sahasında yerel olarak üretilmiştir. Besinler her bir maddenin yüzdesine göre yapılmıştır. Materyal daha sonra yerel bir üretim makinesi ile 6 mm'lik bir pelet haline getirilmiş, 12 saat boyunca güneşte bırakılmış, daha sonra 50 kg'lık

özel torbalarda paketlenmiş ve kullanılabilecek kadar kuru bir yerde saklanmıştır. Balıklar, günde iki öğün dağıtılan balık canlı kütlesinin %5'i ile beslenmiştir.

Çizelge 2.4. Deneyde kullanılan besinlerin içerikleri

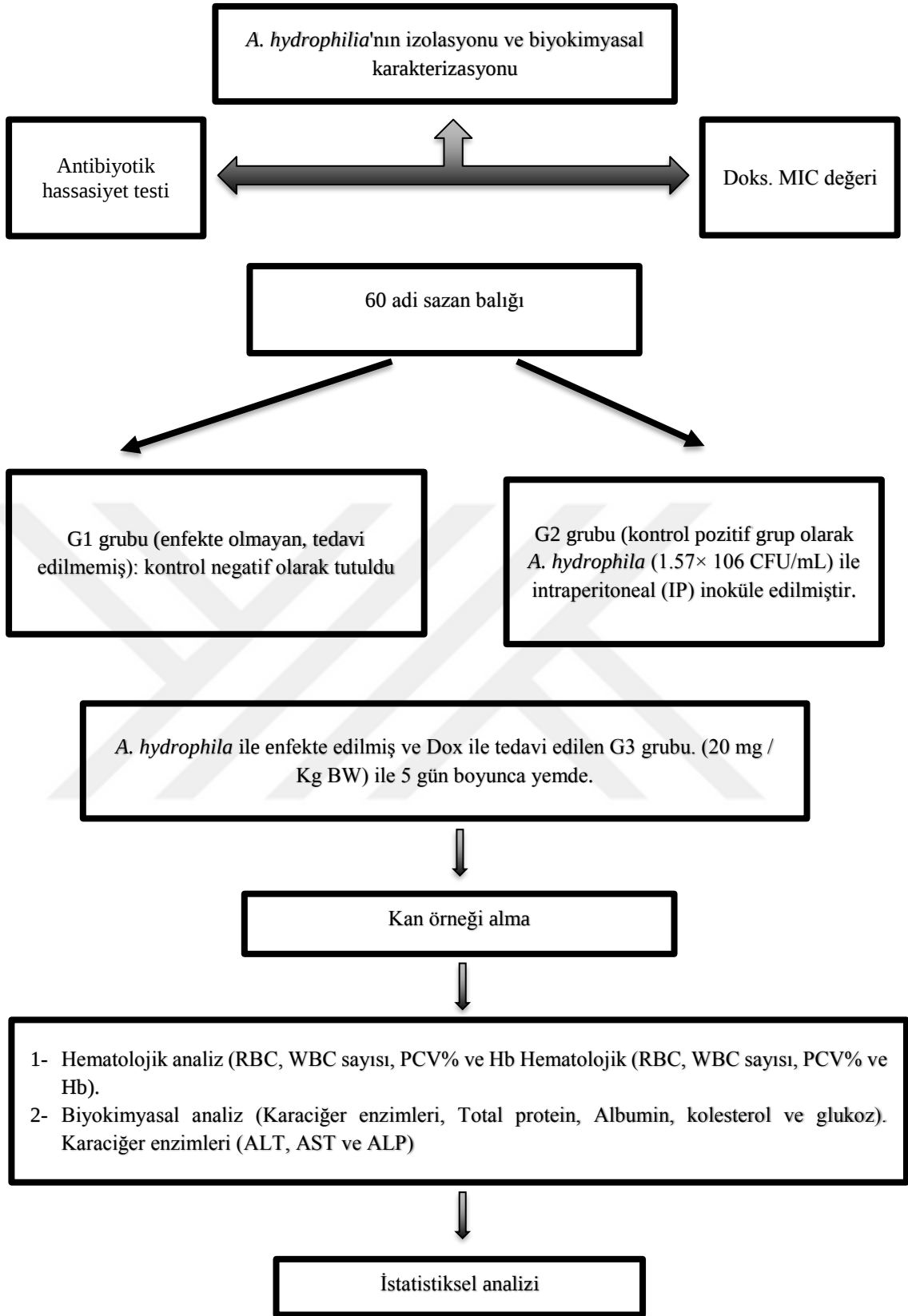
İçindekiler	Toplam oran	Protein oranı	Toplam protein %'si
Hayvan proteini	%22	50	%11
Soya fasulyesi	%35	45	%15,7
Sarı mısır	%13	9,5	%1,24
Buğday kepeği	%14	5	%1,61
Buğday unu	%15	15	%2,25
Mineraller + vitaminler	%1		

2.5. Çalışma Planı

Balıklar (n=60) rastgele örnekleme yöntemi ile her biri 20'lik 3 eşit gruba dağıtılmıştır (Şekil 2.3), Grup1 (G1) (enfekte olmamış, tedavi edilmemiş): kontrol negatif olarak tutulmuştur,

Grup 2 (G2) (enfekte): Balıklar kontrol pozitif grup olarak *A. hydrophila* (1.57×10^6 CFU/mL) ile intraperitoneal (IP) olarak inoküle edilmiştir.

Grup 3 (G3) (enfekte - tedavi edilmiş): Bu gruptaki balıklar *A. hydrophila* ile enfekte edildi ve yemde 5 gün üst üste Doksisisiklin (20 mg / Kg BW) (AI vd., 2011; Ibrahim vd., 2020) ile tedavi edildi.



Şekil 2.3. Araştırmanın tüm aşamalarını gösteren bir diyagram

2.6. Kan Alma

Kan, anestezi kullanılmadan 3 mL (1,5x21 ölçülerinde) plastik bir şırınga kullanılarak kaudal venlerden toplanmıştır (Val vd., 1998). Bekletme süresi 1 dakikadan azdı ve stres etkisini azaltmak için masaya konuldu.0

Kanın ilk kısmı, hematolojik özellikleri ölçmek için de kullanılan bir an tikoagülan olan lityum heparin ile kaplı bir tüpe konmuştur. İkinci kısım ikiye bölünerek jelatin dolu Eppendorf tüplerine konmuş ve iki saat boyunca pıhtılaşmaya bırakılmıştır. Karaciğer enzimleri, toplam protein, albumin ve diğer biyokimyasal parametreler dondurulmuş (-20°C) olarak saklanan santrifüjlenmiş serum kullanılarak ölçülmüştür.

2.7. Hemaolojik Parametreler

2.7.1. Toplam Kırmızı Kan Hücresi (Eritrosit veya RBC) Sayımları

Toplam RBC sayımını gerçekleştirmek için Al-Dohail vd., (2011), yaptığı çalışmadaki protokol takip edilmiştir. RBC sayısı milimetre küp başına milyonlarca hücre olarak kaydedilmiştir. Yirmi µl taze alınmış kan 0,98 ml Dacies sıvısı 100 ml %40 formaldehit, 31,3 g trisodyum sitrat ve 1 g parlak kristal mavisi ile karıştırılarak 1 litre distile suda seyreltilmiş ve 0,45 m şırınga filtresinden geçirilmiştir.

Hemositometreye bir damla damlatılmış ve kırmızı kan hücrelerinin sayısı beş kare kullanılarak sayılmıştır (Dacie ve Lewis, 1984). Toplam RBC'yi belirlemede kullanılan formül aşağıda gösterilmiştir:

$$\text{RBC (mm}^3\text{)} = (\text{N} \times 5 \times 10 \times 200)$$

Burada N beş karedeki toplam hücre sayısı, 5 bir mm'deki hücre sayısını üreten çarpma faktörü, 10 bölmenin derinliğini 0,1'den bir mm'ye çıkaran çarpma faktörü ve 200 seyreltme faktörüdür.

2.7.2. Toplam Beyaz Kan Hücresi (WBC) Sayımı

WBC sayımı Thrall vd., (2006)'na uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kan örneği, 1:20 seyreltme aralığı oluşturmak için özel bir hemositometre pipeti kullanılarak 0,5 işaretine kadar alınmış ve Dacies sıvısı (formaldehit 10 ml + trisodyum sitrat 31,3 g + parlak kresil mavisi 1,0 g + distal su 1L) ile 11 işaretine kadar seyreltilerek iyice karıştırılmış ve 5 dakika bekletilmiştir.

WBC'ler, doldurulduktan ve yaklaşık beş dakika bekletildikten sonra sayım odasının her iki tarafındaki dört köşe karede sayılmıştır. WBC'ler daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

Toplam WBC sayımı = $n / 4 \times 20 \times 10$ hücre/mm³. Burada: (N: dört büyük karedeki toplam hücre sayısıdır), (Seyreltme faktörü 20), (10 derinlik bileşeni).

2.7.3. Kan Hücresi Değerinin Belirlenmesi

Mikro hematokrit kapiler tüpler uzunluklarının üst kısmına kadar kanla doldurulmuş, tüplerin diğer ucu kil ile tıkanmış ve tüpler 2000 rpm/dak hızda 5 dakika boyunca mikro hematokrit santrifüjüne yerleştirilmiştir.

Tüpler daha sonra Acharya ve Mohanty (2018) tarafından açıklanan yöntemine uygun olarak bir mikro hematokrit okuyucu kullanılarak okunmuştur.

2.7.4. Hemoglobin (Hb) İçeriği

Drabkins solüsyon kiti yaklaşımı 200 mg potasyum ferrisiyanür, 50 mg potasyum siyanür, 140 mg potasyum dihidrojen fosfat, 1 ml iyonik olmayan deterjan ve 1000 ml distal su) kullanılarak çeşitli kimyasalların konsantrasyonları artırılır. Hemoglobin, 20 mikrolitre kan 5 mL Drabkin ile birleştirilerek hesaplanır. Hemoglobin hesaplama formülü (boş, standart ve numune) için 450 nm'de okumak üzere bir spektrofotometre kullanın.

Hemoglobin konsantrasyonu (g/dl) numune miktarı ile standart hacim konsantrasyonunun çarpımına eşittir. Prosedürler sağlanmıştır.

2.8. Biyokimyasal Parametreler

2.8.1. Karaciğer Enzimleri (ALT, AST ve ALP)

Alanin aminotransferaz (ALT) ve serum aspartat aminotransferaz (AST) Reitman ve Frankel (1957)'e göre spesifik kitler (Elab science, Çin) kullanılarak spektrofotometre (Spectronic 20 D, Milton Roy Company) ile kalorimetrik olarak ölçülmüştür.

2.8.2. Toplam Proteinler

Test, Siwicki vd., (1994) tarafından bildirildiği gibi Biuret tekniği kullanılarak Bio (Fransa) kolorimetrik test kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hesaplama olacak: Toplam protein = $\frac{O.D. \text{ Numune}}{O.D. \text{ Standart}} \times n$, G/dl: n=5, gm/'l: n=50, OD= Optik yoğunluk.

2.8.3. Albumin

Dumas ve Biggs (1972)'e göre, albumin serum örneklerinde 550 Mm (milimolar) dalga boyunda BCG tekniği kullanılarak ölçülmüştür. Bio (Fransa) firmasının bir kitini kullanan bu yaklaşım, bir asit ortamında bromokresol yeşili ile bir albumin reaksiyonunun spektrofotometri ile tespit edilebilecek bir renk ürettiği teorisi üzerine çalışmıştır.

2.9. İstatistiksel Analiz

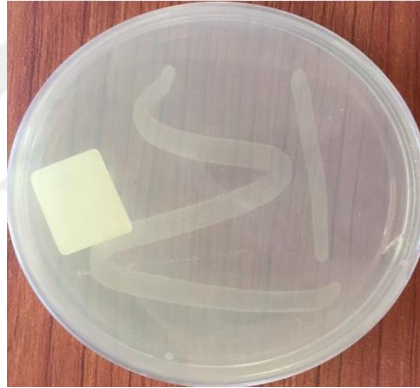
Çeşitli faktörlerin araştırma parametreleri üzerindeki etkisi SAS (2012) yazılımı (Muenchen, 2012) veya İstatistiksel Analiz Sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu tezde, ortalamaları anlamlı bir şekilde karşılaştırmak için en küçük anlamlı fark (LSD) testi (ANOVA) kullanılmıştır. İstatistiksel olarak P değerinin (0,05) altında olması anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

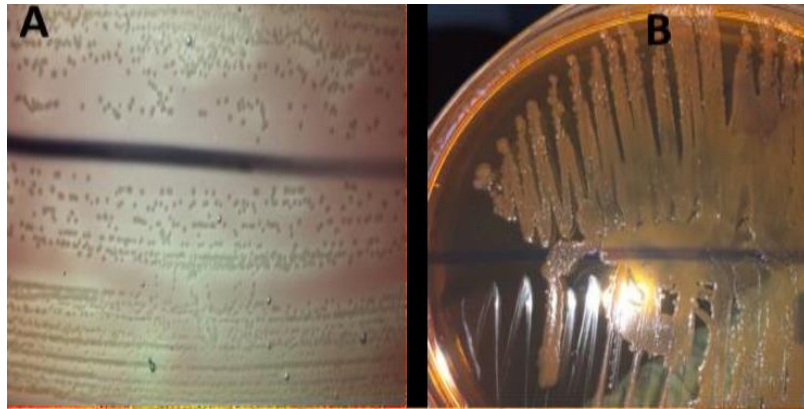
3.1. *A. hydrophila*'nın *C. carpio*'dan İzolasyonu

3.1.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikler

İzolatlar birincil karakterizasyon testlerinde *Aeromonas* olarak Gram negatif, hareketli, fermentatif, oksidaz pozitif, katalaz pozitif (Şekil 3.1), laktoz negatif, glukoz pozitif, maltoz pozitif, üre negatif, jelatin pozitif H₂S üretimi negatif, skor pozitif, α hemoliz ve β hemoliz olarak 7 gün boyunca kanlı agarda ve MacConkey agarda kolonileri soluk laktozsuz fermentör olarak gösterilmiştir (Şekil 3.2) Ayrıca *A. hydrophila* izolatlarının biyokimyasal özelliklerinden biri de sitrat kullanımı açısından negatif, indol ve mannitol testleri açısından ise pozitif olmasıdır (Şekil 3.3, Çizelge 3.1).



Şekil 3.1. TSA agarda üreyen *A. hydrophila* bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri



Şekil 3.2. Kanlı agarda (A) *A. hydrophila* kolonilerinin karakteristiği; MacConkey agarda (B) soluk (laktoz fermentörü olmayan) koloniler

Çizelge 3.1. *A. hydrophila* 'nın biyokimyasal ve morfolojik özellikleri

No.	Özellikler	Reaksiyon
1	Koloni morfolojisi: renk	Kremsi/sarı
2	Boyut	3-4 µ çapında
3	Şekil	Konik
4	Tekstür	Viskoz
5	Gram boyama	(-) ve
6	Çubuklar	(+) ve
7	Mortalite	(+) ve
8	Kapsüler materyal	(-) ve
9	Oksidaz	(+) ve
10	Katalaz	(+) ve
11	Maltoz	(+) ve
12	Glukoz	(+) ve
13	Laktoz	(-) ve
14	Mannoz	(+) ve
15	H ₂ S üretimi	(-) ve
16	α hemolizi	(+) ve

*(+) ve pozitif, (-) ve negatif



Şekil 3.3. *A. hydrophila* izolatlarının biyokimyasal özellikleri: (1): Sitrat kullanımı için negatif sonuç. (2): indol testi için pozitif sonuç. (3): Manitol testi için pozitif sonu

3.1.2. A. hydrophila'nin LD50 Değerinin Saptanması

Çizelge 3.2 çeşitli *A. hydrophila* konsantrasyonlarında *C. carpio* ölüm sonuçlarını göstermektedir. LD50 tam olarak 0,1 ml konsantrasyonda $1,57 \times 10^6$ CFU/ml balığa eşittir.

0,1 ml $1,57 \times 10^4$ CFU/balık konsantrasyonunda 15 günde ölüm görülmezken, 0,1 ml $1,57 \times 10^8$ CFU/ml'de %100 ölüm görülmüştür.

Çizelge 3.2. *A. hydrophila*'nın LD50 sonuçları

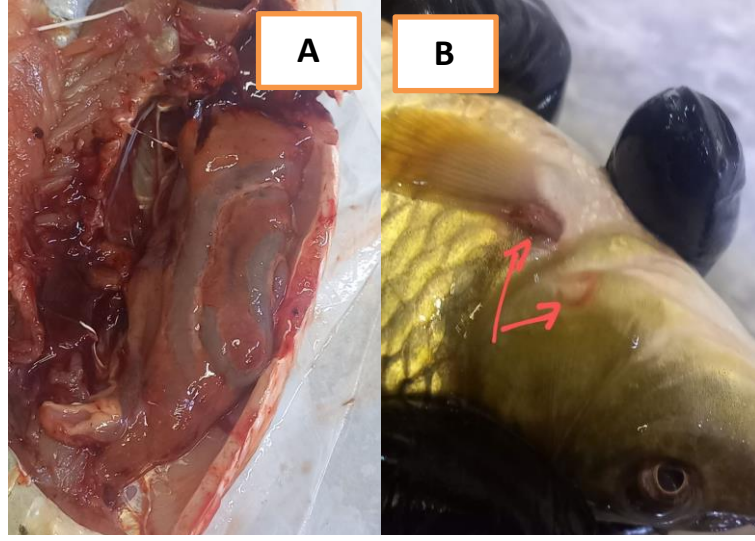
Konsantrasyon için balık sayısı	Bakteriyel Dilüsyon CFU/0.1ml	Bakteriyel dilüsyon	Mortalite oranı	Ölüm	Hayatta kalan	Mortalite% (D)/(D+S)×100
6	10^8	10^{-1}	6/6	6	0	100
6	10^7	10^{-2}	4/6	4	2	60
6	10^6	10^{-3}	3/6	3	3	50
6	10^5	10^{-4}	1/6	1	5	20
6	10^4	10^{-5}	0/6	0	6	0
6	Kontrol	Salin	0/6	0	6	0

LD50= 0,1 ml $1,57 \times 10^6$ CFU/ml.

3.2. Tedavi Öncesi Klinik Belirtiler

Enfekte balıklar 2-3 gün içinde etkilenirken, ölümler enjeksiyonu takip eden üçüncü günde başlamıştır. Pullarda dökülme, anormal gözler, pektoral yüzgeçte çürüme, deride kanama ve koyulaşma, ülserasyon, opasite, ekzoftalmiye ilerleyen tek veya çift taraflı orbital kanama ve her iki göz etkilendiğinde göz küresini yuvadan dışarı iten patlama dış belirtiler arasındaydı (Şekil 3.4A).

İç organlarda ise, karaciğer büyümüş, rengi soluk ve böbrekler nekrotik kanamalar ile hemorajik görünümdeydi (Şekil 3.4B).



Şekil 3.4. Patolojik değişiklik A derisi üzerinde küçük çaplı hemorajiler ve ülserler görüldü B: iç organların hemorajik olduğunu gösteren balık

3.3. *A. hydrophila*'nın Antibiyotik Duyarlılık Bulguları

A. hydrophila tarafından geliştirilen inhibisyon zonu farklı antibiyotikler için çeşitli yanıtlar vermiştir (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.5). Sonuçlar *A. hydrophila*'nın gentamisin, ciprofloksacin, amikacin ve doksisisiklin'e karşı sırasıyla 42, 44, 41,74, 39,00 ve 35,30 mm'lik inhibisyon zonuyla duyarlı olduğunu, trimethoprim ve ampicillin'e karşı ise dirençli olduğunu göstermiştir. doksisisiklin *A. hydrophila*'ya karşı iyi bir inhibisyon göstermiştir.

Çizelge 3.3. Seçilen antibiyotiklere karşı *A. Hydrophila* 'nın hassasiyeti

No.	İlaç	İnhibisyon zonu (mm) Ortalama $\pm$ S.E
1	Doksisilin	35,30 $\pm$ 0,51
2	Trimetoprim	26,81 $\pm$ 0,32
3	Ampisilin	16,62 $\pm$ 0,03
4	Siprofloksasin	41,74 $\pm$ 1,01
5	Amikasin	39,00 $\pm$ 0,32
6	Gentamisin	42,44 $\pm$ 1,81



Şekil 3.5. *A. hydrophila*’nın farklı antibiyotiklerinin inhibisyon zonu

3.4. Doksisiklinin *A.hydrophila*’ya karşı minimum inhıbe edici konsantrasyonu (MIC)

A.hydrophila’nın farklı konsantrasyonlarda antibiyotik Doksisiklin ile karşılaştığında MIC değeri 1,56 µg/mL olarak bulunmuştur Çizelge (3.3)

3.5. Hematolojik Parametreler

Enfekte ve tedavi edilen gruplar için hematolojik parametrelerin sonuçları Çizelge 3.4’te gösterilmiştir.

3.5.1. Kırmızı Kan Hücreleri (RBC) Sayımı

Ortalama eritrosit sayısı değerleri G2 ve G1 gruplarında sırasıyla 0,85 ila 1,23 arasında değişmektedir Çizelge (3.4) *A. hydrophila* ile enfekte olan G2 grubunun kırmızı kan hücresi sayımı (RBC) sonuçları, sırasıyla 0,97 ve $0,85 \times 10^6 / \text{mm}^3$ olan G3 ve G2 ile karşılaştırıldığında $0,85 \times 10^6 / \text{mm}^3$ ’e ulaşan önemli bir düşüş ($P \leq 0,05$) göstermiştir.

20 mg Doksisisiklin ile 5 günlük tedaviden sonra, RBC sayısı sonuçları tedavi grubunda (G3), tedavi uygulanmayan enfekte gruba (G2) kıyasla $0,97 \times 10^6/\text{mm}^3$ ulaşan önemli bir artış ($P \leq 0,05$) göstermiştir.

3.5.2. Beyaz Kan Hücreleri Sayımı

WBC sonuçları, kontrol pozitif grup G2’de kontrol negatif grup G1’e kıyasla anlamlı bir artış ($P \leq 0,05$) olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra, art arda beş gün boyunca 20 mg/kg doksisisiklin ile tedavi edilen G3 grubu ile karşılaştırıldığında kontrol pozitif grup G2’de anlamlı artış ($P \leq 0,05$) görülmüştür Çizelge(3.4)

3.5.3. Kan Hücresi Oranı (PCV %)

Çizelge(3.4) PCV% değerinin tüm deney gruplarında 21,67% ila 29,50% arasında değiştiğini göstermektedir. *A. hydrophila* ile enfeksiyondan sonra PCV (%) sonuçları aşağıdaki gibi kaydedilmiştir, Çizelgete (3.4) gösterildiği gibi kontrol negatif grupta (G1) sırasıyla 21,67% ve 25,32% olan G2 ve G3 ile karşılaştırıldığında 29,50%’lik önemli bir artış ($P \leq 0,05$) olmuştur. Beslenmede 20mg/kg Doksisisiklin alan G3 grubundaki balıklar, kontrol pozitif grupla (G2) karşılaştırıldığında önemli bir artış ($P \leq 0,05$) göstermiştir.

3.5.4. Hemoglobin içeriği (Hb g/dl)

Hb içeriği sonuçları, G2’de (kontrol pozitif grup) kaydedilen en düşük ortalama değerin 5,20 g/dl’ye ulaştığını gösterirken, G1’de (kontrol negatif grup) fark edilen en yüksek değer 10,63 g/dl’ye ulaşmıştır (Çizelge 3.4)Ayrıca, sonuçlar deney süresinin sonunda G3’te (Doksisisiklin grubu) 7,63 g/dl’ye ulaşan önemli bir artış ($P \leq 0,05$) göstermiştir.

Çizelge 3.4. Doksisiklin (20mg/kg/besin) ile tedavi edilen *A.hydrophilia* ile enfekte *C. carpio*'nun bazı hematolojik parametrelerinin değerleri (Ortalama $\pm$ SE)

Gruplar	RBC Hücre/mm ³ ($\times 10^6$)	WBC Hücre/mm ³ ($\times 10^3$)	PCV %	Hb g/dl
N=20				
	Ortalama $\pm$ S. E.	Ortalama $\pm$ S. E.	Ortalama $\pm$ S. E.	Ortalama $\pm$ S. E.
G1	1,23 $\pm$ 0,03A	8,47 $\pm$ 0,38B	29,50 $\pm$ 1,15 A	10,63 $\pm$ 0,38A
G2	0,85 $\pm$ 0,09C	13,08 $\pm$ 0,54 A	21,67 $\pm$ 1,76C	5,20 $\pm$ 0,59C
G3	0,97 $\pm$ 0,02B	9,67 $\pm$ 0,27B	25,32 $\pm$ 1,15B	7,63 $\pm$ 0,38B
LSD	0,19	1,43	4,80	1,58

G1: kontrol negatif, G2: kontrol pozitif, G3: 20 mg Doksisiklin ile tedavi.
Büyük harfler gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.5. Karaciğer Hasarı Enzimleri (ALT, AST ve ALP)

Yüklemeden beş gün sonra, ALT seviyeleri kontrol pozitif ve tedavi edilen grupta (G2 ve G3) sırasıyla (8,03 ve 43,81 U/L), kontrol negatif grup 24,33 U/L'ye kıyasla önemli ölçüde artmıştır ($P \leq 0,05$) (Çizelge 3.5), sonuçlar çalışmanın tüm grupları arasında önemli farklılıklar olduğunu ve kontrol pozitif G2 grubuna kıyasla besinde 20 mg Doksisiklin alan G3 grubunda terapötik yanıt olduğunu göstermiştir.

A.hydrophilia ile enfekte balıklarda AST enzimi için, Çizelge (3.5)'teki sonuçlar kontrol grubu (G1) (143,00 U/L) ile karşılaştırıldığında G2 ve G3'te sırasıyla (197,67 ve 175 U/L) önemli ($P \leq 0,05$) bir artış olduğunu ortaya koymuştur.

Ayrıca, G1 grubu ile karşılaştırıldığında G3'te anlamlı bir artış ($P \leq 0,05$) olduğu görülmüştür. Ayrıca, deney gruplarının ALP enzimi seviyeleri kontrol pozitif ve tedavi edilen gruplarda (G2 ve G3) kontrol negatif grupla (G1) (23,60 U/L) karşılaştırıldığında (41,85 ve 34,03 U/L) önemli bir artış ($P \leq 0,05$) göstermiştir. Ayrıca, G1 grubu ile karşılaştırıldığında G3'te anlamlı bir artış ($P \leq 0,05$) olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.5. Doksisisiklin (20mg/kg/besin) ile tedavi edilen *A. hydrophilia* ile enfekte *C. carpio*'nun karaciğer enzimlerinin değerleri (Ortalama $\pm$ SE)

Gruplar N=20	ALT/ U/L Ortalama $\pm$ S.E.	AST U/L Ortalama $\pm$ S.E.	ALP lu/l Ortalama $\pm$ S.E.
G1	33 $\pm$ 5,4524 C	143,00 $\pm$ 9,53 C	23,60 $\pm$ 5,62 C
G2	82,03 $\pm$ 8,45 A	197,67 $\pm$ 21,88 A	41,85 $\pm$ 4,88 A
G3	81 $\pm$ 6,1543 B	175,00 $\pm$ 13,53 B	34,03 $\pm$ 5,01 B
LSD	7,71	14,66	6,95

G1: kontrol negatif, G2: kontrol pozitif, G3: 20 mg Doksisisiklin ile tedavi.
Büyük harfler gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

3.6. Toplam protein, Albumin, Glukoz ve Kolesterol

Deneyin sonunda, (Çizelge 3.6)'da gösterilen Albumin seviyelerinin sonuçları, sırasıyla (1,18 ve 0,97 g/dl) olan G3 ve G2 gruplarına kıyasla (2,13 g/dl) olan G1 grubunda (enfekte olmayan balık) önemli ($P \leq 0,05$) bir artış göstermiştir. Buna ek olarak, toplam protein seviyeleri G1'de (6,23 mg/dl) sırasıyla (4,68 ve 2,31) olan G3 ve G2'ye kıyasla önemli ölçüde artmıştır ($P \leq 0,05$) ve G3'te G2 grubuna kıyasla önemli ($P \leq 0,05$) bir artış olmuştur (Çizelge 3.6).

Enfekte balık (G2 ve G3) gruplarındaki plazma kolesterol seviyelerinin sonuçları (10,51 ve 7,47 mg/dl), (6,30 mg/dl) olan kontrol negatif gruba (G1) kıyasla önemli ölçüde ($P < 0,05$) artmıştır. Öte yandan, Çizelge (3-6)'teki glikoz seviyelerinin sonuçları, kontrol negatif gruptaki (G1) enfekte olmayan balıklarla karşılaştırıldığında, G2 ve G3 gruplarındaki enfekte balıklarda sırasıyla (116,67 ve 99,36 mg/dl) önemli ($P < 0,05$) bir artış olduğunu ortaya koymuştur.

Çizelge 3.6. Doksisisiklin (20mg/kg/besin) ile tedavi edilen *A.hydrophilia* ile enfekte *C. carpio*'nun biyokimyasal parametrelerinin seviyeleri (Ortalama $\pm$ SE).

Gruplar N=20	Albumin mg/dl	Total protein mg/dl	Kolesterol mg/dl	Glukoz mg/dl
	Ortalama $\pm$ S. E.	Ortalama $\pm$ S. E.	Ortalama $\pm$ S. E.	Ortalama $\pm$ S. E.
G1	2,13 $\pm$ 0,15A	6,23 $\pm$ 0,44A	6,30 $\pm$ 0,35 C	79,42 $\pm$ 0,76 C
G2	0,97 $\pm$ 0,50B	2,31 $\pm$ 0,52C	10,51 $\pm$ 0,50 A	116,67 $\pm$ 0,93A
G3	1,18 $\pm$ 0,26B	4,68 $\pm$ 0,42B	7,47 $\pm$ 0,78B	99,36 $\pm$ 1,21B
LSD	0,91	1,17	1,98	12,40

G1: kontrol negatif, G2: kontrol pozitif, G3: 20 mg Doksisisiklin ile tedavi.
Büyük harfler gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları ($P \leq 0,05$) göstermektedir.

4. TARTIŞMA

A. hydrophila, hem yabani hem de çiftlik balıklarında kuyruk çürümesi ve Epizootik Ülseratif Sendrom gibi hastalıklara neden olan Gram-negatif bir bakteridir. Bu hastalıklar su ürünlerinin genişlemesinin önünde önemli bir engeldir ve kayıplar %45'e kadar çıkmaktadır (Murray ve Peeler, 2012). *A. Hydrophilia* enfeksiyonunun risk faktörü, başta *C. carpio* olmak üzere tüm balık türlerinde arttı. Havuzlarda yetiştirme yoğunlukları arttığında, bu durum daha geniş yerlere de taşınmalıdır.

Bakterilerin konakçının mukozal epiteline yapışması hastalığın ilerlemesinde gerekli bir adımdır (Benhamed vd., 2014). Hidrofobiklik, yüzey yükü, yüzey pürüzlülüğü, yüzey mikro-topografisi, su akışı, yüzey bileşenleri, ortamın pH'ı, viskozite ve diğer parametrelerin tümü bakteri hücrelerinin yüzey mukusuna ilk tutunmasında rol oynar (Cortes vd., 2022). Bu çalışmadaki bulgular, Doksisiklin tedavisinin *A. hydrophila*'nın sağlıklı *C. carpio* mukusuna kemotaktik reaksiyonunu büyük ölçüde azalttığını ortaya koymuştur. *A. hydrophila* hücrelerinin sağlıklı *C. carpio*'ya yapışma kapasitesi de benzer şekilde doksisiklin (DOX) tarafından önemli ölçüde engellenmiştir.

Bunun yanı sıra, geniş spektrumları ve diğer antimikrobiyallere kıyasla düşük fiyatları nedeniyle tetrasiklin ilaçları balık yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bazı bakteriyel balık patojenleri birinci nesil tetrasiklinlere karşı direnç göstermiştir (İbrahim vd., 2020; Kim vd.,2011). Balık hastalıklarının tedavisinde etkili olan ikinci nesil tetrasiklinlerden biri doksisiklindir (Ding vd., 2012).

Bu tez çalışmasındaki ölüm oranları 10^7 , 10^6 ve 10^5 CFU/ml'de sırasıyla %60, 50 ve 20'dir. Selvaraj vd. (2009) adi sazanda *A. hydrophila*'nın LD50 değerini ölçmüş ve $2,94 \times 10^7$ CFU/ml olarak bulmuştur. Her iki yavru grubu için, Sajid vd. (2021) intraperitoneal olarak $0,3 - 1,5 \times 10^6$ CFU/ml kullanırken, Hamouda vd. (2019) $1,5 \times 10^8$ CFU/ml kullanmıştır. Elwafai vd. (2020), siprinid çopra balığı *A. hydrophila* ile intraperitoneal olarak enjekte ederken, LD50'nin $2,3 \times 10^6$ CFU/ml olduğunu bulmuşlardır. *A. hydrophila* genellikle sucul bir habitatta izole edildiğinden, aşırı stoklama ve kötü su kalitesi gibi akut stres faktörlerinin *C. carpio*'nun toplu ölümüne neden olduğu sonucuna varmak mümkündür. Yüksek ölüm oranı (%60), mikroorganizma tarafından salgılanan endotoksine bağlanabilir (İbrahim vd.,2020; Galindo vd., 2004; Vazquez-Juarez vd., 2003).

Bu tezde art arda 5 gün boyunca yemde 20 mg /kg BW dozunda DOX uygulaması etkili olmuş ve *A. hydrophila* ile enfekte balıkların hayatta kalma oranının artmasına neden olurken, ölümler enfekte olmayan grupta % 60'tan DOX ile tedavi edilen grupta % 20'ye düşmüştür. Balıkların *A. hydrophila* ile enfeksiyonundan sonra beslenme rejiminde DOX kullanımı hastalık belirtilerinin temizlenmesine yardımcı olmuş ve balıkların iyi durumda kalmasını sağlamıştır. Benzer şekilde Nasr (2014) oksitetrasiklin ile tedaviden sonra *A. hydrophila* ile enfekte Nil tilapisinin ölüm oranının %20'ye düştüğünü kaydetmiştir.

Sazan, Irak'ın önemli gıda kaynaklarından biridir ve dünyadaki diğer birçok ülkede olduğu gibi Irak'ta da su ürünleri yetiştiriciliğinin önünde engeller bulunmaktadır; bunlardan biri de bakteriyel hastalıkların neden olduğu sağlık sorunlarıdır (Muslem vd., 2021). *A. hydrophila*, balıklar, kuşlar, insanlar, sürüngenler ve çok sayıda memeli de dahil olmak üzere çeşitli hayvanlarda septisemi, gastroenterit ve nekrotizan fasiite neden olan anaerobik kemo organ heterotrofik bir bakteridir. Ayrıca *A. hydrophila*, diğer virülans faktörlerinin yanı sıra biyofilmler, sitotoksinler, adezyonlar, lipazlar, hemolizinler ve proteazlar üretebilir (Rasmussen-Ivey vd., 2016).

Mevcut tez çalışmasındaki bulgular, *A. hydrophila* toksinlerinin neden olduğu mide, karaciğer, solungaç epiteli, böbrek hematopoetik dokusunda enterit ve kanama ile dalak kılıfı ve böbreklerde nekroz tespit eden Badawi ve Bawazir (2019)'in bulgularıyla tutarlıdır.

Bu tezde *C. carpio*'nun ölümüne açıkça *A. hydrophila* neden olmuştur. Enfeksiyonun pato-fizyolojisini anlamak amacıyla, *A. hydrophila*'dan üretilen bir dizi virülans faktörü önerilmiştir (Rasmussen-Ivey vd., 2016).

Birçok *Aeromonas* türü hemolitik, sitotoksik ve enterotoksin özelliklerine sahip toksinler içerir (Chacón vd., 2003). Bu bakteriyel enfeksiyonun patolojisi ya septisemi ya da toksemidir (Kingombe vd., 2010; Zhang vd., 2020).

Aeromonas türleri tatlı su balıklarında ve kültür balıklarında hemorajik deri lezyonlarına neden olduğu bazı araştırmacılar tarafından fark edilmiştir (Beaz-Hidalgo ve Figueras, 2013; Gao vd., 2016; Li vd., 2019; Skwor vd., 2014).

Azzam-Sayuti vd. (2021) ve Saharia vd. (2018) tarafından Nil tilapisi *O. niloticus* ve Hint büyük sazanı *Labeo rohita*'da tanımlanan *Aeromonas* enfeksiyonunun tipik semptomları ve lezyonları, Nil tilapisi *O. niloticus* ve Hint büyük sazanı *Labeo rohita*'da (Saharia vd.,

2018) yapılan aşağıdaki araştırmalarında sergilenmiştir. Bakteri konsantrasyonları arttıkça, daha fazla toksin üretildiği ve potansiyel olarak balıkların iç organlarına zarar verdiği için ölüm oranı da artmıştır (Dong vd., 2017). *Aeromonas* türleri balıklarda akut ve kronik enfeksiyona neden olma kapasitesine sahiptir.

Kültür balıklarında enfekte olan *Aeromonas* türleri (özellikle *A. hydrophila*) tedavisi için birçok işlem vardır, bunlardan biri antimikrobiyal ilaçlardır. Bu nedenle antimikrobiyal duyarlılık testleri etkili bir tedavi için önem arz etmektedir (Skwor vd., 2014). Bu tez çalışmasının sonuçları, *A. hydrophila*'nın sırasıyla gentamicin, ciprofloksacin, amikacin ve doksisisiklin'e duyarlı olduğunu, trimethoprim ve ampicillin'e ise dirençli olduğunu göstermiştir. Doksisisiklin *A. hydrophila*'ya karşı iyi bir inhibisyon göstermiştir.

Nawaz vd. (2006); Adanir ve Turutoglu (2007) ve Hassan vd. (2017), yakın zamanda keşfedilen 6 genin amoksisilin, penisilin ve diğer antibiyotiklere karşı direncin *Aeromonas* cinsindeki antibiyotik direncinden sorumlu olduğu göstermiştir.

MIC, duyarlılık testleri, sürdürülebilir ve ulaşılabilir ilaç seviyeleri dahil olmak üzere bir dizi faktöre dayanmaktadır. MIC testi, tekrarlanabilirliği, hızı, etkinliği, basitliği ve minimum maliyeti ile duyarlılık testi için kabul edilebilir bir yöntem olarak bilinmektedir. (Max vd., 2011). Bu tezde sazan balığından izole edilen *A. hydrophila*'ya karşı DOX'un MİK değeri 1,56 µg/mL olarak belirlenmiştir. Daha önce belgelendiği gibi (Ibrahim vd., 2020). *A. hydrophila* izolatları DOX duyarlılığı açısından incelenmiş ve sonuçlar test edilen izolatların %97,9'unun ≤ 4 µg/mL konsantrasyonda DOX'a duyarlı olduğunu ortaya koymuştur Bu bulgu, CLSI tarafından tanımlanan MIC kırılma noktalarına uygundur (CLSI, 2008).

Hematolojik belirteçler uzun zamandır balık sağlığının belirlenmesinde yararlı araçlar olarak kabul edilmektedir. Bu ölçümler balık türü, yaşı, cinsel olgunluk döngüsü ve sağlık durumu gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Hrubec vd., 2001). Su kalitesi, sıcaklık, gıda bulunabilirliği ve balıkların fizyolojik sağlığı, balıkların kan bileşenleri üzerinde doğrudan veya dolaylı etkilere sahiptir (Iqbal vd., 1997). Fizikokimyasal elementlerdeki değişiklikler balıkların kan parametrelerinde ortaya çıkabilir (Abdul vd., 2011).

Normal koşullarda kırmızı kan hücrelerinin sayısı sabittir. Dış faktörlerin balık kan kompozisyonu üzerinde önemli bir etkisi olmasına rağmen, mevcut çalışmada G2 ve G3'teki düşük RBC değeri, *A. hydrophila* ile enfekte sazanlarda artan lökositöz aktivitesinin bir sonucu

olarak RBC'nin etkilendiğini veya yok edildiğini gösterebilir (Harikrishnan vd., 2011). Bu bulgu, chum somonunda (*Oncorhynchus keta*) eritrosit sayısında ve hemoglobin konsantrasyonunda azalma tespit eden Haney vd. (1992) ile tutarlıdır. *A. hydrophila* ile enfekte olmuş Carpio'da (*Incyprinus Carpio*) RBC'lerin artan yıkımı, kaybı veya baskılanmasına atfedilebilir (Jumma vd., 2022).

Bu tez çalışmasında, RBC, PCV ve Hb değerlerindeki azalma, ilerlemiş hemorajik nekrotik lezyonların bir sonucu olarak vücut sıvılarının kaybindan kaynaklanan hemodilüsyona bağlı olabilir. Daha az eritrosit varlığı ve daha düşük hematokrit yüzdesi, eritrositlerin lökosit aktivitesi tarafından yok edildiğini göstermektedir. RBC miktarını artırarak Hb ve RBC'lerin azalan oksijen taşıma kabiliyetini telafi etmek gibi bazı değişkenler, kirleticilere ve ağır metallere maruz kalmanın ardından artan RBC ve Hb içeriğinden sorumlu olabilir (Jumma vd., 2022).

Deney grubunun sonuçlardaki bu azalma (RBC'ler, HB ve PCV), RBC'nin şişmesinin yanı sıra bakteri enfeksiyonu nedeniyle dalak ve diğer hematopoietik organlardan hemoglobinin zayıf mobilizasyonunun bir sonucu olabilir (Yang vd., 2018). Deney süresi boyunca, kontrol pozitif grupta (G2), tedavi edilen ve kontrol negatif gruplara (G1 ve G3) kıyasla WBC sayısı da artmıştır. Bu sonuç, enfeksiyona karşı bir bağışıklık tepkisi olarak enfekte grupta WBC sayısının arttığını tespit eden (Sahoo ve Mukherjee, 2019) çalışmayla desteklenmiştir. WBC seviyeleri, patojenin büyümesinin baskılandığını gösteren kontrol negatif ve tedavi edilen grup değerlerine kıyasla önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte, enfekte gruptaki (RBCs, HB ve PCV) seviyeleri, çalışmadaki kontrole kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Bu değerlerin izlenmesi ve lökositlerin profilinin çıkarılması, balığın genel bağışıklık durumu ve anemiye yol açan RBC'lerin yıkımı hakkında bilgi sağlar (Nobata vd., 2022). Bu parametrelerdeki bu düşüşün balıklarda daha güçlü bir doğuştan gelen bağışıklık tepkisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Wiegertjes vd., 2016).

Serum AST, ALT ve ALP hepatoselüler hasarı değerlendirmek için hassas göstergelerdir (İbrahim vd., 2020). Adi sazanın *A. hydrophila* ile enfekte balıklarda ALT, AST ve ALP'de önemli bir artış görülmektedir.

Halliwell (1981) enfeksiyöz ajan toksinlerinin etkisiyle oluşan karaciğer hasarı sonrasında enzim aktivitelerindeki artış olduğunu belirtmiştir. Wells vd. (1986) kreatinin seviyesinin artmasını böbreğin glomerüler filtrasyon hızının düşük olduğunun göstergesi

olduğunu belirtmiştir (Trumble vd., 2006). Bu sonuçlar, *A. hydrophila* ile enfekte balıklarda serum enzimatik aktivitelerinde bir artış kaydeden Ahmed (2000) ve Amer vd. (2009) tarafından bildirilenlerle uyumludur. Benzer sonuçlar Souza vd. (2016); Dos Santos vd. (2017) tarafından da *A. hydrophila* ile enfekte balıklarda tespit edilmiştir.

A. hydrophila ile enfekte balıkların 5 gün boyunca yemde DOX (20 mg/Kg BW) ile muamele edilmesi, tedavi sonrası serum ALT, AST ve ALP seviyelerinde enfekte olmayanlara kıyasla önemli bir iyileşmeye neden olmuştur. Bu durum, kullanılan ilacın böbrek ve karaciğerdeki yıkıcı ve toksik etkilerini sınırlayan bakteriyostatik etkisinden kaynaklanıyor olabilir (Flower vd., 2012).

Kan serumundaki albumin ve toplam protein konsantrasyonu balık sağlığı için temel bir belirteç olarak kullanılmıştır (El Mesallamy vd., 2016) ve artan serum protein albumin seviyelerinin balıklarda doğuştan gelen yanıtla bağlantılı olduğu varsayılmaktadır (Fatma vd., 2020). Bu çalışmada, kontrol pozitif ve tedavi edilen grupla karşılaştırıldığında, kontrol negatif grupta serum toplam protein ve albuminde önemli artışlar olmuştur. Albumine benzer şekilde, sağlıklı balıklar en yüksek seviyelere sahipken, enfekte balıklar en düşük seviyelere sahipti. Bu bulgular Kumar vd. (2017) ve Kumar vd. (2018) ile uyumludur.

Yang ve Chen (2013)'e göre, *A. hydrophilia* ile enfekte balıklarda toplam serum proteini ve albumindeki düşüş, büyük miktarda kan bileşeninin kaybolmasına neden olan ve hipoproteinemi ile sonuçlanan kan damarı hasarından kaynaklanmaktadır.

Deney sonucunda (G3) tedavi gruplarındaki genel protein seviyeleri G2 grubuna göre önemli ölçüde daha yüksektir ($P \leq 0,05$). Albumin ve toplam proteindeki artış bu iyileşmeye bir delil olarak görülmektedir. Daha yüksek toplam plazma proteini ve albuminin daha üstün bir doğuştan gelen bağışıklık tepkisiyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Costas vd., 2013).

Öte yandan Albümin sonuçları, G1 grubunda (enfekte olmayan balıklar) sırasıyla G3 ve G2 gruplarına kıyasla anlamlı ($P \leq 0.05$) artış gösterdi. Ek olarak, toplam protein seviyeleri G1'de sırasıyla G3 ve G2'ye göre anlamlı olarak artmış olup, ($P \leq 0.05$) ve G3'te G2 grubuna göre anlamlı ($P \leq 0.05$) bir artış olmuştur. Bu, Maqsood ve arkadaşları tarafından tarif edildiği gibi enfekte balıkların karaciğer ve böbrek hasarına bağlı olabilir. (2009) dsö, birçok balık hastalığının toplam protein konsantrasyonunu değiştirdiğini, enfeksiyondaki albüminin *Aeromonas hydrophila* ile enfekte olmuş balıklarda seviyesinin düşmesine neden olduğunu

bildirmiştir. Ayrıca Osmani ve ark., (2019) Sağlıklı gruptaki toplam protein, albümin ve globulin seviyesindeki artışın, kültürlenmiş ortak sazanın iyi beslenme durumundan kaynaklanabileceğini tespit etti.

Osmani vd. (2019) sağlıklı gruptaki albumin, toplam protein ve globulin seviyesindeki artışın, iyi beslenen kültürü yapılan adi sazanların durumundan kaynaklanabileceğini tespit etmiştir.

Magnadottir vd. (2015) birçok hastalık durumunda toplam protein konsantrasyonundaki azalmanın, benzer şekilde stres ve enfeksiyonun balıkların iştahını azaltabileceğini ve böylece serum protein seviyesinin düşmesini ve sentez kapasitesini etkileyebileceğini ve hemodilüsyon yoluyla Emilimi veya protein kaybını azaltabileceğini ortaya koymuştur.

Yang ve Chen (2013) kan proteinlerinin hidrojen iyonu konsantrasyonunu ve ozmotik basıncı korumak için tampon görevi gördüğünü, birçok hastalık durumunda sentez kapasitesinin azalması, Emilimin azalması veya protein kaybı nedeniyle toplam protein konsantrasyonunun azaldığını bildirmiştir.

Kolesterol için, bu tez çalışmasında kontrol ve tedavi edilen balık gruplarına (G1 ve G3) kıyasla *A. hydrophila* ile enfekte balıklarda (G2) serum kolesterol seviyesinde bir artış gözlenmiştir. Yüksek kolesterol seviyeleri lipid ve lipoprotein metabolizması bozukluklarına, özellikle de karaciğer fonksiyon bozukluğuna işaret etmektedir (Mensing vd., 2005).

Stres koşulları altındaki balıklarda, balık vücudunda birincil ve ikincil tepkiler olarak kabul edilen tepkiler görülmektedir. Birincil tepki, merkezi sinir sistemi (MSS) tarafından değişen bir durumun algılanması ve kortizol ve katekolaminler (adrenalin ve noradrenalin) gibi stres hormonlarının kan akışına salınmasıdır (Ray ve Sinha, 2014). İkinci tepkilerin ortaya çıkması, salgılanan stres hormonunun kan ve doku kimyasında değişikliklere yol açması sonrasında olur (Pal vd., 2015). Kortizol, katekolamin salgılayan balık ve kromaffin hücrelerinde glikojenoliz ve glukoneogenez süreçlerini kolaylaştırır, glikojenolizi daha da artırır ve kardiyovasküler ve solunum fonksiyonlarını modüle eder (Wendelaar Bonga, 1997).

Mevcut tez çalışmasındaki glikoz seviyesi sonuçları, G1 grubuna kıyasla G2 ve G3 gruplarında *A. hydrophila* ile enfekte balıklarda önemli bir artış olduğunu ortaya koymuştur. Bulgular, tüm metabolik yolun acil bir durumda balığın talebine göre yeterli enerji üretmek

için substrat seviyesini (glikoz) artırdığını bildiren Pal vd. (2015) ve Rottmann vd. (1992) ile uyumludur.

A. hydrophila ile enfekte balıklarda kontrol balıklarına kıyasla serum glikoz seviyesindeki önemli artışın öncelikle bakteriyel enfeksiyonun neden olduğu akut streten kaynaklandığı açıktır. Benzer gözlemler diğer bazı balıklarda da yapılmıştır (Chandran vd., 2002).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması sonrasında bulunan yüksek *A. hydrophila* izolasyon oranı, Irak'ın Bağdat ilindeki su ürünleri yetiştiriciliğinde etkenin yaygın bir şekilde bulunduğunu göstermektedir. Bu durum, *A. hydrophila*'nın Irak'taki balık çiftliklerinde birincil istilacı olduğunu göstermektedir. Bu çalışma sonrasında görülen yüksek antibiyotik direnci önemlidir. Bu enfekte balıklardan gıda zincirinde beslenen insanlarda antibiyotik dirençli etkenler halk sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Ayrıca, DOX'un yüksek terapötik etki ve minimum yan etki ile Sazan balıklarındaki hareketli *Aeromonas* enfeksiyonunun tedavisi için tercih edilen ilaçlardan biri olabileceği sonucuna varılmıştır.

Enfekte balıkların solungaç ve böbreklerinden izole edilen *A. hydrophila* yüksek vsahipti ve deneysel enfekte balıklarda deri ülseri, karın şişliği, iç organ kanaması ve %80'e varan ölüm oranı gibi çeşitli klinik tablolara neden oldu, LD50 $1,57 \times 10^6$ CFU ml idi. Bu çalışmada kullanılan DOX konsantrasyonunun *A. hydrophila* ile enfekte *C. carpio*'ya karşı faydalı ve koruyucu bir etkisi olduğu kanıtlanmıştır. G3, *A. hydrophila* ile enfekte sazanlarda daha iyi bir etkiyle balıklarda hayatta kalma oranı göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DOX uygulamalarında RBC sayısında önemli bir artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca, WBC sayısı 15 günde önemli bir artış göstermiştir ve sonuçlar DOX uygulamasından sonra hemoglobin içeriği ve PCV değerinde önemli bir fark olduğunu göstermiştir, bu tedavi koşulları altında balıklara zararlı toksik tepkiler ortaya çıkmamıştır.

Tedavi edilen grubun (G3) *A. hydrophila* ile enfekte *C. carpio*'ya karşı yararlı bir etkisi olduğu kanıtlanmış olup, toplam protein, albumin, globulin, karaciğer enzimleri, kolesterol ve glikoz sonuçlarına göre anlamlı bir farklılık göstermiştir..

Irak sazan balığında Dox'un biyolojisi, kimyası, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini karakterize etmek için gelecekte araştırma yapılması gerekmektedir.

DOX programını su banyosu veya enjeksiyon şeklinde kullanarak aynı balık türünde çok çeşitli patojenlere ve antifungal ve parazitlere karşı daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Sazan balıklarının havuzda hayatta kalma ve *A.hydrophila* enfeksiyonuna karşı direncinin genetik olarak arttırılması olasılığının, testi ve saha verilerine dayalı genetik seleksiyon yoluyla araştırılması önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Abbott, S.L.; Cheung, W.K., and Janda, J.M. (2003). The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2348-23.
- Abdelsalam, M., Elgendy, M.Y., Elfadadny, R.M., Ali, S.S., Sherif, A.H., and Abolghait, S.K. (2023). A review of molecular diagnoses of bacterial fish diseases. *Aquaculture International*. 31:417–434.
- Abdelsalam, M., Elgendy, M.Y., Shaalan, M., Moustafa, M., and Fujino, M. (2017). Rapid identification of pathogenic streptococci isolated from moribund red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(1), 50-59
- Abdul, N., Venkaeswarlu, P., and Janaiah, C. (2011). Biochemical alteration induced by triazophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Annals of Biological Research*, 2(4), 31-37.
- Abdullahi, S.N., Zakariyya, M., Hassan, Z.Y., and Ahmad, M.K. (2020). In Vitro Effect Of Pharmaceutical Effluent on Haematology and Biochemical Responses In African Catfish (*Clarias gariepinus*). *FUDMA Journal of Sciences*, 4(4), 391-400.
- Abid, O. I., Al-Hamdani, A. H. (2016). Study of the causative agents of ulcerated skin lesions of carp fish ponds at Sulaimani province. *Basrah Journal oeterinary Research*, 15(3), 1-19.
- Acharya, G., and Mohanty, P. K. (2018). Effect of sex on haemocytochemical profiling of silver tiger fish (*Danio* *polota* Hamilton, 1822). *Comparative Clinical Pathology*, 27, 1335-1342.
- Adams A, and Thompson KD (2011) Development of diagnostics for aquaculture: challenges and opportunities. *Aquac Res* 42:93–102
- Adanir, D.O.R. and Turutoglu, H. (2007). Isolation and antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* in a carp (*Cyprinus carpio*) hatchery farm. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 51: 361-364.
- Afifi, S. H., Al-Thobiati, S., and Hazaa, M.S. (2000). Bacteriological and histopathological studies on *aeromonas hydrophila* infection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from fish farms in Saudi Arabia. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 42(84), 195-205.
- Agnew, W. and Barnes, A.C (2007) *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Vet. Microbiol.*, 122(1-2):1-15.
- Aguilera-Arreola, M.G., Hernandez Rodriguez, C., Zuniga, G., Figueras, M.J., and Castro-Escarpulli, G. (2005). *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 231–240.
- Ahmed, A.M. (2000): Pharmacological effects of some recent antimicrobials on catfish. M.V.Sc. Thesis (pharmacology) Fac Vet Med. Zag Univ.
- Ai, X.H.; Ding, Y.M.; Wang, K.Y.; Liu, Y.T. and Shen, D.Y. (2011): Study on pharmacokinetics/pharmacodynamics model of doxycycline against *Aeromonas hydrophila* in serum of channel catfish *ex vivo*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 35: 893–899.

- Al-Dohail, M.A., Hashim, R., and Aliyu-Paiko, M. (2011). Evaluating the use of *Lactobacillus acidophilus* as a biocontrol agent against common pathogenic bacteria and the effects on the haematology parameters and histopathology in African catfish *Clarias gariepinus* juveniles. *Aquaculture Research*, 42(2), 196-209
- Ali, M.F., Rashid, M.M., Rahman, M.M., and Haque, M.N. (2014). Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* and its control trial. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*, 7(6), 21-24.
- Amer, M.S.; El-Sayed, M.G. and Abd ELFatah, R.A. (2009): Pharmacological studies on some antibacterial drugs in fish. *Mansoura Vet Med J*, (9):165-184.
- Arcos, M.L., de Vicente, A.N.T.O.N.I.O., Morínigo, M.A., Romero, P.E.D.R.O., and Borrego, J. J. (1988). Evaluation of several selective media for recovery of *Aeromonas hydrophila* from polluted waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(11), 2786-2792.
- Arcos, M.L., De Vicente, A., Morinigo, M.A., Romero, P. and Borrego, J.J. (1988). Evaluation of several selective media for recovery of *Aeromonas hydrophila* from polluted waters. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2786–2792.
- Asao, T., Kinoshita, Y., Kozaki, S., Uemura, T., and Sakaguchi, G. (1984). Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.* 46, 122–127.
- Asean. (2013) Guidelines for the Use of Chemicals in Aquaculture and Measures to Eliminate the Use of Harmful Chemicals. Available from: *chemicals%20final.pdf*. Retrieved on 17-10-2020.
- Asmat, A., and Gires, U. (2002). The occurrence of aerolysin-positive *Aeromonas hydrophila* strains in sea water and associated with marine copepods. In *Proceedings of the Regional Symposium on Environment and Natural Resources. Hotel Renaissance Kuala Lumpur, Malaysia* (Vol. 1, pp. 495-502).
- Asmat, A., and Gires, U. (2002). The occurrence of aerolysin-positive *Aeromonas hydrophila* strains in sea water and associated with marine copepods. In *Proceedings of the Regional Symposium on Environment and Natural Resources. Hotel Renaissance Kuala Lumpur, Malaysia* (Vol. 1, pp. 495-502).
- Atlas, M.; Parks, C. and Brown, A. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology. Mosby Year Book, Inc., USA.
- Austin, B., Austin, D.A., & Munn, C.B. (2007). Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish (Vol. 26, p. 552) Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Austin, B. (2019). Methods for the diagnosis of bacterial fish diseases *Marine Life Science and Technology* 1, 41-49, 2019
- Azzam-Sayuti, M., Ina-Salwany, M.Y., Zamri-Saad, M., Yusof, M.T., Annas, S., Najihah, M.Y. and Amal, M.N.A. (2021). The prevalence, putative virulence genes and antibiotic resistance profiles of *Aeromonas* spp. isolated from cultured freshwater fishes in peninsular Malaysia. *Aquaculture*, 540.
- Badawi, I. H., and Bawazir, S. S. (2019). Morphological Examination and Histopathological Investigation of Gills In Common Carp, Experimentally Infected With *Aeromonas hydrophila*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, B. Zoology*, 11(3), 159-168
- Barnett, T.C., Kirov, S.M., Strom, M.S., and Sanderson, K. (1997). *Aeromonas* spp. possess at least two distinct type IV pilus families. *Microbial pathogenesis*, 23(4), 241-247.

- Bauer, A.W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J.L. and Figueras, M.J. (2010). Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.*, 33, 149–153
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M.J., and Romalde, J.L. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* (2009), 32, 471–479.
- Beaz-Hidalgo, R., and Figueras, M.J. (2013). *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of fish diseases*, 36(4), 371-388.
- Benhamed, S., Guardiola, F.A., Mars, M., and Esteban, M.Á. (2014). Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Veterinary microbiology*, 171(1-2), 1-12.
- Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 3–8.
- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., and Corner, R. (2010). Aquaculture: global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2897-2912.
- Braun, M., Stuber, K., Schlatter, Y., Wahli, T., Kuhnert, P., and Frey, J. (2002). Characterization of an ADP-ribosyltransferase toxin (AexT) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J. Bacteriol.* 184, 1851–1858.
- Burr, S.E., Stuber, K., and Frey, J. (2003). The ADP-ribosylating toxin. Aex T, From *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is translocated via a type III. Secretion pathway. *J. Bacteriol.* 185, 6583–6591.
- Cai, H.Y., Caswell, J.L., and Prescott, J.F. (2014). Nonculture molecular techniques for diagnosis of bacterial disease in animals: a diagnostic laboratory perspective. *Veterinary pathology*, 51(2), 341-350
- Canals, R., Altarriba, M., Vilches, S., Horsburgh, G., Shaw, J.G., and Tomas, J.M. (2006). Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. *J. Bacteriol.* 188, 852–862.
- Carvalho-Castro, G.A., Lopes, C.O., Leal, C.A.G., Cardoso, P.G., Leite, R.C., and Figueiredo, H.C.P. (2010). Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Veterinary microbiology*, 144(3-4), 371-376.
- Cascón, A., Yugueros, J., Temprano, A., Sánchez, M., Hernanz, C., Luengo, J.M., and Naharro, G. (2000). A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and immunity*, 68(6), 3233-3241.
- Caseltz F.H. (1966) *Pseudomonas—Aeromonas und ihre humanmedizinische Bedeutung*. VEB Gustav Fisher Verlag, Jena .
- Castro-Escarpulli, G., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernández-Rendón, E., Aparicio, G.O. and Chacon, M. R. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84(1), 41-49.

- Chacón, M.R., Figueras, M.J., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., and Guarro, J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84, 269-278.
- Chandran, M.R., Aruna, B.V., Logambal, S.M., and Michael, R.D. (2002). Immunisation of Indian major carps against *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection. *Fish & Shellfish Immunology*, 13(1), 1-9. .
- Chang, C.I., Hung, P.H., Wu, C.C., Cheng, T.C., Tsai, J.M., Lin, K.J., and Lin, C.Y. (2012). Simultaneous detection of multiple fish pathogens using a naked-eye readable DNA microarray. *Sensors*, 12(3), 2710-2728
- Chang, C.Y., Thompson, H., Rodman, N., Bylander, J., and Thomas, J. (1997). Pathogenic analysis of *Aeromonas hydrophila* septicemia. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 27(4), 254-259.
- Cianciotto, N.P. (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* 13, 581–588. doi: 10.1016/j.tim.2005.09.005.
- Citarasu, T. (2010) Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International* 18 (3), 403-414
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008): Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Third Edition M31-A3. Wayne, PA, USA: CLSI. DOI
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2020). Epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing, third edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA. M59Ed3
- Cortes, J., Castro, A., Arboleda, G., Sepulveda, V., Piragauta, N., and Higuera, O. (2022). Hydrogeological and hydrogeochemical evaluation of groundwaters and surface waters in potential coalbed methane areas in Colombia. *International Journal of Coal Geology*, 253, 103937
- Costas, B., Aragão, C., Dias, J., Afonso, A., and Conceição, L.E. (2013). Interactive effects of a high-quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39, 1141-1151.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin. Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.
- Cruickshank, R. (1974). *Medical Microbiology: Practice of Medical Microbiology*. 12th Edition. Publisher, Churchill Livingstone, 587 pages
- Dacie, J.V. and S.N. Lewis. (1984). *Practical Haematology*. 6th Edition. Edinburg, Churchill Livingstone.
- Daskalov, H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food control*, 17(6), 474-483.
- De Bruijn, I., Liu, Y., Wiegertjes, G.F., and Raaijmakers, J.M. (2018). Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(1), 1-16.

- Dias, M.K., Sampaio, L.S., Proietti-Junior, A.A., Yoshioka, E.T., Rodrigues, D.P., Rodriguez, A.F., ... & Tavares-Dias, M. (2016). Lethal dose and clinical signs of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. *Veterinary microbiology*, 188, 12-15.
- Ding, J.R., Ai, X.H., Wang, K.Y., Liu, Y.T., Yuan, K.P. and Yuan, D.N. (2012): Studies on tissue distribution and the elimination regularity of doxycycline residues in *Ictalurus Punctatus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 36: 126–132.
- Donlan, R.M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical infectious diseases*, 33(8), 1387-1392.
- Dooley, J.S.G., W. McCubbin, C.M. Kay, and T.J. Trust. (1988). Isolation and biochemical characterization of the S-layer protein from a pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain. *J. Bacteriol.* 170:2631-2638.
- Dos Santos, A.C.; Sutili, F.J.; Heinzmann, B.M.; Cunha, M.A.; Brusque, I.C.M.; Baldisserotto, B. and Zeppenfeld, C.C. (2017): *Aloysia triphylla* essential oil as additive in silver catfish diet: Blood response and resistance against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol*, 62: 213-216.
- Duarte, A.S., Cavaleiro, E., Pereira, C., Merino, S., Esteves, A.C., Duarte, E.P. (2015). *Aeromonas piscicola* AH-3 expresses an extracellular collagenase with cytotoxic properties. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 288–297.
- Dumas, B.T. and Biggs H.G. (1972). *Standard Methods Of Clinical Chemistry*. 7 Academic Press New York, P 175.
- Ebanks, R.O., Knickle, L.C., Goguen, M., Boyd, J.M., Pinto, D.M., and Reith, M. (2006). Expression of and secretion through the *Aeromonas salmonicida* type III secretion system. *Microbiology* 152, 1275–1286.
- Eissa, A.E., Abou-Okada M, Alkurdi ARM, El Zlitne R.A., Prince A., Abdelsalam M., Derwa HIM. (2021a) Catastrophic mass mortalities caused by *Photobacterium damsela* affecting farmed marine fish from Deeba Triangle. *Egypt Aquac Res* 52:4455–4466.
- El Mesallamy, A.M., Ahmad, M.H., Souleman, A.M., El Morsy, A.T., and Abd El-Naby, A.S. (2016). Effects of Roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.)-supplemented diets on growth and disease (*Aeromonas hydrophila*) resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 15(2), 78.
- Elliott, C. (1943). Recent developments in the classification of bacterial plant pathogens. *Botanical Review*, 9(10), 655-666.
- El-Son MAM, Nofal MI, and Abdel-Latif HMR (2021) Co-infection of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diseased-farmed striped mullet (*Mugil cephalus*) in Manzala, Egypt a case report. *Aquaculture* 530:735738.
- Elwafai, N.A., El-Zamik, F.I., Mahgoub, S.A.M., and Atia, A. (2020). Isolation of *Aeromonas* bacteriophage AvF07 from fish and its application for biological control of multidrug resistant local *Aeromonas veronii* AFs2. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 47(1), 179-197.
- Erdem, B., Kariptaş, E., Cil, E., and Işık, K. (2011). Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from food samples in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 35(4), 463-472.

- Erer, H. (1981): The investigation of the pathologic findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection (Bacterial Haemorrhagic Septicaemia) in carp. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi.
- Erova, T.E., Kosykh, V.G., Fadl, A.A., Sha, J., Horneman, A.J., and Chopra, A.K. (2008). Cold shock exo ribonuclease R (VacB) is involved in *Aeromonas hydrophila* pathogenesis. *J. Bacteriol.* 190, 3467–3474.
- Erova, T.E., Pillai, L., Fadl, A.A., Sha, J., Wang, S., and Galindo, C.L. (2006). DNA adenine methyl transferase influences the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 74, 410–424.
- FAO, 2016. Data needs for blue growth. In FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all, pp. 108–113. Rome. 200 pp.
- FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 – Meeting the Sustainable Development Goals. Rome. 224 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. (also available at.
- Farzadnia A, and Naeemipour, M. (2020) Molecular techniques for the detection of bacterial zoonotic pathogens in fish and humans. *Aquac Int* 28:309–320.
- Fatma, N., Taslim, N.A., and Nurilmala, M. (2020). The protein and albumin contents in some species of marine and brackishwater fish of South Sulawesi, Indonesia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation*, 13(4), 1976-1985.
- Flower, R., Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. and Henderson, G. (2012): Rang and Dale's *Pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone press 776 p.
- Fulton, K.M., Mendoza-Barbera, E., Twine, S.M., Tomas, J.M., and Merino, S. (2015). Polarglycosylated and lateral non-glycosylated flagella from *Aeromonas hydrophila* strain AH-1 (Serotype O11). *Int. J. Mol. Sci.* 16, 28255–28269.
- Galan, J.E., and Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284, 1322–1328.
- Galindo, C.L., Fadi, A.A., Sha, J., Gutierrez, Jr.C., Popov, V.L., Boldogh, I., Agarwal, B.B. and Chopra, A.K. (2004): *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin activates mitogen-activated protein kinases and induces apoptosis in murine macrophages and human epithelial cells. *J J Biol Chem*, 279(36): 37597- 377612.
- Galindo, C.L., Fadl, A.A., Sha, J., Gutierrez, C.Jr., Popov, V.L., and Boldogh, I. (2004). *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin activates mitogen- activated protein kinases and induces apoptosis in murine macrophages and human intestinal epithelial cells. *J. Biol.Chem.* 279, 37597–37612..
- Gao, P., Wang, W., Jiang, Q., Xu, Y., and Xia, W. (2016). Effect of autochthonous starter cultures on the volatile flavour compounds of Chinese traditional fermented fish (Suan yu). *International Journal of Food Science & Technology*, 51(7), 1630-1637.
- Grizzle, J.M., and Kiryu, Y. (1993). Histopathology of gill, liver, and pancreas, and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5(1), 36-50.
- Guz, L., and Kozinska, A. (2004). Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bull Vet Inst Pulawy*, 48, 391-395

- Halliwell, W.H. (1981): Serum chemistry profiles in health and disease of birds of Hamed, S. B., Ranzani-Paiva, M. J. T., Tachibana, L., de Carla Dias, D., Ishikawa, C. M., and Esteban, M. A. (2018). Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 80, 550-562.
- Hamed, S.B., Ranzani-Paiva, M.J.T., Tachibana, L., de Carla Dias, D., Ishikawa, C.M., and Esteban, M.A. (2018). Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 80, 550-562.
- Hamouda, A.H., Moustafa, E.M., and Zayed, M.M. (2019). Overview on the most prevailing bacterial diseases infecting *Oreochromis niloticus* at Aswan fish hatchery, Egypt. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 7(11), 950-961.
- Haney, D.C., Hursh, D.A., Mix, M.C., and Winton, J.R. (1992). Physiological and hematological changes in chum salmon artificially infected with erythrocytic necrosis virus. *Journal of Aquatic Animal Health*, 4(1), 48-57.
- Hanson, L., Dishon, A., and Kotler, M. (2011). Herpesviruses that infect fish. *Viruses*, 3(11), 2160-2191.
- Harikrishnan R., Kim M.C., Kim J.S., Balasundaram C. and Heo M.S. (2011) Protective effect of herbal and probiotics enriched diet on haematological and immunity status of *Oplegnathus fasciatus* (Temminck and Schlegel) against *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology* 30(3), 886-893.
- Hassan, A., Noureldin, E.A., Mahmoud, M. & Fita, N.A. (2017). Molecular identification and epizootiology of *Aeromonas veronii* infection among farmed *Oreochromis niloticus* in Eastern Province, KSA. *Egyptian J. Aqu. Res.*, 43: 161-167. doi.org/10.1016/j.ejar.2017.06.001
- Hirono, I., and Aoki, T. (1991). Nucleotide sequence and expression of an extracellular hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* 11,189–197. doi:10.1016/0882-4010(91)90049-G.
- Hossain, M.J., Waldbieser, G.C., Sun, D.W., Capps, N.K., Hemstreet, W.B., Carlisle, K. (2013). Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish. *PLoS ONE* 8:e80943. doi:10.1371/journal.pone.0080943.
- Hrubec TC, Smith SA, & Robertson JL (2001) Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Vet Clin Pathol* 30(1):8–15.
- Hu, M., Wang, N., Pan, Z.H., Lu, C.P., and Liu, Y.J. (2012). Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 224–233.
- Huang, L., Qin, Y., Yan, Q., Lin, G., Huang, L., and Huang, B. (2015). Min D plays an important role in *Aeromonas hydrophila* adherence to *Anguilla japonica* mucus. *Gene* 565, 275–281.
- Huizinga, H.W., Esch, G.W., and Hazen, T.C. (1979). Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede). *Journal of fish diseases*, 2(4), 263-277.
- Hung, D., Nguyen, N.H., Ponzoni, R.W., Hurwood, D.A., and Mather, P.B. (2013) Quantitative genetic parameter estimates for body and carcass traits in a cultured stock of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Selected for harvest weight in Vietnam. *Aquaculture*, 404, 122–129.

- Ibrahim, H.A., Eleiwa, N.Z., Galal, A.A., El-Ekiaby, W., and Abd El Rahman, E.S. (2020). Antibacterial Activity of Doxycycline against *Aeromonas hydrophila* in Experimentally Challenged African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Zagazig Veterinary Journal*, 48(1), 46-56.
- Iqbal, K.J., Ashraf, M., Javid, A., Khan, N., Abbas, F., Hafeez-ur-Rehman, M., and Altaf, M. (2016). Effect of different plant and animal origin (fishmeal) feeds on digestive enzyme activity and haematology of juvenile *Labeo rohita*. *Pakistan J. Zool*, 48(1), 201-207.
- Iqbal, M.J., Ali, S.S., and Shakoori, A.R. (1997). Toxicity of lead in freshwater fish, *Cirrhina mrigala*: haematological changes. *Journal of Ecotoxicology & Environmental Monitoring* 7(2), 139-143.
- Jana, P., Karmakar, S., Roy, U., Paul, M. and Bera, A.K.S. (2018) Phytobiotics in aquaculture health management: A review. *J. Entomol. Zool. Stud.*, 6(4): 1422-1429. 67.
- Janda, J.M., and Abbott, S.L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 35-73.
- Janda, J.M., and Duffey, P.S. (1988). Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Rev. Infect. Dis.* 10:980-997.
- Janda, J.M., Oshiro, L.S., Abbott, S.L. and Duffey, P.S. (1987). Virulence markers of mesophilic aeromonads: association of the autoagglutination phenomenon with mouse pathogenicity and the presence of a peripheral cell-associated layer. *Infect. Immun.* 55:3070-3077.
- Jayavignesh, V., Sendesh Kannan, K. and Bhat, A.D. (2011). Biochemical characterization and cytotoxicity of the *Aeromonas Hydrophila* isolated from Catfish. *Arch. Appl. Sci. Res.* 3 (3):8593.
- Ji, Y., Li, J., Qin, Z., Li, A., Gu, Z., and Liu, X. (2015). Contribution of nuclease to the pathogenesis of *Aeromonas hydrophila*. *Virulence* 6, 515–522.
- Jumma, Q.S., Shihab, T.J., and MahmoodHamad al-shammari, S. (2022). Some Hematological and Biochemical Parameter Accompanying with *Aeromonas Hydrophila* Infection Diagnosed Genetically *Incyprinus Carpio*. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 26(01), 3203-3210.
- Karvonen, A., Rintamäki, P., Jokela, J., and Valtonen, E.T. (2010). Increasing water temperature and disease risks in aquatic systems: climate change increases the risk of some, but not all, diseases. *International journal for parasitology*, 40(13), 1483-1488.
- Kathleen, M.M., Samuel, L., Felecia, C., Reagan, E.T., Kasing, A., Lesley, M. and Toh, S.C. (2016) Antibiotic resistance of diverse bacteria from aquaculture in Borneo. *Int. J. Microbiol.*, 2016: 2164761.
- Khajanchi, B.K., Kozlova, E.V., Sha, J., Popov, V.L., and Chopra, A.K. (2012). The two-component QseBC signaling system regulates in-vitro and in-vivo virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology* 158, 259–271.
- Kim, J.H., Hwang, S.Y., Son, J.S., Han, J.E., Jun, J.W., Shin, S.P., Choresca, C.Jr., Choi, Y.J., Park, Y. and P. ark, S.C. (2011): Molecular characterization of tetracycline- and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. *J Vet Sci*, 12(1): 41–48.
- Kingombe, CI, Aoust, JYD., Huys, G., Hofmann, L., Rao, M. and Kwan, J. (2010) Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes. *Appl Environ Microbiol* 76:425–433.

- Kokka, R.I., Vedros, pi. A. and Janda, J.M. (1992). Immunochemical analysis and possible biological role of an *Aeromonas hydrophila* surface array protein in septicemia. *J. <Zen, Microbid.* 138, 1229-1236.
- Kokka, R.P., and Janda, J.M. (1990). Isolation and identification of autoagglutinating serogroup O: 11 *Aeromonas* strains in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 28(6), 1297-1299
- Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178(4535), 703-703.
- Kozlova, E.V., Khajanchi, B.K., Popov, V.L., Wen, J. and Chopra, A.K. (2012). Impact of QseBC system in c-di-GMP-dependent quorum sensing regulatory network in a clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. *Microbial pathogenesis*, 53(3-4), 115-124
- Kumar, K., Prasad, K.P., Tripathi, G., Raman, R.P., Kumar, S., Tembhurne, M. and Purushothaman, C.S. (2015). Isolation, identification, and pathogenicity of a virulent *Aeromonas jandaei* associated with mortality of farmed *Pangasianodon hypophthalmus*, in India. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 67
- Kumar, S., Raman, R.P., Prasad, K.P., Srivastava, P.P., Kumar, S. and Rajendran, K.V. (2017). Modulation of innate immune responses and induction of oxidative stress biomarkers in *Pangasianodon hypophthalmus* following an experimental infection with dactylogyrid monogeneans. *Fish and shellfish immunology*, 63, 334-343. [1067](#)
- Kumar, S., Sahu, N.P., Shamna, N. and Ranjan, A. (2018). Feeding higher level of de-oiled rice bran causes stress to *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 484, 184-190.
- Laith, A.R., and Najiah, M. (2014). *Aeromonas hydrophila*: antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5(2)
- Leung, T.L.F. and Bates, A.E. (2013). More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security. *Journal of Applied Ecology*, 50, 215-222.
- Li, F., Wu, D and Gu, H.R. (2019). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* cause motile *Aeromonas* septicemia in the cultured Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Aqu. Res.*, 1-12
- Li, J., Ni, X.D., Liu, Y.J., and Lu, C.P. (2011). Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3), 823-830.
- Liu, J., Gao, S., Dong, Y., Lu, C. and Liu, Y. (2020) Isolation and characterization of bacteriophages against virulent *Aeromonas hydrophila*. *BMC Microbiol.*, 20(1): 1-13.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E., and Williams, P. (2002). The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental microbiology*, 4(1), 18-28
- Magnadottir, B., Gísladóttir, B., Audunsdóttir, S.S., and Bragason, B.T. (2015) Humeral response in early stages of infection of cod (*Cadusmorhua*) with a typical furunculosis. *Icel. Agric. Sci.* 23:235

- Mailafia, S. (2021). Phenotypic Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolates in Fresh Water Fishes in FCT Using Microbact TM GNB 24E Identification Kit. *Open Access Library Journal*, 8(01), 1.
- Maqsood, S., Samoon M.H., & Singh P. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* (2009); 9: 111-120.
- Martin-Carnahan, A., and Joseph, S.W. (2005). *Aeromonadales* ord. nov. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 556-587). Springer, Boston, MA.
- Martínez, M.J., Simon-Pujol, D., Congregado, F., Merino, S., Rubires, X and Tomás, J.M. (1995). The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes O: 11 and O: 34. *FEMS microbiology letters*, 128(1), 69-73
- Martinez-Murcia, A.J., Monera, A., Saavedra, M.J., Oncina, R., Lopez-Alvarez, M., Lara, E., and Figueras, M.J. (2011). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Systematic and applied microbiology*, 34(3), 189-199
- Max Aravena-Román; Timothy J.J. Inglis; Barbara Henderson; Thomas V. Riley and Barbara J. Chang (2011). Antimicrobial Susceptibilities of *Aeromonas* Strains Isolated from Clinical and Environmental Sources to 26 Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(2): 1110–1112.
- McFeters, G.A. and Singh, A. (1991): Effects of aquatic environmental stress on enteric bacterial pathogens. *Soc. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.*, 70, 115-120.
- Mensingher, A.F., Walsh, P.J. and Hanlon, R.T. (2005). Blood biochemistry of the oyster toadfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17(2), 170-176.
- Merino, S., Aguilar, A., Rubires, X., Abitiu, N., Regué, M., and Tomás, J.M. (1997). The role of the capsular polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* serogroup O: 34 in the adherence to and invasion of fish cell lines. *Research in microbiology*, 148(7), 625-631.
- Michel, G.P.F. and Starka, G. (1986): Effects of heat and ethanol stress on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.*, 165, 1040-1042. DOI: 10.1128/jb.165.3.1040-1042.1986
- Miyazaki, T., and Kaige, N. (1986). A histopathological study on motile aeromonad disease of crucian carp. *Fish Pathology*, 21(3), 181-185.
- Mohamed, S., Nagaraj, G., Chua, F.H.C. and Wang, Y.G. (2000) The use of chemicals in aquaculture in Malaysia and Singapore. In: *Use of Chemicals in Aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996*, Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Centre. p127-140.
- Muenchen, R.A. (2012). The popularity of data analysis software. URL
- Murray, A.G. and Peeler, L.A. (2012). A review of the risk posed to Scottish mollusc aquaculture from *Bonamia*, *Marteilia* and oyster herpesvirus. *Aquaculture*, 370, 7-13.
- Musa, N., Wei, L.S., Shaharom, F. and Wee, W. (2008) Surveillance of bacteria species in diseased freshwater ornamental fish from aquarium shop. *World Appl. Sci. J.*, 3(6): 903-905.

- Muslem, E.T., Sabeeh, S.A., and abd alwahed JheeL, W. (2021). Detection of aerolysin and hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* isolates from in Al-Diwaniyah City, Iraq. *Iranian Journal of Ichthyology*, 8, 392-396.
- Mzula, A., Wambura, P.N., Mdegela, R.H., and Shirima, G.M. (2019). Current state of modern biotechnological-based *Aeromonas hydrophila* vaccines for aquaculture: a systematic review. *BioMed research international*.
- Naharro, G., Riano, J., de Castro, L., Alvarez, S., and Luengo, J.M. (2009). *Aeromonas*: Molecular Detection of Foodborne Pathogens (Liu D. Ed.). CRC Press. North Ryde, 273-289.
- Narayan, K.G., Sinha, D.K. and Singh, D.K. (2023). *Aeromonas hydrophila*. In *Veterinary Public Health & Epidemiology: Veterinary Public Health-Epidemiology-Zoonosis-One Health* (pp. 293-299). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Narayana, P.S., Varalakshmi, D., Pullaiah, T. and Rao, K.S. (2018). *Research methodology in Zoology*. Scientific Publishers.
- Nasr, M.E. (2014): Effect of Oxytetracycline and Enrofloxacin on Nile Tilapia. M.V.Sc., Thesis (Pharmacology), *Fac Vet Med. Zag Univ*.
- Nawaz, M., Sung, K., Khan, S.A., Khan, A.A. and Steele, R. (2006). Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(10): 6461-6466.
- Nicholson, P., Fathi, M.A., Fischer, A., Mohan, C., Schieck, E., Mishra, N. and Jores, J. (2017). Detection of Tilapia Lake Virus in Egyptian fish farms experiencing high mortalities in 2015.
- Nobata, S., Sato, K., Houki, S., Ito, M., Aoki, Y., Kitagawa, T. and Hyodo, S. (2022). Straightforward upriver migration to spawning sites by chum salmon *Oncorhynchus keta* homing to coastal short rivers in the Sanriku region. *Journal of Fish Biology*, 100(3), 748-757.
- Osmani, H.A., Fadel, N.G., & Ali, A.T. (2019). Biochemical and histopathological alternations in catfish *Clarias gariepinus* infected with trypanosomiasis with special reference to immunization. *Egypt. J. Comp. Pathol. Clin. Pathol.* 22(3): 164 -181.
- Pal, S., Ray, S.D., & Homechaudhuri, S. (2015). Evaluation of in vivo non-specific immunity and oxidative stress in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) infected with *Aeromonas hydrophila* as biomarker for early diagnosis. *Int J Fish Aquat Stud*, 3(1), 116-124.
- Pang, M., Jiang, J., Xie, X., Wu, Y., Dong, Y., Kwok, A.H. and Liu, Y. (2015). Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. *Scientific reports*, 5(1), 9833.
- Parvis, A., Majibur, R., Shakhawat, B., Arifur, R. and Ashfaque, H. (1996). Acid sensitivity as affected by physico-chemical stresses in *Aeromonas hydrophila*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 49(3), 95-102.
- Paula, S.J., Duffey, P.S., Abbott, S.L., Kokka, R.P., Oshiro, L.S., Janda, J.M., Shimada, T. and Sakazaki, R. (1988). Surface properties of autoagglutinating mesophilic aeromonads. *Infect. Immun.* 56:2658-2665.
- Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., and Saier Jr, M.H. (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, 149(11), 3051-3072.

- Plumb and Bowser (2010). Microbial fish disease laboratory manual. Alabama: Agricultural Experiment Station. Auburn University.
- Plumb, J.A. and Bowser, P.R. (1983). Microbial fish disease laboratory manual, Alabama: Auburn University, *Alabama Agriculture Experiment Station*, p. 95.
- Plumb, J.A., and Hanson, L.A. (2010). Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. John Wiley and Sons.
- Plumb, J.A., and Hanson, L.A. (2010). Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. John Wiley and Sons
- Quinn, M.T., and Gauss, K.A. (2004). Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of leukocyte biology*, 76(4), 760-781.
- Rahman, M., Huys, G., Rahman, M., Albert, M.J., Kühn, I. and Möllby, R. (2007). Persistence, transmission, and virulence characteristics of *Aeromonas* strains in a duckweed aquaculture-based hospital sewage water recycling plant in Bangladesh. *Applied and environmental microbiology*, 73(5), 1444-1451.
- Ramesh, D., and Souissi, S. (2018). Antibiotic resistance and virulence traits of bacterial pathogens from infected freshwater fish, *Labeo rohita*. *Microbial pathogenesis*, 116, 113-119.
- Rashid, M., Hossain, M.S. and Ali, M.F. (2013). Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from silver carp and its culture environment from Mymensingh region. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 11(452-2016-35589), 373-376.
- Rasmussen-Ivey, C.R., Hossain, M.J., Odom, S.E., Terhune, J.S., Hemstreet, W.G., Shoemaker, C.A., Zhang, D., Xu D.H., Griffin, M.J., Liu, Y.J., Figueras, M.J., Santos, S.R., Newton, J.C. and Liles, M.R. (2016). Classification of a hypervirulent *Aeromonas hydrophila* pathotype responsible for epidemic outbreaks in warm-water fishes. *Front. Microbiol.* (2016), 7, 334.
- Ray, S.N.C., and Sinha, R.C. (2014). Serum cortisol and glucose: reliable bioindicators of stress in the fish *Labeo rohita*. *International Journal of Innovative Science, Engineering and Technology*, 1(8).
- Razak, R.A., Shariff, M., Yusoff, F.M. and Ismail, I.S. (2019) Bactericidal efficacy of selected medicinal plant crude extracts and their fractions against common fish pathogens. *Sains Malays.*, 48(8): 1601-1608.
- Reed, L.J., and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*, 27(3), 493-497.
- Řehulka, J. (2002). *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology, and biochemistry. *Acta Veterinaria Brno*, 71(3), 351-360.
- Reitman, S., and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Amer. J. clin. Path.*, 28(1):56-63.
- Reshma, J.M., Amsaveni, R., Sureshkumar, M. and Vivekanandhan, G. (2015). Screening of haemolytic *Aeromonas* sp. Isolated from marine fish samples. *Int. J. Adv. Res*, 3(3), 1004-1008.
- Rivero, O., Anguita, J., Mateos, D., Paniagua, C. and Naharro, G. (1991). Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serine protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS microbiology letters*, 81(1), 1-7.

- Roberts, R.J. (2012). Fish pathology. John Wiley and Sons
- Rohani, M.F., Islam, S.M., Hossain, M.K., Ferdous, Z., Siddik, M.A., Nuruzzaman, M. and Shahjahan, M. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics improved the functionality of aquafeed: Upgrading growth, reproduction, immunity and disease resistance in fish. *Fish and shellfish immunology*, 120, 569-589.
- Rottmann, R.W., Francis-Floyd, R. and Durborow, R. (1992). The role of stress in fish disease (p. 474). Stoneville, MS: *Southern Regional Aquaculture Center*.
- Saharia, P., Pokhrel, H., Kalita, B., Hussain, I.A., and Islam, S. (2018). Histopathological changes in Indian Major Carp, *Labeo rohita* (Hamilton), experimentally infected with *Aeromonas hydrophila* associated with hemorrhagic septicemia of Central Brahmaputra valley of Assam, India. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(5), 06-11.
- Sahoo, P.K., and Mukherjee, S.C. (2019). Influence of the immunostimulant chitosan on immune response of healthy and cortisol-treated rohu (*Labeorohita*). *J. Aquac. Trop.* 14, 209–215.
- Sahu, I., Das, B.K., Marhual, N., Samanta, M., Mishra, B.K., and Eknath, A.E. (2011). Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* on Rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Indian journal of microbiology*, 51, 515-520.
- Sajid, A., and Yahya, S. (2021). Biotransformation of Pharmaceuticals by *Comamonas* and *Aeromonas* Species.
- Sanarelli, G. (1891). Ueber einen neuen mikroorganismus des Wassers, welcher fur thiere mit veraenderlicher und konstanter temperatur pathogen ist. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde*, 9, 193-228
- Sandkvist, M. (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infect. Immun.* 69, 3523–3535.
- Selvaraj, V., Sampath, K., and Sekar, V. (2009). Administration of lipopolysaccharide increases specific and non-specific immune parameters and survival in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 286(3-4), 176-183.
- Semwal, A., Kumar, A., and Kumar, N. (2023). A review on pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and their mitigation through medicinal herbs in aquaculture. *Heliyon*.
- Sha, J., Kozlova, E.V., and Chopra, A.K. (2002). Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infection and Immunity*, 70(4), 1924-1935.
- Shi, Y.H., Chen, J., Li, C.H., Lu, X.J., Zhang, D.M., Li, H.Y., and Li, M.Y. (2012). Detection of bacterial pathogens in aquaculture samples by DNA microarray analysis. *Aquaculture*, 338, 29-35.
- Shields, P., and Cathcart, L. (2011). Motility test medium protocol. American society for microbiology.
- Shotts Jr, E.B., and Rimler, R. (1973). Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Applied Microbiology*, 26(4), 550-553
- Sierra, J.C., Suarez, G., Sha, J., Baze, W.B., Foltz, S.M., and Chopra, A.K. (2010). Unraveling the mechanism of action of a new type III secretion system effector AexU from *Aeromonas hydrophila*. *Microbial pathogenesis*, 49(3), 122-134.

- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., and Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 41(1-2), 125-139.
- Skwor, T., Shinko, J., Augustyniak, A., Gee, C., and Andraso, G. (2014). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin-and tetracycline-resistant *Aeromonas* isolates from Lake Erie. *Applied and environmental microbiology*, 80(3), 841-848.
- Soto-Rodriguez, S.A., Cabanillas-Ramos, J., Alcaraz, U., Gomez-Gil, B., and Romalde, J.L. (2013). Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. *Journal of applied microbiology*, 115(3), 654-662
- Souza, C.F., Baldissera, M.D., Vaucher, R.A., Lopes, L.Q.S., and Vizzottoi, B.S. (2016). In vivo bactericidal effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil against *Aeromonas hydrophila*: Silver catfish (*Rhamdia quelen*) as an experimental model. *Microb Pathog*, 98: 82-87.
- Sreedharan,K., Rosamma,p., Isaac,S.B.S.(2012). susceptibility pattern of motile aeromonads associated with freshwater ornamental fish culture systems: a possible threat to public health, *Brazilian Journal of Microbiology* 43, 754-765
- Stratev, D. and Odeyemi, O.A. (2017) An overview of motile *Aeromonas* septicaemia management. *Aquac. Int.*, 25(3): 1095-1105.
- Stratev, D., Stoev, S., Vashin, I., and Daskalov, H. (2015). Some varieties of pathological changes in experimental infection of carps (*Cyprinus carpio*) with *Aeromonas hydrophila*. *J. Aquac. Eng. Fish. Res*, 1, 191-202. .
- Stratev, D., Zhelyazkov, G., Noundou, X.S. and Krause, R.W. (2018) Beneficial effects of medicinal plants in fish diseases. *Aquacult. Int.*, 26(1): 289-308.
- Sudheesh, P. S., Al-Ghabshi, A., Al-Mazrooei, N., and Al-Habsi, S. (2012). Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish. *International journal of evolutionary biology*, 2012.
- Swann, L., and White, M.R. (1991). Diagnosis and treatment of” *Aeromonas Hydrophila*” infection of fish. Aquaculture Extension, Illinois-Indiana Sea Grant Program.
- Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L., Winson, M.K., Chhabra, S.R., and Stewart, G. (1997). Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Journal of bacteriology*, 179(17), 5271-5281.
- Syahidah, A., Saad, C.R., Daud, H.M. and Abdelhadi, Y.M. (2015) Status and potential of herbal applications in aquaculture: A review. *Iran. J. Fish. Sci.*, 14(1): 27-44.
- Tam, B., Gough, W.A., & Tsuji, L. (2011). The impact of warming on the appearance of furunculosis in fish of the James Bay region, Quebec, Canada. *Regional Environmental Change*, 11, 123-132.
- Taylor, P. W. (2003). Multiple antimicrobial resistance in a chronic bacterial infection of koi carp. *North American journal of aquaculture*, 65(2), 120-125.

- Thampuran, N., Surendran, P.K., Mukundan, M.K., and Gopakumar, K. (1995). Bacteriological studies on fish affected by epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Kerala, India. *Asian Fisheries Science*, 8, 103-112.
- Thirumalaikumar, E., Lelin, C., Sathishkumar, R., Vimal, S., Anand, S.B., Babu, M.M., and Citarasu, T. (2021). Oral delivery of pVAX-OMP and pVAX-hly DNA vaccine using chitosan-tripolyphosphate (Cs-TPP) nanoparticles in Rohu, (*Labeo rohita*) for protection against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 115, 189-197.
- Thomas, P.C., Divya, P.R., Chandrika, V., and Paulton, M.P. (2009). Genetic characterization of *Aeromonas hydrophila* using protein profiling and RAPD PCR.22,2
- Thrall, A.M., Baker, C.D., Campbell, T.W., DeNicola, D., Martin, J.F., Lassen, E.D., Alan, R., Weiser, G. (2006). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Blackwell Publishing. pp. 21, 301-307, 355-380.
- Tille, P. (2015). *Bailey and Scott's diagnostic microbiology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Trott, D.J. (2006). *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease-By J. Glenn Songer*, KW Post
- Trumble, S.J., Castellini, M.A., Mau, T.L., and Castellini, J.M. (2006): Dietary and Uysal, S., Cuello, L. G., Cortes, D. M., Koide, S., Kossiakov, A. A., and Perozo, E. (2011). Mechanism of activation gating in the full-length KcsA K⁺ channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(29), 11896-11899.
- Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., and Liu, C.H. (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish and shellfish* .
- Tseng, D.Y., Ho, P.L., Huang, S.Y., Cheng, S.C., Shiu, Y.L., Chiu, C.S., and Liu, C.H. (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish & shellfish immunology*, 26(2), 339-344.
- Val, A.L., De Menezes, G.C., & Wood, C.M. (1998). Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts. *Journal of Fish Biology*, 52(1), 83-93. doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01554.x
- Vazquez-Juarez, R.C., Borrera-Saldana, H.A., Hernandez Saavedra, N.Y., Gomez-Caiarri, M., and Ascencio, F. (2003): Molecular cloning, sequencing and characterization of omp48, the gene encoding for antigenic outer membrane protein from *Aeromonas veronii*. *J Appl Microbiol*, 94(5): 908-918
- Vilches, S., Jimenez, N., Tomás, J.M., and Merino, S. (2009). *Aeromonas hydrophila* AH-3 type III secretion system expression and regulatory network. *Applied and environmental microbiology*, 75(19), 6382-6392
- Vilches, S., Cecilia Urgell, Susana Merino, Matilde, R. Chacón, Lara Soler, Graciela Castro-Escarpulli, Maria Jose Figueras, Juan, M. Tomás (2004). *Applied and environmental microbiology* 70 (11), 6914-6919
- Vinarukwong, N., Lukkana, M., Berntsen, J.O. and Wongtavatchai, J. (2018) Therapeutic use of sulfadimethoxine-ormetoprim for control of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. *Thai J. Vet. Med.*, 48(3): 367-373.

- Vincent, A.T., Fernández-Bravo, A., Sanchis, M., Mayayo, E., Figueras, M.J., and Charette, S.J. (2019) Investigation of the virulence and genomics of *Aeromonas salmonicida* strains isolated from human patients. *Infect. Genet. Evol.* 68, 1–9.
- Wadström, T., Ljungh, Å., and Wretling, B. (1976). Enterotoxin, haemolysin and cytotoxic protein in *Aeromonas hydrophila* from human infections. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, 84(2), 112-114.
- Wang, G., Clifford G Clark, Chenyi Liu, Chad Pucknell, Cindy K Munro, Tamara MAC Kruk, Richard Caldeira, David L Woodward, Frank G Rodgers, (2003) Detection and Characterization of the Hemolysin Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR *Journal of clinical microbiology* 41 (3), 1048-1054
- Washington, R.R. (2006). Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Applied and environmental microbiology*, 72(10), 6461-6466
- Wells, R.M., McIntyre, R.H., Morgan, A.K., and Davie, P.S. (1986): Physiological stress responses in big gamefish after capture: observations on plasmachemistry and blood factors. *Comp. Biochem. Physiol.* 84(3): 565-571..
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
- Wiegertjes, G.F., Stet, R.J.M., Parmentier, H.K., Van approach. *Dev. Comp. Immunol.*; 20:365–381.
- Woertz, E. (2017). Agriculture and Development in the Wake of the Arab Spring. In *Combining Economic and Political Development* (pp. 144-169).
- Wong, C.YF Michael W Heuzenroeder, Robert LP Flower (1998) Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model *Microbiology* 144 (2), 291-298
- Xu, L., Wang, H., Yang, X., and Lu, L. (2013): Integrated pharmacokinetics/pharmacodynamics parameters-based dosing guidelines of enrofloxacin in grass carp *Ctenopharyngodon idella* to minimize selection of drug resistance. *BMC Vet Res*, 9:126
- Yang, J.L., and Chen, H.C. Effects of gallium on common carp (*Cyprinus carpio*): acute test, serum biochemistry and erythrocyte morphology. *Chemosphere*. (2013); 53: 877-882.
- Yang, X.K., and Chen, Y.B. (2013). The effects of Natucin C-Natucin P mixture on blood biochemical parameters, antioxidant activity and non-specific immune responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 55, 367-373.
- Yang, Y., Fu, Q., Wang, X., Liu, Y., Zeng, Q., Li, Y., and Liu, Z. (2018). Comparative transcriptome analysis of the swimbladder reveals expression signatures in response to low oxygen stress in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Physiological genomics*, 50(8), 636-647.
- Yardimci, B., and Aydın, Y. (2011). Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 58(1), 47-54
- Yu, H.B., Rao, P.S., Lee, H.C., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J.M., & Leung, K.Y. (2004). A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infection and immunity*, 72(3), 1248-1256.

Zhang, D., Cui, Y., Zhou, H., Jin, C., Yu, X., Xu, Y. and Zhang, C. (2020). Microplastic pollution in water, sediment, and fish from artificial reefs around the Ma'an Archipelago, Shengsi, China. *Science of the Total Environment*, 703, 134768.



EKLER

Dear Dr. H. Kaan MÜŞTAK

Greetings,,,,,

I am as a researcher and the head of the Animal and Fish research Center / Agriculture Research Directorate / Ministry of Science and Technology, hold and approve that the master thesis entitled "A study on the pathological and preventive investigation of experimental infection of *Aeromonas hydrophila* bacteria that causes septicemia in mirror carp (*Cyprinus Carpio* L.) in Iraq" for the student Dhamyaa Fadhil Abbas will be done according to the ethics and guideline of the National Committee for Research Ethics in Science and Technology (NENT) shown in the following link:

<https://www.forskningsetikk.no/en/guidelines/science-and-technology/ethical-guidelines-for-the-use-of-animals-in-research/>



**Dr. Luay Muhammad Abbass
Chief Scientific Researcher
Dean of the Fish and Animal
Research Center**