

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI (VETERİNER) ANA BİLİM DALI



**SAMSUN İLİNDE AKVARYUM BALIKLARINDA
MİKROBAKTERİYEL TÜRLEİN DAĞILIMLARININ
BELİRLENMESİ**

Doktora Tezi

İlker HANCI

Danışman

Prof. Dr. Ertan Emek ONUK

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.21.027 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☒ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☐

31/10/2023
İlker HANCI

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : SAMSUN İLİNDE AKVARYUM BALIKLARINDA MİKROBAKTERİYEL TÜRLEİN DAĞILIMLARININ BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 31.10.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : %14

Tek kaynak oranı : %3 çıkmıştır.

31 /10 / 2023
Prof. Dr. Ertan Emek ONUK

ÖZET

SAMSUN İLİNDE AKVARYUM BALIKLARINDA MİKOBAKTERİYEL TÜRLERİN DAĞILIMLARININ BELİRLENMESİ

İlker HANCI

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Su Ürünleri Hastalıkları (Veteriner) Ana Bilim Dalı

Doktora, Aralık/2023

Danışman: Unvanı Prof. Dr. Ertan Emek ONUK

Balık Tüberkülozu hem tatlı hem de tuzlu sularda yaşayan balıklarda görülebilen *Mycobacteriaceae* familyasına bağlı non-tüberküloz mikobakteriler (NTM) olarak adlandırılan bakteri türleri tarafından oluşturulan, genellikle kronik, granümatöz, sporadik ve zoonotik potansiyele sahip progresif bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı Samsun ilinde akvaryum balığı satan işletmelerdeki akvaryum balıklarında mikobakteriyel türlerin varlığının ortaya konulmasıdır. Bu amaçla Samsun ilinde 36 farklı türde toplam 151 adet akvaryum balığı Ocak 2022-Ekim 2022 tarihleri arasında toplandı. Balıkların iç organlarından alınan örnekler öncelikli olarak dekontaminasyon işlemine maruz bırakıldı ve sonrasında hazırlanan yayma preparatlarda Erlich Ziehl-Neelsen (EZN) boyama ile aside dirençli basillerin (ADB) varlığı ortaya konuldu. Kültür için dekontaminasyon işlemi uygulanan örneklerden Löwenstein-Jensen besiyerlerine ekim yapıldı. Elde edilen izolatların moleküler identifikasyonu *hsp65* (heat shock protein- ısı şok proteini) gen bölgesinin dizi analizi yapılarak gerçekleştirildi. EZN boyama sonucunda balık örneklerinin 28'inde (%18,54) ADB'ler saptandı. Kültür sonrası ise 43 balıktan (%28,47) toplamda 50 mikobakteri izolatu elde edildi. Dizi analizleri sonucunda her bir izolata ait elde edilen diziler GenBank'a daha önceden kaydedilen diğer mikobakteri türlerine ait *hsp65* gen bölgeleri dizileri ile karşılaştırıldı ve elde edilen diziler GenBank veri tabanına kayıt edildi. Bu analizler sonucu 50 izolattın 24'ü *Mycobacterium* sp. (%48), 16'sı *Mycobacteroides chelonae* (%32), 8'i *Mycobacterium gordonae* (%16), ve 2'si *Mycobacteroides abscessus* (%4) olarak identifiye edildi. Bu çalışmada identifiye edilen türler hem akvaryum balıklarında hemde insanlarda enfeksiyona neden olabilmektedir. Bu nedenle akvaryum balıklarının insanlar için potansiyel bir mikobakteri kaynağı olabileceği yetiştiriciler ve sağlık uzmanları tarafından göz ardı edilmemelidir.

Anahtar Sözcükler: Akvaryum balığı, Aside dirençli basil, Balık mikobakteriyozisi, *hsp65* geni, Non-tüberküloz mikobakteriler

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE DISTRIBUTION OF MYCOBACTERIAL SPECIES IN AQUARIUM FISH IN SAMSUN PROVINCE

İlker HANCI

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Aquatic Animal Diseases, Faculty of Veterinary Medicine

Ph.D., December/2023

Supervisor: Prof. Dr. Ertan Emek ONUK

Fish tuberculosis is a progressive disease caused by bacterial species called non-tuberculous mycobacteria (NTM) belonging to the *Mycobacteriaceae* family, occurs in both freshwater and saltwater fish, and is generally chronic, granulomatous, sporadic, and has zoonotic potential. The aim of the present study was to reveal the presence of mycobacterial species in aquarium fish in the pet shops in Samsun province. For this purpose, a total of 151 aquarium fish belonging to 36 different species in Samsun province, were collected between January 2022 and October 2022. Tissue samples taken from the internal organs of the fish were first subjected to decontamination process, and then the presence of acid fast bacille (AFB) was revealed by Erlich Ziehl-Neelsen (EZN) staining in the prepared smears. Decontaminated homogenates were inoculated into Lowenstein-Jensen medium for microbiological culture. Molecular identification of the obtained isolates was carried out by sequence analysis of the *hsp65* (heat shock protein) gene region. With EZN staining, AFB were detected in 28 (18.54%) of the fish samples. After culture, a total of 50 mycobacterial isolates were obtained from 43 fish (28.47%). The sequences obtained from each isolate were compared with the *hsp65* gene region sequences of the other mycobacteria species previously deposited in GenBank, and the obtained sequences were deposited in the GenBank database. As a result of these analyses, 24 of 50 isolates were identified as *Mycobacterium* sp. (48%), 16 isolates were identified as *Mycobacteroides chelonae* (32%), 8 isolates were identified as *Mycobacterium gordonae* (16%), and 2 isolates were identified as *Mycobacteroides abscessus* (4%). The species identified in this study can cause infection in both aquarium fish and humans. Therefore, it should be taken into consideration by breeders, hobbyists, and health professionals that aquarium fish may be a potential source of mycobacteria for humans.

Keywords: Aquarium fish, Acid fast bacilli, Fish mycobacteriosis, *hsp65* gene, Non-tuberculous mycobacteria

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, tez konusunun seçilmesinde ve çalışmaların yürütülmesinde büyük katkısını gördüğüm tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ertan Emek ONUK'a, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ, Doç. Dr. Banu YARDIMCI ve Araş. Gör. Esra DEMİRBAŞ'a, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Balık Hastalıkları Laboratuvar sorumlusu Dr. Yüksel DURMAZ'a destekleri için teşekkür ederim.

İlker HANCI

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Taksonomi	4
2.2. Mikobakteriyel Türlerin İzolasyonu	8
2.2.1. Katı Besiyerleri	8
2.2.2. Sıvı Besiyerleri	9
2.3. Mikobakteriyel Türlerin İdentifikasyonu	10
2.3.1. Fenotipik İdentifikasyon	10
2.3.2. Serolojik Teşhis	13
2.3.3. Moleküler Teşhis	13
2.4. Balıklarda Mikobakteri Enfeksiyonları	16
2.5. Korunma ve Tedavi	22
2.6. Zoonotik Önem	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Etik Bildirim	27
3.1.2. Akvaryum Balığı Örneklerinin Alınması	27
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Akvaryum Balıklarının Laboratuvar Muayenesi	29
3.2.2. Mikobakteriyel Türlerin İzolasyonu	30
3.2.3. Mikobakteriyel Türlerin İdentifikasyonu	31
4. BULGULAR	33
4.1. Akvaryum Balıklarının Laboratuvar Muayenesi	33
4.2. Mikobakteriyel Türlerin İzolasyonu	33
4.2.1. Mikobakteriyel Türlerin İdentifikasyonu	35
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ	45
KAYNAKLAR	46
ETİK KURUL KARARI	58
ÖZ GEÇMİŞ	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADB	: Aside dirençli basil
ANI	: Ortalama nükleotid benzerlik
bp	: baz çifti
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
EZN	: Erlich Ziehl-Neelsen
LJ	: Löwenstein Jensen besiyeri
MTC	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> kompleks
µm	: Mikrometre
NTM	: Non-tüberküloz mikobakteriler
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik asit
WGS	: Tüm genom sekansı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Gram-pozitif, Mikobakteri ve Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı yapılarındaki farklılıklar.....	4
Şekil 2.2. Mikobakteriyel türlerin ana grupları arasındaki genel ilişkileri gösteren özet diyagram.....	7
Şekil 2.3 Levrek balıklarında (<i>D. labrax</i>) <i>Mycobacterium pseudoshottsii</i> enfeksiyonu.	17
Şekil 2.4 <i>M. marinum</i> ile enfekte bir levrekte dalak büyümesi ve tüberkül oluşumu.....	17
Şekil 2.5 <i>M. marinum</i> ATCC 927 ile enfekte edilmiş Japon balıklarında histopatolojik görünüm.....	18
Şekil 2.6 İnsanlarda <i>M. marinum</i> kaynaklı bazı klinik olgular.	26
Şekil 3 1. Örnekleme yapılan bazı balık türlerine ait görseller.....	27
Şekil 3.2. Örnekleme yapılan akvaryum balıklarının tür dağılımları.....	29
Şekil 3.3. Löwenstein-Jensen slantları.....	30
Şekil 4.1. Balıklarda görülen bazı makroskobik bulgular.....	33
Şekil 4.2 LJ besiyerinde çeşitli karakterdeki mikobakteri kolonileri.....	34
Şekil 4.3. LJ besiyerinde mikobakteri kolonileri.	34
Şekil 4.4. EZN boyamada ADB'lerin görünümü.....	35
Şekil 4.5. İzolatların <i>hsp65</i> gen bölgesinin (439 bp) PCR ile görüntülenmesi.	35
Şekil 4.6. Mikobakteri izolatlarının tür dağılım grafiği	36
Şekil 4.7. Filogenetik ağaç.....	39

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Türkiye akvaryum balığı ithalat miktarları	1
Tablo 2.1. Runyon sınıflandırması.....	5
Tablo 2.2. Yumurta bazlı mikobakteri izolasyon besiyerleri	8
Tablo 2.3. Agar bazlı mikobakteri izolasyon besiyerleri	9
Tablo 2.4. Yaygın olarak izole edilen NTM'lerin biyokimyasal özellikleri	11
Tablo 2.5. Bazı mikobakteriyel türlerinin ayırt edici özellikleri	12
Tablo 2.6. Mikobakteri türlerinin identifikasyonu için kullanılan PCR primerleri	15
Tablo 3.1. Örnekleme yapılan akvaryum balıklarına ait bilgiler	28
Tablo 4.1. Çalışmada izole edilen mikobakteriyel türler	37



1. GİRİŞ

Akvaryum balığı yetiştiriciliği dünyada ve ülkemizde en popüler hobiler arasında yer almaktadır. Tropikal balıklar dünya genelinde kedi ve köpekten sonra evlerde beslenen en yaygın üçüncü evcil hayvan olarak bildirilmektedir (Tissera, 2010). Dünyada yaklaşık 2000 yıllık geçmişi bulunan akvaryum balığı yetiştiriciliği Türkiye’de 1960’lı yıllardan itibaren başlamış, 1980’li yıllarda ivme kazanmış ve 1989 yılında ithalatın başlamasıyla birlikte popülerite kazanmıştır. Ülkemizde iki yüz binin üzerinde akvaryum canlısı yetiştiricisi olduğu tahmin edilmekte ve bu sayı artış eğilimi göstermektedir (Türkmen ve Alpbaz, 2001; Çelik vd, 2014; Tolon ve Emiroğlu, 2014; Pala ve Yılmaz, 2020).

Dünyada her yıl 1 milyardan fazla süs balığı ticareti yapılmakta ve sektör her yıl %14 oranında gelişme göstermektedir (Whittington and Chong, 2007). 2001 yılında dünya genelinde tatlı ve tuzlu su canlı akvaryum balıkları ticaret hacmi yaklaşık 415 milyon Amerikan doları düzeyinde iken, 2011 yılında 735 milyon Amerikan doları ile en yüksek seviyesine ulaşmıştır. 2018 yılında 653 milyon Amerikan doları düzeyinde gerçekleşmiştir. 2001-2010 yılları arasındaki 10 yıllık dönemde akvaryum balıkları ticaret hacmi yıllık ortalama 562 milyon Amerikan doları düzeyinde gerçekleşmiş, 2011-2018 yılları arasındaki dönemde ise yıllık ortalama 665 milyon Amerikan doları düzeyine yükselmiştir (Tolon, 2020).

Türkiye akvaryum canlısı yetiştiriciliği sektöründe ithalatçı ülke konumundadır (Büyüktaş ve Kızak, 2018; Pala ve Yılmaz, 2020). Ülkemizde 2001-2019 yılları arasında yaklaşık 22,9 milyon Amerikan doları tutarında akvaryum balığı ithalatı yapılmışken aynı dönemde toplam 768,6 bin Amerikan doları düzeyinde ihracat gerçekleştirilmiştir (Tolon, 2020). Ülkemizde 2019-2022 yılları arasına gerçekleşen akvaryum canlıları ithalat değerleri Tablo 1.1’de verilmiştir.

Tablo 1.1. Türkiye Akvaryum balığı ithalat miktarları (bin dolar) (ITC, 2023)

	2019	2020	2021	2022
Tatlı Su Balığı	328	293	322	165
Tuzlu Su Balığı	148	78	225	177
Toplam	476	371	547	342

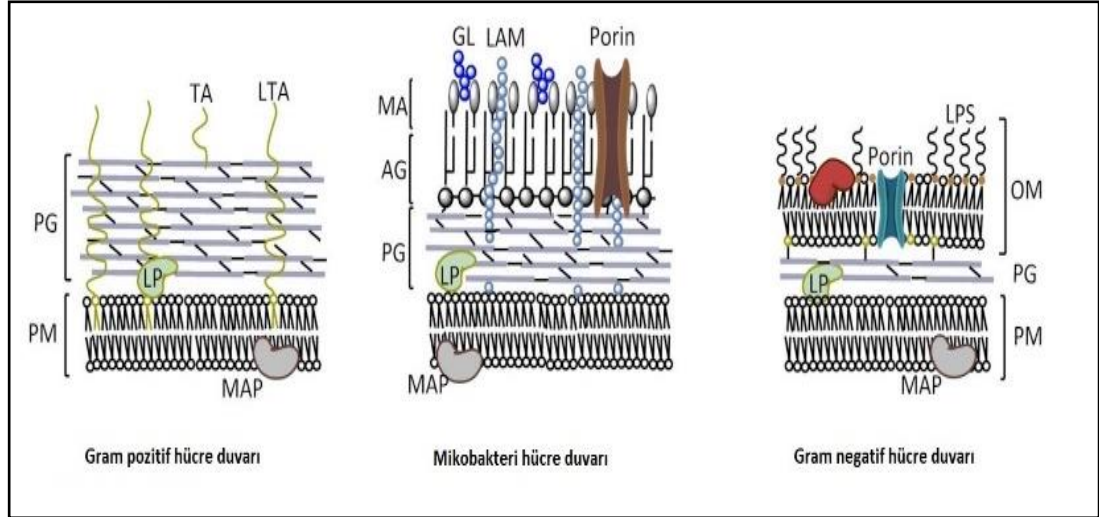
Canlı hayvanların uygun biyogüvenlik prosedürleri sağlanmadan ticaretinin ve dolaşımının yapılması yüksek ölüm oranlarına neden olan bulaşıcı hastalıklardan sorumlu bir dizi ajanın yayılmasını sağlar. Bununla birlikte akvaryum balıkları hayvanlarla ilgilenen kişileri tehlikeye atacak zoonotik özelliğe sahip bakteriyel, viral, fungal veya parazitik etiyolojiye sahip patojenik ajanlar da taşıyabilirler (Cardoso et al., 2019). İhtyozoonotik bakteriler arasında *Aeromonas*, *Clostridium*, *Edwardsiella*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Vibrio* cinsine ait bakteriler yer almaktadır (Austin and Austin, 2016; Hanci ve Onuk, 2016). Özellikle *Mycobacteriaceae* familyasına ait bakteriler zoonoz özellikleri ile ön plana çıkmakta ve akvaryum hobisi ile uğraşan kişilerde çeşitli enfeksiyonlar meydana getirebilmektedir (Yüce, 2003; Sevim, 2012).

Bu tez çalışması ile Samsun ilinde akvaryum balığı satan işletmelerdeki akvaryum balıklarında mikobakteriyel türlerin varlığı konvansiyonel mikrobiyolojik kültür yöntemleri ile ortaya konulmuş ve sonrasında elde edilen izolatların tür dağılımları moleküler bir yöntem olan PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ve sekans analizleri (*hsp65* gen bölgeleri) ile belirlenmiştir. İzolatlara ait sekans dizileri uluslararası veri tabanına (GenBank) kaydedilmiş ve Türkiye'de ilk defa akvaryum balıklarında görülen tüberküloz etkenleri için genetik veri tabanı oluşturulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

Mycobacterium tuberculosis kompleks (MTC) ve *Mycobacterium leprae* dışında kalan mikobakteri türleri non-tüberküloz mikobakteriler (NTM), çevresel mikobakteriler ya da atipik mikobakteriler olarak bilinirler. NTM'ler toprak ve suda yaşayan saprofit mikobakteriler olup fırsat buldukça insan ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olabilirler. NTM'lerin çoğu çevreden, sulardan (hem doğal hem şebeke suyu), topraktan, bitkilerden, hayvan ve kuşlardan kolayca izole edilebilirler (van Ingen et al., 2010). NTM'ler çevresel rezervuar olmayan yönleriyle MTC'den, konakçı sınırlı olması ve saprofit olarak bulunmaması yönüyle de *M. leprae*'dan ayrılırlar (Turenne, 2019).

Mikobakteriler aerobik, sporsuz, hareketsiz, hafif kıvrık, düzgün çomak veya kokoid şeklinde, 0,2-0,6 x 1-10 µm boyutlarında aside-dirençli bakterilerdir. Mikobakterilerin genel özelliği aside dirençli olması, yavaş üremeleri ve hücre duvarlarında bol miktarda lipid tabakası bulunmasıdır (Eisenstadt and Hall, 1995; Talaat et al., 1998; Yardımcı, 2006; Baş, 2011). Mikobakterilerin aside dirençli karakteri hücre duvarındaki mikolik asit, peptidoglikan ve arabinogalakthanın (mAGP) oluşturduğu tabaka ile ilişkilidir. Anilin boyası bu tabaka ile bağ oluşturarak asit ve alkol etkisine karşın yerinde kalır. Bu özelliği ortaya çıkarmada Erlich Ziehl-Neelsen (EZN) gibi aside dirençli boyama yöntemleri kullanılır. Mikobakteriler Gram boyama ile kolay boyanamamalarına rağmen Gram pozitif olarak kabul edilirler (Durupınar, 1996; Yardımcı, 2006). Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında yaklaşık %5 lipid tabakası bulunur. Bu oran Gram negatiflerde %20, mikobakterilerde ise yaklaşık %60 civarındadır. Bu lipid tabakası mikobakterinin kuru ağırlığının %40'nı oluşturur (Brennan and Goren, 1979; Iseman 2002; Chiaradia et al., 2017). Şekil 2.1'de mikobakteriler ile Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapılarında görülen farklılıklar verilmiştir.



Şekil 2.1. Gram-pozitif, Mikobakteri ve Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı yapılarındaki farklılıklar. AG; arabinogalaktan, GL; glikolipid, LAM; lipoarabinomannan, LP; lipoprotein, LPS; lipopolisakkarit, LTA; lipoteikoik asit, MA; mikolik asit, MAP; membran-ilişkili protein, OM; dış membran, PG; peptidoglikan, PM; plazma membranı, TA; teikoik asit (Arundhati et al., 2019)

2.1. Taksonomi

Mikobakteriyel organizmaların identifikasyonu 1880'li yılların başlarında *M. tuberculosis* ve *M. leprae* ile başlamıştır. İlk tanımlanan NTM'ler ise saprofit türler olan *M. smegmatis* (1889) ve *M. phlei* (1899)'dir. Kanatlı tüberküloz etkeni olan *M. avium* ise 1901 yılında tanımlanmıştır. Bunları *M. lepraemurium* (rat leprosy) ve *M. paratuberculosis* (Johne's Disease) takip etmiştir. 1950 yılından önce içerisinde *M. chelonae*, *M. marinum* ve *M. fortuitum*'un da bulunduğu az sayıda NTM türü tanımlanmıştır (Turenne, 2019).

NTM'ler için ilk fenotipik klasifikasyon sistemi Ernest Runyon'a atfedilmektedir. Ernest Runyon NTM'leri kolayca ayırtedilebilir 4 fenotipik gruba ayırmıştır (Runyon, 1959). Mikroorganizmalar Runyon sınıflandırılmasında Löwenstein Jensen (LJ) besi yerindeki üreme hızı, koloni morfolojisi ve pigment üretimine göre 4 grupta toplanmıştır (Tablo 2.1).

Grup I: Işıkla temas ettikten sonra pigmentli koloniler (sarı) meydana getirirler (Fotokromojenik). Yavaş ürerler. Kolonilerin görülebilmesi için 7 günden fazla zamana gereksinim vardır. *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. asiaticum*, *M. simiae* gibi mikobakteriler bu grup içerisinde yer alır.

Grup II: Bu grupta yer alan türlerin kolonileri daima pigmentli yapıdadır (Skotokromojenik). Sarı yada portakal renkli koloniler oluştururlar ve yavaş ürerler.

M. gordonae, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* ve *M. xenopi* gibi bakteriler bu grupta yer alırlar.

Grup III: Bu grup mikobakterilerin kolonileri pigment oluşturmaz yada zayıf özellikte pigment oluşturlar. Yavaş ürerler. *M. intracullulare*, *M. ulcerans*, *M. terrae*, *M. haemophilum* ve *M. avium kompleks*'i bu grupta yer alır.

Grup IV: Hızlı üreme gösteren mikobakterilerdir. 7 gününün altında gözle görülebilen ve değişken pigmentasyon gösteren koloniler oluşturlar. *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*, *M. mucogenicum* gibi mikobakteriler bu grupta yer alırlar (Koh, 2017).

Tablo 2.1. Runyon sınıflandırması (Koh, 2017)

Grup	Üreme hızı	Pigmentasyon	Mikobakteriyel türler
I	Yavaş	Fotokromojen	<i>M. marinum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. asiaticum</i> , <i>M. simiae</i>
II	Yavaş	Skotokromojen	<i>M. gordonae</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. xenopi</i>
III	Yavaş	Nonfotokromojenik	<i>M. intracullulare</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. avium complex</i> , <i>M. haemophilum</i>
IV	Hızlı	Değişken	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> - <i>M. abscessus</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. peregrinum</i>

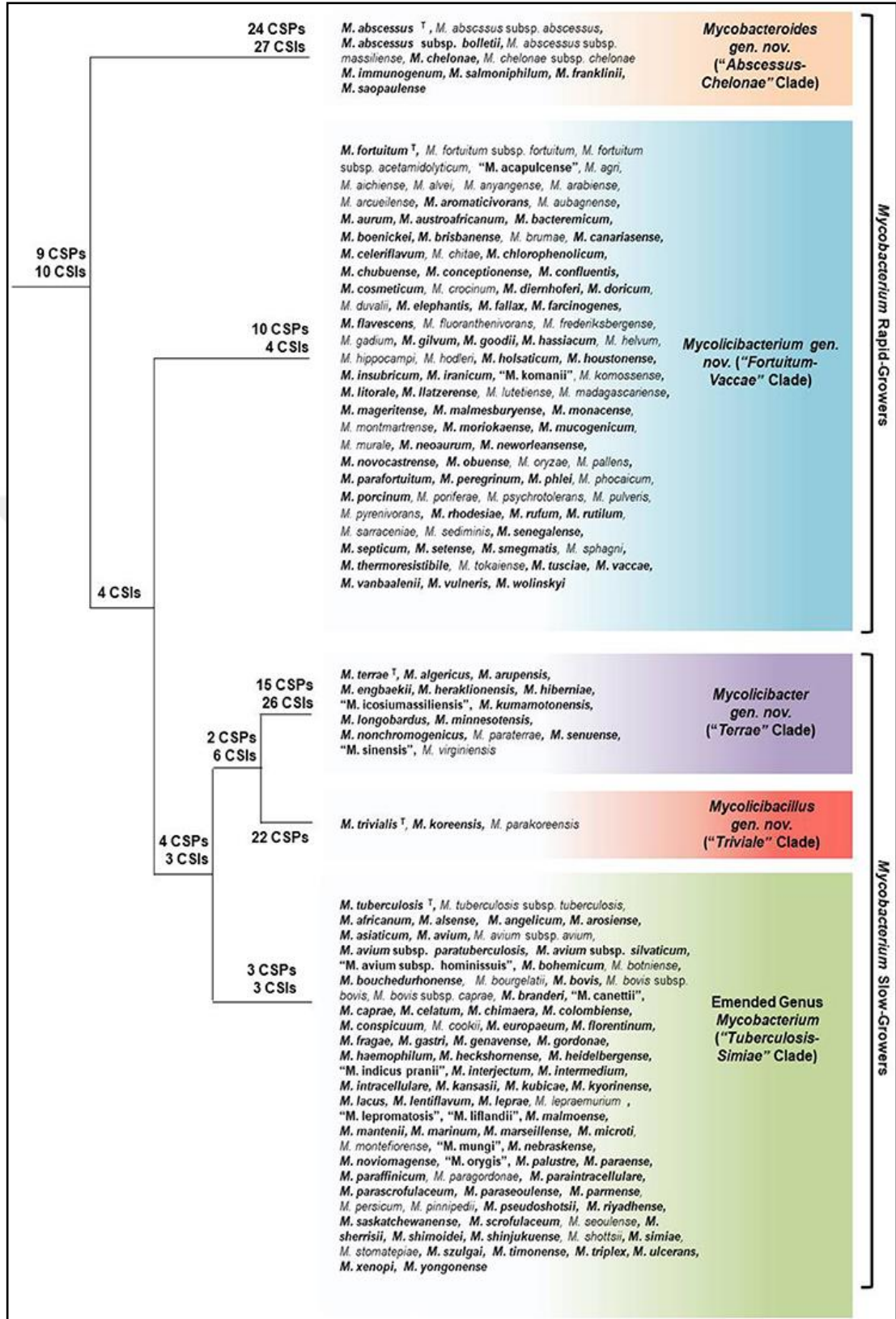
Farklı mikobakteri türlerinin karakterize edilmesinde kolonilerinin büyüme hızı ve pigmentasyonu hala yaygın olarak kullanılan fenotipik özelliklerdir. Ancak günümüzde moleküler metotlar fenotipik metotların yerini almaya başlamıştır. 16S rRNA (Ribozomal Ribonükleik asit) kodlayan gen, uzun yıllar boyunca taksonomik çalışmaların temelini oluşturmuştur. Ayrıca mikobakteriyel türler arasındaki var olan ilişki yıllar boyunca 16S ve 23S rRNA arasında yer alan bölge (intergenic transcribed spacer region, ITS) ile 65 kDa ısı şok proteini (*hsp65*), DNA (Deoksiribo nükleik asit) gyrase subunit B (*gyrB*) ve RNA (Ribo nükleik asit) polimeraz subunit (*rpoB*) gibi bazı housekeeping genlerinin kullanılması ile değerlendirilmiştir (Pereira et al., 2020).

Tüm genom sekans (Whole genome sequencing, WGS) analizinin filogenetik ilişkileri ortaya çıkarmada çok büyük katkısı olmaktadır (Fedrizzi et al., 2017; Tortoli et al., 2017). Genel olarak hızlı üreyen mikobakterilerin genom boyutu yavaş üreyenlere göre daha büyüktür. Fakat istisnalarda mevcuttur. Örneğin en büyük

genoma sahip *M. gordonae* 7,6 Mb, en küçük genoma sahip *M. triviale* 3,6 Mb genoma sahiptir ve her ikisi de yavaş üreyen mikobakteriler grubundadır (Fedrizzi et al., 2017). WGS analizlerinde ortalama nükleotid benzerlik (Average nucleotide identity, ANI) değerinin %95-96'nın, dijital DNA–DNA hibridizasyon değerinin %70'in üzerinde olması tür tanımlanmasında genel olarak kabul edilen ölçütlerdir (Chun et al., 2018). Ayrıca %95-98 arasında bir ANI değeri epidemiyolojik, fenotipik veya ilgili diğer özellikler bakımından destekleniyorsa alt tür ayrımında da kullanılmaktadır (Goris et al., 2007; Richter and Rosselló-Móra, 2009). WGS'de birtakım problemlerle karşılaşılabilir. Bu problemlerden en önemlisi veri tabanlarında yeterli verilerin bulunmaması (de Zwaan et al., 2014) ve veri tabanında yapılmış olan yanlış etiketlemedir (Tortoli et al., 2017; Tortoli, 2018).

Son dönemde karşılaştırmalı genomik tabanlı yapılan bir çalışma mikobakteri genusuna yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Bu çalışmada, Grupta vd. (2018), 150 mikobakteri genomu üzerinde kapsamlı ve karşılaştırmalı filogenomik ve genomik analizler yapmışlardır. *Mycobacterium* sp. için 1941 core (çekirdek) proteinlerine, *Actinobacteria* filumu için 136 core proteinlerine ve diğer çoğu bakteride bulunan 8 korunmuş proteine (*RpoA*, *RpoB*, *RpoC*, *GyrA*, *GyrB*, *hsp65*, *EF-Tu*, *RecA*) dayalı olarak filogenetik ağaçlar oluşturmuşlardır. Araştırma sonucunda *Mycobacterium* genusu *Tuberculosis-Simiae*, *Terrae*, *Triviale*, *Fortuitum-Vaccae* ve *Abscessus-Cheloniae* clade'i olarak en üst seviyede 5 gruba bölünmüştür. Her bir clade yeni bir genus olarak atanmış ve *Mycobacteriaceae* familyasının beş yeni genusa ayrılması önerilmiştir (Grupta et al., 2018). *Tuberculosis-Simiae* clade'i *Mycobacterium* genusunu, *Fortuitum-Vaccae* clade'i *Mycolicibacterium* genusunu, *Terrae* clade'i *Mycolicibacter* genusunu, *Triviale* clade'i *Mycolicibacillus* genusunu, *Abscessus-Cheloniae* clade'i *Mycobacteroides* genusunu oluşturmuştur (Şekil 2.2). *Mycobacterium*, *Mycolicibacter* ve *Mycolicibacillus* genusu yavaş üreyen *Mycobacterium* türlerini, *Mycobacteroides* ve *Mycolicibacterium* genusu hızlı üreyen türleri içermektedir (Grupta et al., 2018).

Mikobakteriler *Actinomycetales* takımında *Mycobacteriaceae* ailesi içerisinde yer almaktadır ve güncel olarak yaklaşık 200'e yakın mikobakteri türü valide edilmiştir (<https://www.bacterio.net/genus/mycobacterium>).



Şekil 2.2. Mikobakteriyel türlerin ana grupları arasındaki genel ilişkileri gösteren özet diyagram (Grupta et al., 2018)

2.2. Mikobakteriyel Türlerin İzolasyonu

Mikobakteriler güç üreyen (spesifik besiyerlerinde üreyebilen) ve yavaş gelişen bakterilerdir. Bu nedenle spesifik olmayan besiyerlerinde ortamda bulunan diğer bakteriler daha hızlı gelişir ve besiyerlerini işgal ederler. Mikobakteriyel türlerin izolasyonunda en sık kullanılan besiyerleri Middlebrook 7H10, LJ, Middelbrook 7H9, Petragnani agar ve Dorset egg medium'dur. Ayrıca mikobakteriler benzalkonyum klorür ve hipoklorit gibi asit ve bazik kimyasallara direnç gösterdiğinden bu kombinasyonlar besiyerlerinde mikobakterileri izole etmek için sıkça kullanılırlar (Rhodes et al., 2004; Delghandi et al., 2020). Mikobakteri izolasyonunda kullanılan besiyerleri katı ve sıvı olarak ikiye ayrılır (van Ingen, 2015; Procop et al., 2017).

2.2.1. Katı Besiyerleri

Katı özellikteki besiyerleri yumurta bazlı ve agar bazlı olarak iki şekildedir.

Yumurta Bazlı Besiyerleri

Mikobakterilerin izolasyonunda kullanılan yumurta bazlı besiyerleri ve içerikleri Tablo 2.2'de verilmiştir. LJ besiyeri birçok teşhis laboratuvarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. LJ besiyeri Petragnani besiyerine oranla mikobakterilerin gelişmesini daha az inhibe eder. Petragnani besiyeri mikobakterilerin yoğun olduğu örneklerde izolasyon için tercih edilmektedir. American Thoracic Society besiyeri ise sadece 0,02 g/100 ml malaşit yeşili ihtiva eder ve mikobakterilerin gelişimini çok az inhibe eder (Procop et al., 2017).

Tablo 2.2. Yumurta bazlı mikobakteri izolasyon besi yerleri (Procop et al., 2017)

Besi Yeri	İçerik	Engelleyici Madde
Löwenstein Jensen	Koagule bütün yumurta, tuz, gliserin, patates unu	Malaşit yeşili (4 g/100 ml)
Petragnani	Koagule bütün yumurta, yumurta sarısı, süt, gliserin, patates, patates unu	Malaşit yeşili (0,052 g/100 ml)
American Thoracic Society	Koagule taze yumurta sarısı, patates unu, gliserol	Malaşit yeşili (0,02 g/100 ml)

Agar Bazlı Besiyerleri

Mikobakterilerin izolasyonunda kullanılan agar bazlı besiyerleri ve içerikleri Tablo 2.3'de verilmiştir. Agar içeren Middlebrook besiyeri saydamdır ve genel

olarak diğer besiyerlerine kıyasla mikobakteriyel büyümenin daha erken saptanmasına izin verir. Bu durum kısmen, besiyerinin klinik örneklerde hasarlı basillerin hayatta kalmasını teşvik eden biotin ve katalaz içermesinden kaynaklanmaktadır. Albümin toksik miktarlarda oleat ve Tween 80'in spontan hidrolizinden salınabilecek diğer bileşikleri bağlamak için besiyerine dahil edilmiştir. Albümin basil tarafından metabolize edilmemektedir (Procop et al., 2017).

Günümüzde kullanılan Middlebrook kültür besiyerleri, izolasyon ve duyarlılık testi için kullanılan 7H10 ve 7H11 agar besiyerini içerir (Desmond et al., 2011). 7H11, 7H10'dan yalnızca %0,1 kazein hidrolizat (izoniazide dirençli mikobakterilerin büyüme oranını ve miktarını artıran bir katkı maddesidir) içermesiyle farklılık gösterir (Cohn et al., 1968). Hem 7H10 hem de 7H11 yumurta bazlı besiyerinde kullanılan miktarın onda biri oranında malaşit yeşili içerir, bu da kısmen yumurta bazlı besiyerine göre daha yüksek kontaminasyon insidansına neden olur. Middlebrook agar kullanımında, deneyimli mikobakteriyologlar agardaki erken mikrokolonileri inceleyerek ve bazı iyi tanımlanmış morfolojik özellikleri gözlemleyerek 10 gün içinde *M. tuberculosis* ve diğer mikobakteri gruplarının tanımlamasını yapabilirler. Mikobakteri kolonileri %5-%10 CO₂'li ortamda inkübe edildiğinde daha iyi büyüme ve koloni oluşumuna rağmen, Middlebrook ortamı uygun performans için kapneik inkübasyon gerektirir. 7H10 ve 7H11'in güçlü ışığa maruz kalması veya besiyerinin 4°C'de 4 haftadan daha uzun süre saklanması, mikobakteriler için çok inhibe edici bir kimyasal olan formaldehitin salınmasına neden olabilir (Miliner et al., 1969).

Tablo 2.3. Agar bazlı mikobakteri izolasyon besiyerleri (Procop et al., 2017)

Besi Yeri	İçerik	Engelleyici Madde
Middlebrook 7H10	Tuz, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, dekstroz	Malaşit yeşili (0,0025 g/100 ml)
Middlebrook 7H11	Tuz, vitaminler, kofaktörler, oleik asit, albumin, katalaz, gliserol, %0,1 kazein hidrolizat	Malaşit yeşili (0,01 g/100 ml)

2.2.2. Sıvı Besiyerleri

Sıvı besiyerleri mikobakteriler dışında diğer bakterilerin üremelerine de olanak sağladığından tek başına kullanımları uygun değildir. Üreme daha hızlı gerçekleşir fakat üreme hızı, koloni morfolojisi ve pigmentleşmenin değerlendirilememesi sıvı

besiyerlerinde dezavantaj oluşturur. Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri en yaygın kullanılabilen sıvı besiyeridir (van Ingen, 2015).

2.3. Mikobakteriyel Türlerin İdentifikasyonu

2.3.1. Fenotipik İdentifikasyon

NTM'ler, niasin akümülayon testi, arilsulfataz testi, nitrat indirgeme testi, katalaz testi, sitrat kullanımı testi, tellürit redüksiyon testi, %5 NaCl varlığında üreme gibi çeşitli biyokimyasal reaksiyon yöntemleriyle identifiye edilebilirler (Bhalla et al., 2018). Yaygın olarak izole edilen NTM'lerin biyokimyasal özellikleri Tablo 2.4'de, mikobakteriyel türlerin ayırımında kullanılabilecek fenotipik özellikler Tablo 2.5'de verilmiştir.

Mikobakterilerin hücre duvarı yüksek düzeyde lipit içermesinden dolayı fuksin boyasını mükemmel bir şekilde bağlama yeteneğine sahiptir ve bu boya asit alkol ile uzaklaştırılmaz. Mikobakterilerin boyanmasında yaygın şekilde kullanılan iki tür boyama yöntemi bulunmaktadır. Bunlar Florokrom boyama ve Karbolfuksin boyama yöntemleridir. Florokrom boyama yönteminde auramin O ve auramin-rodamin boyama metotları, karbolfuksin boyama yönteminde ise EZN ve Kinyoun boyama prosedürleri kullanılmaktadır (Procop et al., 2017).

Kinyoun ve EZN boyama yönteminde ADB'ler mikroskop sahasında açık mavi ya da yeşil boyalı zemin üzerinde açık kırmızı renkte basiller halinde görölmektedirler. Auramine tekniğinde ise koyu zemin üzerinde sarı turuncu renkli basiller olarak görülür (Chinabut, 1999; Procop et al., 2017). Kinyoun ve EZN boyama yöntemi teorik olarak benzer olmasına rağmen EZN boyama yöntemi özellikle hızlı üreyen mikobakterileri boyamada daha hassastır (Procop et al., 2017).

Tablo 2.4. Yaygın olarak izole edilen NTM'lerin biyokimyasal özellikleri (Bhalla et al., 2018)

Biyokimyasal Reaksiyon	Pozitif	Negatif
Niasin akümülyasyon testi	<i>M. simiae</i> , <i>M. chelonae</i>	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. fortuitum</i> ve diğer NTM'ler
Arilsülfataz testi	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. xenopi</i>	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. szulgai</i> ,
Nitrat indirgeme testi	<i>M. ulcerans</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. xenopi</i> ,
Termostabil katalaz	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. smegmatis</i>	<i>M. marinum</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i>
Yüksek katalaz*	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. gordonae</i>	-
Düşük katalaz*	<i>M. xenopi</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i>	-
Tween 80 hidrolizi	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. smegmatis</i>	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. xenopi</i>
Sitrat kullanımı	<i>M. chelonae</i> , <i>M. smegmatis</i>	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i>
Besiyerinden demir alımı	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. smegmatis</i>	<i>M. chelonae</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. abscessus</i>
Üre hidrolizi	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. scrofulaceum</i> ,	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. xenopi</i> ,
%5 NaCl'de üreme	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. smegmatis</i>	<i>M. gordonae</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. chelonae</i>
MacConkey agarda üreme (Kristal violet olmadan)	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i>	<i>M. ulcerans</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. chelonae</i>
Tellürit redüksiyon testi	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. xenopi</i> (9 gün), <i>M. scrofulaceum</i> (9 gün)	<i>M. ulcerans</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. gordonae</i> ,

* Katalaz testi 20 × 150 mm boyutunda tüpler içerisinde LJ besiyerinde yapılmaktadır. Test sonucunda görülen gaz kabarcıklarının ≥ 45 mm olması yüksek katalaz reaksiyonunu, < 45 mm olması düşük katalaz reaksiyonunu göstermektedir

Tablo 2.5. Bazı mikobakteriyel türlerinin ayırt edici özellikleri (Procop et al., 2017)

	Optimum izolasyon sıcaklığı	Pigmentasyon (ışıkta)	Pigmentasyon (karanlıkta)	Niasin	Nitrat	Tween 80 hidrolizi (10 gün)
<i>M. tuberculosis</i>	37°C (12-25 gün)	Açık kahve	Açık kahve	+	+	D
<i>M. africanum</i>	37°C (31-42gün)	Açık kahve	Açık kahve	D	D	–
<i>M. bovis</i>	37°C (24-40 gün)	Açık kahve	Açık kahve	D	–	–
<i>M. ulcerans</i>	32°C (28-60 gün)	Açık kahve	Açık kahve	–	–	–
<i>M. kansasii</i>	37°C (10-20 gün)	Sarı	Açık kahve	–	+	+
<i>M. marinum</i>	30°C (5-14 gün)	Sarı	Açık kahve	D	–	+
<i>M. simiae</i>	37°C (7-14 gün)	Sarı	Açık kahve	+	–	D
<i>M. asiaticum</i>	37°C (10-21 gün)	Sarı	Açık kahve	–	–	+
<i>M. szulgai</i>	37°C (12-25 gün)	Sarı/Turuncu	Sarı 37°C'de Açık kahve 35°C'de	–	+	D
<i>M. scrofulaceum</i>	37°C (10 gün)	Sarı	Sarı	–	–	–
<i>M. goodii</i>	37°C (10 gün)	Sarı/Turuncu	Sarı	–	–	+
<i>M. thermoresistibile</i>	45°C (7 gün)	Sarı	Sarı	–	+	+
<i>M. flavescens</i>	37°C (7-10 gün)	Sarı	Sarı	–	+	+
<i>M. xenopi</i>	42°C (14-28 gün)	Sarı	Sarı	–	–	–
<i>M. avium complex</i>	37°C (10-21 gün)	Açık kahve / Soluk sarı	Açık kahve / Soluk sarı	–	–	–
<i>M. haemophilum</i>	30°C (14-21 gün)	Gri	Gri	–	–	–
<i>M. malmoense</i>	37°C (21-28 gün)	Açık kahve	Açık kahve	–	–	+
<i>M. shimoidei</i>	37°C (14-28 gün)	Açık kahve	Açık kahve	–	–	+
<i>M. genavense</i>	37°C (14-28 gün)	Açık kahve	Açık kahve	–	–	+
<i>M. celatum</i>	37°C (14-28 gün)	Açık kahve	Açık kahve / Sarı	–	–	–
<i>M. gastii</i>	37°C (10-21 gün)	Açık kahve	Açık kahve	–	–	+
<i>M. terrae complex</i>	37°C (10-21 gün)	Açık kahve	Açık kahve	–	D	+
<i>M. triviale</i>	37°C (10-21 gün)	Açık kahve	Açık kahve	–	+	+
<i>M. fortuitum</i>	32°C (3-5 gün)	Açık kahve	Açık kahve	–	+	D
<i>M. chelonae</i>	28°C (3-5 gün)	Açık kahve	Açık kahve	D	–	D
<i>M. abscessus</i>	32°C (3-5 gün)	Açık kahve	Açık kahve	–	–	D
<i>M. smegmatis</i>	32°C (3-5 gün)	Sarı	Sarı	–	+	+

D; Değişken, +; pozitif, -; negatif

2.3.2. Serolojik Teşhis

Mikobakteri türleri histolojik ve immünohistokimyasal kesitler üzerinde immünohistokimya kullanılarak tespit edilebilirler. İmmün boyamanın EZN boyama yönteminden daha duyarlı olabileceği, özellikle küçük ve erken granülomlarda *Mycobacterium* sp.'lerin enfeksiyondan 1 veya 2 hafta sonra bu yöntem ile saptanabileceği bildirilmiştir (Sarlı et al., 2005). Ancak daha aktif lezyonlarda nonspesifik yangı infiltrasyonları da gözlenebilir. Bu durum enfeksiyonunun histolojik tanısını gölgeleyebilir (Cribier et al., 2011).

NTM'ler hızlı immunokromatografik serolojik test (Dot testi) kullanılarak da identifiye edilebilmektedir. Bu test, serumda NTM enfeksiyonlarını 1 saatten daha kısa sürede teşhis edebilen, membran bazlı hızlı bir test olan immünoelot kromatografisi prensibine dayanmaktadır (Stavri et al., 2005). Ayrıca, insanlarda ve diğer memelilerde mikobakteriyel etkenleri teşhis etmek ve tanımlamak amacıyla tüberkülin deri testi ve Vollmer path testi gibi çeşitli serolojik testler tasarlanmıştır. Bu testler, NTM kompleksi içerisinde yer alan bakteriler ile çapraz reaksiyona girebilirler (Babamahmoodi et al., 2014).

2.3.3. Moleküler Teşhis

Günümüzde mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonunda biyokimyasal testler yerine moleküler metotların tercih edildiği görülmektedir (Bayram ve Emekdaş, 2008). Mikobakteri türlerini tanımlamak için çeşitli moleküler teşhis teknikleri geliştirilmiştir (Delghandi et al., 2020).

Bakteriyel tanımlama için en sık uygulanan tekniklerden biri 16S rRNA gen dizi analizidir (Pereira et al., 2020). Mikobakterilerin bir çoğunun 16S rRNA gen bölgesinin tamamının sekans analizi ile tür düzeyinde identifiye edilebilmektedirler (Tortoli, 2010; Tortoli, 2014; Tortoli et al., 2017). *M. marinum*, *M. fortuitum* ve *M. chelonae*'nin 16S rRNA gen bölgesinin PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi kullanılarak identifiye edilmesi ilk olarak 1997 yılında yapılmıştır (Talaat et al., 1997). Birçok mikobakteri türü 16S rRNA gen bölgesinin iki hiper değişken bölge içeren ilk 500 bp'lik (baz çifti) bölgesinin belirlenmesi ile identifiye edilebilirken, klinik olarak önemli hızlı üreyen mikobakteri türlerinden olan *M. fortuitum* ve *M. abscessus*-*M. chelonae* grupları için 16S rRNA bölgesinin tamamının sekansına yada başka hedef gen bölgelerinin sekans analizinin

yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (CLSI, 2018).

16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi ile identifiye edilemeyen türlerin identifikasyonunda ikincil gen bölgesi olarak *hsp65* (Telenti et al., 1993) ve *rpoB* (Adekambi et al., 2003) gen bölgeleri yaygın bir şekilde rutin olarak kullanılmaktadır (McNabb et al., 2004; de Zwaan et al., 2014). Özellikle, hızlı üreyen mikobakteri türlerinde *hsp65* gen bölgesi sekansının kullanımı ile bu türler arasında kesin ayrımlar yapılabilmektedir (Ringuet et al., 1999). Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda hedef olarak önerilen genler ve bu genlerin amplifiye edilmesinde kullanılan primer dizileri Tablo 2.6’da özetlenmiştir (Delghandi et al., 2020).

İdentifikasyonda kullanılan bir diğer test ilmiğe dayalı izotermal amplifikasyon (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) testidir. Bu testin *M. gordonae* ile enfekte lepişteslerin (*Poecilia reticulata*) tespiti için hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Ponpornpisit et al., 2009). Yine bu test ile *mrsA* geni hedef alınmış ve *M. marinum* kompleksinin identifikasyonunda başarı ile kullanılmış ve testin yüksek bir duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir (Tsai et al., 2019). Yüksek çözünürlüklü erime analizi (high-resolution melting analysis, HRMA) balıklarda mikobakter türlerinin hızlı tanısında kullanılan diğer bir testtir (Phung et al., 2013). Salati vd. (2010), *M. marinum* suşları içeren örnekleri diğer mikobakteriyel türlerden ayırt etmede floresan rezonans enerji transferi (fluorescence resonance energy transfer, FRET) yöntemini kullanmış ve bu yöntemin balıklarda klinik belirtiler görülmeden önce *M. marinum*’un tespitine izin verdiğini göstermişlerdir (Salati et al., 2010). *M. fortuitum*, *M. chelonae* ve *M. abscessus* identifikasyonunda matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon (MALDI) kütle spektrometresi (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, ekstrakte edilmiş proteinlerin spektral profillerine dayanmaktadır. Nispeten hızlı olma ve tür düzeyinde identifikasyona izin verme avantajına sahiptir. Bu yöntem aynı zamanda filogenik analiz için de veri sağlamaktadır (Kothavade et al., 2013; Kurokawa et al., 2013).

Tablo 2.6. Mikobakteri türlerinin identifikasyonu için kullanılan PCR primerleri (Delghandi et al., 2020)

Hedef Gen	Primer	Sekans (5' - 3')
<i>dnaJ1</i>	J10F	CGIGARTGGGTYGARAARG
	J335R	ARICCCGAAIARRTCICC
<i>secA1</i>	MtuF1	GACAGYGAGTGGATGGGYCGSGTGCACCG
	MtuR3	ACCACGCCAGCTTGTAGATCTCGTGCAGCTC
32-kDa protein genes	MV1	GGCCAGTCAAGCTTCTACTCCGACTGG
	MV2	GCCGTTGCCGAGTACACCCAGACGCG
<i>hsp65</i> (heat-shock protein 65)	21M13F	ACCAACGATGGTGTG TCCAT
	21M13R	CTTGTCGAACCGCATACCCCT
	Tb11	ACCAACGATGGTGTGTCCAT
	Tb12	CTTGTCGAACCGCATACCCCT
<i>erp</i> (exported repeated protein)	erp-C1	GCTCTA GACGAGCGGTCATCGGTTGCATAGGG
	erp-C2	GCTCTAGATTAGGCGACCGGCACGGTGATTGG
	erp-C3	CGGAATTCATGGTGCTCGGGCCGCTC
	erp-C4	CGGAATTCACCCAGG CCGCGCTGGTCACC
	erp-C6	GCTCTAGATCAGGCAGGCGGCGGCACGGGTGC
	erp-C5	CGGAATTCAAACAAGCAGCATCGATAGCC
	erp-C7	GCTCTAGACTACGTGACAGGAATCAGTGATAT
	erp-8	GTGCCGAACCGACGCCGACG
	erp-9	GGCACC GGCGGCAGGTTGATCCCG
<i>rpoB</i> (RNA polymerase B subunit)	MycoF	GGCAAGGTCACCCGAAGGG
	MycoR	AGCGGCTGCTGGGTGATC ATC
	RPO5'	TCAAGGAGAAGCGATACGA
	RPO3'	GGATGTTGATCAGGGTCTGC
Rec A	recF1	GGTGGTCGNTANTGTGGTG
	recR1	AGCTGGTTGATGAAGATYGC
	recF2	GYGTCACSGCCAACCGAY
	recR2	TTGATCTTCTTCTCGATCTC
	recF3	GGCAARGGYTCGGTSATG
<i>sodA</i>	sodIgF	GAAGGAATCTCGTGGCTGAATAC
	sodIgR	AGTCGGCCTTGACGTTCTTGATAC
<i>erm</i> (Erythromycin ribosome methyltransferase gene)	ermF	GACCGGGGCCCTTCTTCGTGAT
	ermR1	GACTTCCCCGCACCGATTCC
16S-23S internal transcribed spacer	ITS-F	CCTTTCTAAGGAGCACC
	ITS-R	GATGCTCGCAACCACTATCC
16S rRNA	T ₃₉	GCGAACGGTGAGTAACACG
	T ₁₃	TGCACACAGGCCACAAGGGA
	T ₄₃	AATGGGCGCAAGCCTGATG
	T ₅₃₁	ACCGCTACACCAGGAAT

2.4. Balıklarda Mikobakteri Enfeksiyonları

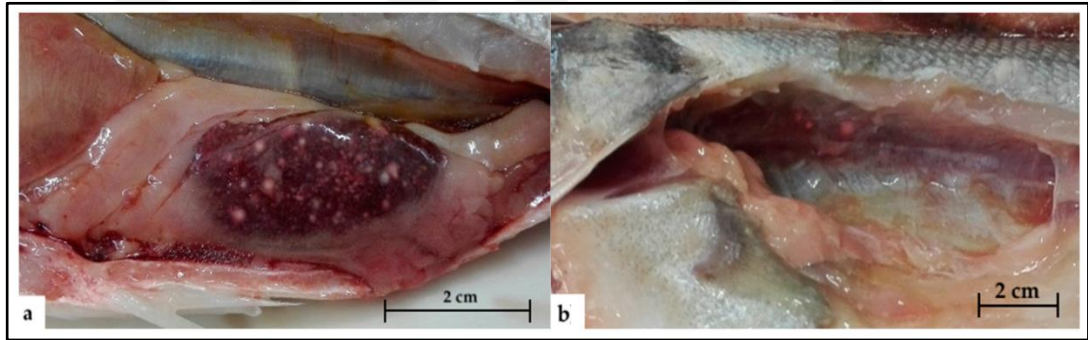
Balık tuberkülozisi (fish tuberculosis, piscine tuberculosis) dünya çapında hem tatlı hem de tuzlu sularda yaşayan balıklarda tespit edilen zoonotik potansiyeli olan bir hastalıktır. Çeşitli organ ve dokularda değişik büyüklükte tüberküllerin oluşması ile karakterize olan, kronik ve genellikle sporadik seyreden bir enfeksiyondur. Akut hastalık ise nadiren görülür. *M. marinum* 10⁷ cfu gibi yüksek dozlarda akut veya subakut hastalıklara neden olurken, daha düşük dozlarda kronik hastalıklara neden olur (Talaat et al., 1998; Gauthier and Rhodes, 2009). Mikobakteriyozis uzun süre asemptomatik olarak kalır (Toranzo et al., 2005). Hastalıkta mortalite oranı genelde düşüktür (Gauthier et al., 2003). İnkübasyon periyodu 3 hafta ile 9 ay arasında değişmektedir (Decostere et al., 2004).

Mikobakteriyozisde hem vertikal hem de horizontal bulaşma şekli tanımlanmıştır (Delghandi et al., 2020). Transovarian bulaşma viviparus balıklarda rapor edilmiştir, ancak bu vertikal bulaşma şekli ovipar balık türlerinde henüz oraya konulmamıştır (Gauthier and Rhodes, 2017; Simith et al., 2019). Bununla birlikte oral-enterik yol ile bulaşma en yaygın görülen horizontal bulaşma şeklidir. Bu yol ile bulaşmada kontamine yemlerin alınması, enfekte balıkların ve balık dokularının balıklar tarafından yenilmesi önem taşımaktadır. Bakteriyel biyofilmler bulaşmada rol oynayan diğer bir etkidir. Bu yapılar mikobakteriler ile enfekte olabilirler dolayısıyla bakteri için vektör görevi görebilirler. Ek olarak mikobakteriyozis salgınlarında Tubificid solucanların (*Tubifex tubifex*), su pirelerinin (*Daphnia* spp.) ve *M. marinum* ile enfekte sivrisinek larvalarının enfeksiyonlar ile ilişkili oldukları değerlendirilmiştir (Gauthier and Rhodes, 2009; Simith et al., 2019; Delghandi et al., 2020).

Balıklarda bakteriyel enfeksiyonlarda bakteriler sık olarak yüzgeçlerin tabanına veya deri lezyonlarına tutunurlar. Başlangıçta dış belirtiler genellikle, yüzgeçlerde erozyon ve çürümeyi içerir. Ek olarak, vücut yüzeyinde yoğun bir mukus kaplaması ve pigmentasyon değişimi, abdomende şişkinlik, pul kaybı, ülseratif dermal nekroz dahil olmak üzere genellikle, diğer hastalıklara çok benzeyen spesifik olmayan dış belirtiler bildirilmiştir. Yanal çizgide eksternal kırmızı lezyonlar ve sıg, düzensiz ülserler de bildirilmiştir. Ekzoftalmi, körlük, asites, solungaçlarda solgunluk, vertebra ve mandibula deformasyonları gibi iskelet bozuklukları, gelişme geriliği, anormal davranışlar, iştah kaybı, uyuşukluk ve bunun sonucunda şekillenen

zayıflama gözlemlenebilir (Gauthier et al., 2003; Delghandi et al., 2020).

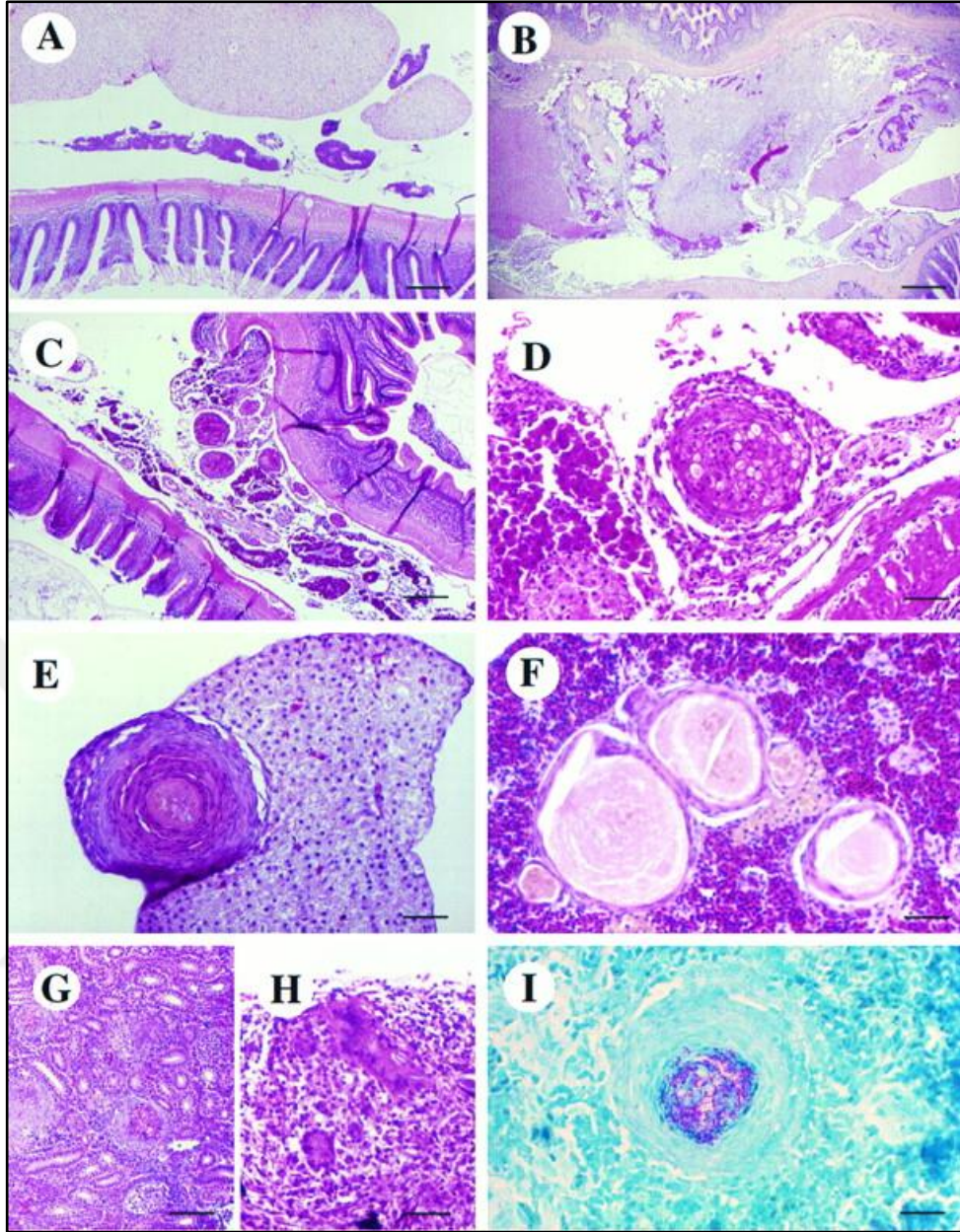
Balık nekropsisinde iç organlarda ve deride çoklu granümatöz odaklar yaygındır (Şekil 2.3 ve 2.4) (Gauthier et al., 2003; Avsever et al., 2016; Mugetti et al., 2020). Yoğun etkenle karşı karşıya kalan balıklarda iç organlarda granülomların şekillenmesi 4-8 hafta içerisinde meydana gelmektedir (van der Sar et al., 2004). Bu granülomların histopatolojisinde epitoid makrofajlar, pigmentli makrofajlar, fibroblast artışı ve ortada bakterilerin bulunduğu nekrotik bir merkezi içeren kronik yangı yanıtı görülür. Bu lezyonlarda lokalize olan bakteriler EZN gibi spesifik boyama yöntemleri ile mikroskopta mavi zemin üzerinde kırmızı renkli olarak görünürler (Noga, 2010). *M. marinum*'un patojenitesinin önde gelen özelliklerinden biri makrofajların sitozolüne ulaşması ve hareketleri için onların aktinlerini kullanabilmesidir (Stamm et al., 2003). Histopatolojik olarak çoğunlukla kazeifiye olmayan epitel hücreleri, lenfositler ve Langhan's tipi dev hücrelerinin olduğu non spesifik yangı durumu gözlenir (Hashish et al., 2018). Şekil 2.5'de *M. marinum* ile deneysel olarak enfekte edilmiş Japon balıklarında (*Carassius auratus*) gözlenen patolojik tablo verilmiştir (Talaat et al., 1998).



Şekil 2.3 Levrek balıklarında (*D. labrax*) *Mycobacterium pseudoshottsii* enfeksiyonu. a: Dalakta nodül oluşumu ve genişleme, b: böbrekte nodul oluşumu genişleme (Mugetti et al., 2020)



Şekil 2.4 *M. marinum* ile enfekte bir levrekte dalak büyümesi ve tüberkül oluşumu (Avsever et al., 2016)



Şekil 2.5 *M. marinum* ATCC 927 ile enfekte edilmiş Japon balıklarında histopatolojik görünüm. Panel I hariç tüm histopatoloji bölümleri hematoxilen ve eozin boyası ile boyanmıştır. Panel I modifiye EZN boyası ile boyanmıştır. A: Kontrol grubu balıklarının periton, karaciğer, pankreas ve bağırsağının ışık mikrofotografisi. Büyütme, $\times 64$; bar = 156 μm . B: 3 gün önce 10^9 CFU *M. marinum* ile enfekte edilmiş balığın peritonu, pankreası ve bağırsağı. Yoğun nekrotik doku, bakteriyel hücreler ve eksudat görülmektedir. Büyütme, $\times 64$; bar = 156 μm . C-I 8 hafta 10^7 CFU önce *M. marinum* ile enfekte edilmiş balıktan alınmış histopatolojik kesitler. C: Pankreas ve bağırsağın etrafında yer alan peritonda yoğun granülom oluşumu. Büyütme, $\times 64$; bar = 156 μm . D: Peritonda köpüklü makrofajlarla birlikte granülom oluşumu. Büyütme, $\times 320$; bar = 31 μm . E: Nekrotik bir merkezi çevreleyen epitelioid makrofajlardan oluşan soğan halkası granülomlu karaciğer. Büyütme, $\times 160$; bar = 63 μm . F: Dalağın büyük bir bölümünü kaplayan çoklu kazeöz granülomlar. Büyütme, $\times 320$; bar = 31 μm . G: Böbreğin gövde kısmında erken granülom oluşumu. Büyütme, $\times 160$; bar = 63 μm . H: Baş böbrekte hem Langhans hem de yabancı cisim tipi dev hücreler. Büyütme, $\times 320$; bar = 31 μm . I: Dalakta kalın duvarlı ve merkezinde aside dirençli basil bulunan granülom. Büyütme, $\times 640$; bar = 16 μm . (Talaat et al., 1998)

Mikobakteriler, sucul ekosistemlerde her yerde bulunurlar ve dünya çapında çok çeşitli balık türlerinde tanımlanmışlardır (Whipps et al., 2020). Şimdiye kadar 20 den fazla mikobakteri türünün balıklarda hastalık oluşturduğu bilinmektedir (Keller et al., 2018). Bu türler arasında *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. arupense*, *M. avium*, *M. chesapeakei*, *M. conceptionense*, *M. flavescens*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. montefiorensis*, *M. neoaurum*, *M. nonchromogenicum*, *M. parascrofulaceum*, *M. peregrinum*, *M. pseudoshottsii*, *M. salmoniphilum*, *M. saopaulense*, *M. scrofulaceum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. shottsii*, *M. simiae*, *M. terrae*, *M. szulgai*, *M. triviale*, *M. triplex* ve *M. xenopi* gibi türler yer almaktadır (Gauthier and Rhodes, 2009; Puk and Guz, 2020). Bu organizmalardan bazıları, örneğin *M. marinum* ve *M. haemophilum* balıklar için nispeten patojenik görünmektedir, diğer türler ise genellikle subklinik olarak taşınırlar. Fakat bunların patojeniteleri tam olarak bilinmemektedir (Spickler and Dvorak, 2020). *M. marinum*, *M. fortuitum* ve *M. chelonae* balıklarda mikobakteriyozis ile ilişkili olarak en çok identifiye edilen NTM türleridir (Novotny et al., 2004; Keller et al., 2018). Bu türler içerisinde *M. marinum*'un balıklar için en patojenik bakteri olduğu bildirilmektedir (Gauthier et al., 2003; Hashish et al., 2018). Mikobakteri enfeksiyonlarına neredeyse tüm tatlı su ve tuzlu su akvaryum balıkları büyük olasılıkla duyarlıdır. Bununla birlikte Anabantidae, Characidae ve Cyprinidae familyasına ait tatlı su balıklarının özellikle duyarlı olduğu bildirilmiştir (Noga, 2010).

Balıklarda ilk mikobakteriyel enfeksiyon 1897 yılında bildirilmiştir. Bu vakada sazan balıklarının (*Cyprinus carpio*) tüberküloz lezyonlarından ADB'ler izole edilmiş ve izole edilen bu basile *M. piscium* adı verilmiştir (Bataillon et al., 1902; Parisot, 1958). Bu isimle bakteri uzun bir süre Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de yer almıştır (Ingles et al., 1994). İlerleyen dönemde 1926 yılında Philadelphia akvaryumunda bulunan tropikal deniz balıklarından ilk balık patojeni olarak kabul edilen *M. marinum* izole edilmiştir (Aronson, 1926). İzole edilmiş olan bu etkenin başlangıçta yalnızca deniz balıklarını etkilediği düşünülmüş ve bu nedenle etken bu isim ile adlandırılmıştır. Fakat sonraki çalışmalarda etkenden tatlı su balıklarının da etkilendiği anlaşılmıştır (Ingles et al., 1994). İlerleyen yıllarda *M. piscium* ve *M. platypoecilus*, *M. anabanti* ve *M. balnei* gibi adlarla çeşitli mikobakteri türleri identifiye edilmiştir. Ancak söz konusu bu mikobakteri türlerinin

isimleri kullanımdan kalkmıştır. Bu türlerin *M. marinum*'un alt tipleri olabilecekleri düşünülmektedir (Aubry et al., 2017a)

M. marinum dünya çapında balıklarda ve insanlarda kutanöz enfeksiyonlara neden olan fotokromojenik akuvatik bir NTM'dir. *M. marinum* akuvatik çevrede yaygın olarak bulunmaktadır (ubiquitous) ve insanlar için patojeniktir. Etken tatlı ve tuzlu sularda bulunan 150'den fazla balık türünde, kurbağa, yılan balığı ve istiridyelerde doğal olarak hastalık oluşturur (Beecham et al., 1991; Zeeli et al., 2003).

M. marinum kaynaklı enfeksiyonlarda primer risk faktörü akuvatik çevre ve deniz hayvanlarıdır. Kurbağa, kaplumbağa gibi akuvatik vertebralılar, salyangozlar ve su pireleri rezervuar olarak görülmektedir (Hashish et al., 2018). *M. marinum* salgınları ABD'de çizgili levrek balıklarında (*Morone saxatilis*) (Gauthier et al., 2008), İtalya'da hibrit çizgili levreklerde (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) (Bozzetta et al., 2010), Çin'de Mersin balıklarında (*Acipenser sinensis* Gray, *Acipenser schrencki*) (Zhang et al., 2015), Türkiye'de levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarında (Avsever et al., 2016), İsrail'de çipura balıklarında (Davidovich et al., 2020), Hindistan'da Beta balıklarında (*Betta splendens*) (Narendrakumar et al., 2022) bildirilmiştir. Özellikle, Çin'de Mersin balıklarında miks mikobakteriyel enfeksiyonlar ekonomik olarak büyük zarar vermiş, 2009-2010 yıllarında %50'den fazla mortaliteye sebep olmuştur (Zhang et al., 2015). Zebra balıkları (*Danio rerio*) üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada da *M. marinum*'un önemli düzeyde mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada çeşitli mikobakteri türü (*M. abscessus*, *M. peregrinum*, *M. chelonae* ve *M. marinum*) balıklara 5×10^4 bakteri/balık olarak intraperitoneal yolla verilmiş ve balıklar 28°C'de 8 hafta inkubasyona tutulmuştur. Bu süre sonunda balıklar histolojik ve kültür yönünden incelenmiş ve sonuç olarak *M. marinum* izolatlarının %100 enfeksiyona neden olduğu belirlenmiş ve balıklarda %30-%100 arasında mortalite rapor edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer mikobakteri türlerinin ise ciddi bir mortaliteye neden olmadığı, fakat çeşitli iç organlarda granülomatöz lezyonlara neden olduğu görülmüştür (Watrall and Kent, 2007).

İkinci balık patojeni olan mikobakteri türü ise 1953 yılında Neon Tetra balıklarından (*Hyphessobrycon inesi*) izole edilen ve 1959 yılında identifiye edilen *M. fortuitum*'dur (Ross and Brancato, 1959; Ingles et al., 1994; Gauthier and Rhodes,

2009). *M. chelonae* ilk kez 1977 yılında Avustralya’da Chinook salmon balıklarında (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Ashburner, 1977), *M. simiae* ve *M. scrofulaceum* ilk kez 1993 yılında Lapin (*Cichlasoma bimaculatum*) ve Pasifik geyik boynuzu balığından (*Leptocottus armatus*) (Lansdell et al., 1993), 1992 yılına kadar *M. chelonae*’nin bir alt türü olarak kabul edilen *M. abscessus* balıklarda ilk kez 1997 yılında Japon Medaka (*Oryzias latipes*) balıklarından (Kusunoki and Ezaki, 1992) (Teska et al., 1997), *M. neoaurum* 1990 yılında Chinook salmon balıklarından (Backman et al., 1990), *M. avium* ilk kez 2003 yılında cüce çıklet (*Apistogramma cacatuoides*) balıklarından (Lescenko et al., 2003), *M. gordonae* ilk kez 2003 yılında gurami (*Trichogaster leeri*), melek balığı (*Pterophyllum scalare*) ve kardinal tetra balığından (*Paracheiroidon axelrodi*) (Lescenko et al., 2003), *M. montefiorensis* 2001 yılında Müren balığından (*Gymnothorax funebris*) (Herbst et al., 2001), *M. peregrinum* 2004 yılında Zebra balığından (Kent et al., 2004), *M. haemophilum* 2007 yılında Zebra balığından (Whipps et al., 2007a), *M. shottsii* ve *M. pseudoshottsii* 2003 ve 2004 yıllarında çizgili levreklerden (Rhodes et al., 2003; Rhodes et al., 2004) izole edilmiştir. *M. salmoniphilum* ise ilk olarak 1960 yılında salmonid cinsi balıklardan izole edilmiştir (Ross, 1960). Bu etkenin *M. fortuitum* ve *M. chelonae*’ye biyokimyasal olarak yüksek düzeyde benzerlik göstermesi 1980’den beri tanınan tür statüsüne girememesine neden olmuştur. Ancak son yapılan çalışmalar *M. salmoniphilum*’un geçerli ve farklı bir tür olduğunu ortaya koymuştur (Whipps et al., 2007b).

Ülkemizde kültür balıklarında ilk mikobakteri enfeksiyonu 2005 yılında Çanakkale Ege sahilinde kültür yapılan levrek balıklarında bildirilmiştir (Korun et al., 2005). Bu çalışmada enfekte levrek balıklarından alınan doku örneklerinin histopatolojik kesitlerinde EZN boyama yöntemi ile granülomlar içerisinde ADB’lerin görülmesi ile hastalığın teşhisi yapılmıştır. Ancak araştırmacılar bakteriyel etkeni izole edememişlerdir. 2010 yılında PCR-RFLP yöntemi ile akvaryum balıklarından *M. fortuitum*, *M. marinum* ve *M. chelonae*, levrek balığından ise *M. marinum* tespit edilmiştir (Baş, 2011). 2012 yılında Akdenizde *Mullus* cinsine ait balıklardan (Barbun ve Tekir) PCR ve PCR-RFLP yöntemi ile *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. aurum*, *M. vaccae* ve *M. genavense* türleri saptanmıştır (Sevim, 2012). Avsever ve ark (2014), Ege denizinde Granyöz balıklarında (*Argyrosomus regius*) reverse hibridizasyon bazlı GenoType

Mycobacterium CM kit kullanarak *M. marinum*'u tanımlamışlardır. Bir başka çalışmada yine Ege denizinde Granyöz balıklarından GenoType Mycobacterium CM/AS kit ve 16S rRNA gen sekansı ile *M. marinum* tanımlanmıştır (Timur et al., 2015). 2016 yılında reverse hibridizasyon yöntemi ile Muğla ilinde kültürü yapılan levrek ve çipura balıklarından *M. marinum* tespit edilmiştir (Avsever et al., 2016). Son olarak Urku vd. (2018), GenoType Mycobacterium CM/AS kit ve 16S rRNA gen sekans analizi ile Ege denizinde kültürü yapılan çipura balıklarından *M. frederiksbergense*'yi tespit etmişlerdir.

2.5. Korunma ve Tedavi

Mikobakteriler çevrede yaygın bulunan bakterilerdir. Hastalık salgınlarında ana faktör stres ve immun sistemin zayıflamasıdır. Bu nedenle yetiştiriciler, uygun beslenmenin yanı sıra stresi en aza indirmeli ve strese neden olacak gereksiz işlemlerden kaçınmalıdır (Delghandi et al., 2020). Hastalığın önlenmesinde hastalıktan arı olduğu bilinen popülasyonlardan balıkların alınması, yeni balıkların en az 30-45 gün karantinaya alınması ve periyodik olarak mikobakteriyel incelemelerin yapılması, balıkların optimum su kalitesi ve yetiştirme koşullarında bakımının yapılması, biyofilmleri ve organik madde birikimini azaltmak için yetiştirme birimlerinin düzenli olarak temizlenmesi ve hastalıktan etkilenen stokların imha edilmesi tavsiye edilmektedir. Bu uygulamalar mikobakterilerin kolonizasyonunu ve balıkların enfeksiyon olasılığını azaltmaya yardımcı olacaktır (Francis-Floyd, 2011; Smith et al., 2019). Mikobakteriozis enfeksiyonlarının geçmişte Salmonid cinsi balıklarda ciddi problem oluşturmasının başlıca nedeni balıkların ısıtma işlemi uygulanmamış balık organları ile beslenmeleri olduğu bildirilmiştir (Ross et al., 1959). Bu nedenle beslenmede protein kaynağı olarak kullanılan balık ve artıklarının pastörize edilmesi ya da ısıtma işleminden geçirilmesi (76°C'de 30 dk) gerekmektedir (Lewis and Chinabut, 2011; Spickler and Dvorak, 2020).

Bir salgının kontrolünde en iyi yöntem dezenfeksiyon uygulamalarıdır (Noga, 2010). Bu amaçla balık yetiştirme birimlerinin, sıhhi tesisatın ve ekipmanın kapsamlı bir şekilde temizlenmesi ve dezenfekte edilmesi gerekir (Smith et al., 2019). Sıvı dezenfektanların etkinliği sıcaklık, temas süresi, pH, dezenfektanın konsantrasyonu, askıda katı maddelerin ve organik ve inorganik bileşenlerin varlığı ile bağlantılıdır (Mainous and Smith, 2005; Smith et al., 2019). Yapılan bir çalışmada %50-70

ethanolün, 1 kısım baz, 5 kısım su, 1 kısım aktivatör veya 1 kısım baz, 18 kısım su, 1 kısım aktivatör olarak karıştırılmış sodyum klorit (Clidox-S) solüsyonunun ve %1'lik benzil-4-klorfenol-2-fenilfenol (Lysol®) solüsyonunun *M. marinum*'a yüksek düzeyde etki ettiği ve 1 dk'lık temas süresinde tüm bakterileri öldürdüğü saptanmıştır. N-alkil dimetil benzil amonyum klorür (1:256, Roccal-D Plus) solüsyonunun temas süresi 60 dk kadar uzasa bile *M. marinum*'a karşı etkili olmadığı, yine %1 Virkon-S solüsyonunun da *M. marinum*'a karşı etkisiz olduğu belirlenmiştir. Sodyum hipokloritin (Chlorox ®) ise *M. marinum*'a 50,000 mg/l konsantrasyon ve 10 dk'lık temas süresinde etki edebildiği saptanmıştır (Mainous and Smith, 2005). Ek olarak *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* ve *M. scrofulaceum* gibi bazı mikobakteri türlerinin klora karşı dirençli oldukları bildirilmiştir (Vaerewijck et al., 2005; Noga, 2010).

Balıklarda mikobakteriyozis enfeksiyonlarına karşı aşılamanın hastalığın engellenmesi ve kontrol altına alınmasında paha biçilemez bir öneme sahip olabileceği bildirilmektedir (Delghandi et al., 2020). Son yıllarda bu konuda önemli çalışmalar yapılmıştır. BCG aşısının (Bacillus Calmette ve Guerin) Japon dil balıklarında (*P. olivaceus*) ilginç şekilde birtakım immun genleri (IL-1 β , IL-6, IFN- γ TNF- α) stimüle ettiği tespit edilmiştir (Kato et al., 2010). Isı ile öldürülmüş *M. marinum* enjeksiyonu levreklerde IgM ve TNF- α sekresyonuna sebep olmuş ve balık tüberkülozunda mortalitede düşüşe neden olmuştur (Ziklo et al., 2018). Yine ısı ile öldürülmüş *M. bovis* enjeksiyonunun Zebra balıklarında çapraz koruma sağladığı rapor edilmiştir (Stinear et al., 2000). Çeşitli akuvatik mikobakteri türünden (TB40, TB267 suşları ya da *M. marinum*) elde edilen mikobakteriyel hücre dışı ürünlerin (ECP) Gökkuşaağı alabalıklarına enjeksiyonunun fagositoz, lizozim ve antikor düzeyinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (Chen et al., 1996).

Mikobakteri türlerinde fibronektin bağlayıcı proteini hedefleyen DNA aşıları tasarlanmıştır (Stinear et al., 2000; Tanghe et al., 2000). Bu aşı hibrit çizgili levreklerde *M. marinum*'a karşı 90 gün koruma sağlamıştır (Pasnik and Smith, 2005). Yine zebra balıklarına canlı zayıflatılmış *M. marinum* mutantının (L1D) uygulanması, *M. marinum*'a karşı hayatta kalma oranının artmasına (50 gün sonra %70'den fazla hayatta kalma oranı) neden olduğu belirlenmiştir (Cui et al., 2010). Yapılan bir başka çalışmada *M. fortuitum* oral aşısı dev gurami balıklarında (*Osphronemus goramy*) *M. fortuitum*'a karşı bağışıklığı, hayatta kalma oranını ve

direnci artırmada etkili olmuştur. Aşı uygulandıktan sonra 31-60. günlerde yapılan challenge denemelerinde %96 başarı oranı sağlanmıştır (Kartika et al., 2022). Bu umut verici gelişmelere rağmen, güncel olarak balıklarda mikobakteriyozis'e karşı ticari olarak mevcut hiçbir aşı bulunmamaktadır ve konu ile ilgili daha fazla araştırmaların yapılması gerekmektedir (Toranzo et al., 2009; Muktar and Tesfaye, 2016; Whipps et al., 2020).

Mikobakterilerin ilaçları yavaş bir şekilde absorbe ettiği ve enfeksiyonların tedavisi için uzun bir zamana ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir (Chang and Whipps, 2015). Dolayısıyla hastalıklı hayvanların genellikle, imha edilmesi ilk tercih olarak karşımıza çıkmaktadır (Baş, 2011). Bununla birlikte uzayan tedavi rejimleri ve mikobakterilerin zoonoz potansiyeli göz önüne alındığında, aşırı antibiyotik kullanımının antibiyotiklere karşı genetik dirence yol açabileceğine dair endişeler bulunmaktadır (Whipps et al., 2020).

Geleneksel olarak *Mycobacteriaceae* enfeksiyonlarında rifampisin, streptomisin, eritromisin, etambutol, isoniazid, doksosiklin, kanamisin, etiyonamid, minosiklin ve tetrasiklinler başarılı sonuçlar verebilmektedir (Kawakami and Kusuda, 1990; Chinabut, 1999). Ancak mikobakteri türlerinin antibiyotiklere karşı duyarlılığı hızlı ve yavaş üreyen türler ile izolatlar arasında değişebilmektedir. Hızlı üreyen mikobakteriler tigesiklin, tobramisin, klaritromisin ve amikasin'e daha duyarlı iken yavaş üreyen mikobakteriler amikasin, klaritromisin ve rifampine karşı daha duyarlıdır (Chang and Whipps, 2015). Hasta akvaryum balıklarından izole edilmiş olan hızlı (*M. chelonae*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum*, *M. neoaurum*, *M. septicum*, *M. abscessus*, *M. mucogenicum*, *M. salmoniphilum*, *M. saopaulense* ve *M. senegalense*) ve yavaş üreyen (*M. szulgai*, *M. marinum* ve *M. gordonae*) 99 mikobakteri izolatının kullanıldığı bir çalışmada izolatların %95,95'inin kanamisine, %94,94'ünün amikasin'e ve %83,83'ünün klaritromisine, %79,79'unun sülfametoksazole, %65,65'inin siprofloksasine ve %55,55'inin doksosikline duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte aynı çalışmada izolatların %98,98'inin ve %96,96'sının sırasıyla isoniazid ve rifampisine karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Guz and Puk, 2022). Yine Güney Afrika'da zebra balıklarından elde edilen bir *M. marinum* izolatının benzer şekilde, isoniazid ve rifampisine karşı dirençli olduğu, bununla birlikte streptomisin ve etambutole karşı da dirençli olduğu belirlenmiştir (Chang and Whipps, 2015). Bir başka çalışmada hasta Japon balığından izole edilen

M. fortuitum izolatında çoklu ilaç direncine rastlanılmış olup, etkenin rifampisin, isoniazid, pirazinamid, ethambutol, myoconda® (rifampicin kombinasyonu bir nano ilaç) klaritromisin ve klofazimine karşı dirençli olduğu saptanmıştır (Uma and Ronald, 2016).

Her ne kadar mikobakteriyel enfeksiyonların tedavisinde çeşitli antibiyotikler önerilse de bazı çalışmalar mikobakterilere karşı antibiyotik tedavisinin etkinliğinin değişken olduğunu, bazı antibiyotiklerin mikobakteriyel koloni yoğunluğunu azaltabildiğini, ancak enfeksiyonu başarıyla ortadan kaldıramadığını göstermiştir. Örneğin; Boos vd. (1995), tropikal süs balıklarında mikobakteriyozisin rifampisin ile tedavisinin etkili olduğunu bildirmiştir. Ancak tedavi sonrası bakterinin enfekte olmuş konakçıdan hala izole edildiğini bildirmiştir. Benzer şekilde Chang vd. (2017), *M. chelonae* ile enfekte edilmiş zebra balıklarında tigesiklin ve klaritromisinin etkinliğini araştırmışlar ve antibiyotik tedavilerinin aside dirençli granülomların prevalansını önemli ölçüde etkilemediğini, tedavi sonrası enfeksiyonun şiddetinin (aside dirençli granülom yoğunluğunun) önemli ölçüde azaldığını saptamışlardır. Bütün bu çalışmalara rağmen konu ile ilgili olarak hala detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Whipps et al., 2020).

2.6. Zoonotik Önem

Mikobakteriler en iyi bilinen zoonotik balık kaynaklı bakteriyel patojenlerdir. İnsanlarda deride ve bazen daha derin dokularda granümatöz karakterde yangıya neden olurlar ve meydana getirdikleri hastalık balıkçı parmağı (fisherman's finger), balık tankı granülomu (fish tank granuloma), balık meraklısı parmağı (fish-fancier's finger) gibi terimler ile ifade edilmektedir. Bu tarz lezyonlar ilk olarak 1951 yılında Norden ve Linell tarafından tanımlanmıştır (Gauthier, 2015). İlerleyen dönemde Linell ve Norden (1954), aynı yüzme havuzunu kullanan ve aynı granümatöz deri lezyonları belirtisi gösteren hastalardan *M. balnei*'yi tanımlamışlardır. Bu vakalardan sonra hastalığın adı yüzme havuzu granülomu (swimming pool granuloma) olarak kayıtlara geçmiştir. Daha sonra etken *M. marinum* olarak adlandırılmıştır (Swift and Cohen, 1962).

M. marinum ve *M. fortuitum* su ürünleri yetiştiriciliği ve subtropikal akvaryum balığı endüstrilerinde çalışanlar için potansiyel mesleki bir tehlikelerdir. Yine akvaryumlarını temizlerken balıklar ile doğrudan temas halinde olan özel tropikal

evcil balık sahipleri için de tehlike arz etmektedir (Haenen et al., 2020). Balıklarda görülen patojenik mikobakteri ile ilişkili insan enfeksiyonları genellikle, yaraların ve deri sıyrıklarının kontamine sulara maruz kalması ile bağlantılıdır. Ayrıca hastalık yüzme havuzu kullanıcılarında havuzların yaygın bir şekilde klorlanmadığı dönemlerde nispeten daha sık olarak görülmekte idi (Petrini, 2006). *M. marinum* olduğu onaylanmış vakaların %45'inde kişilerin geçmişinin balıkçılık ile ilgili olduğu gözlemlenmiştir (Ang et al., 2000). *M. marinum*'un optimal üreme sıcaklığı 30°C'dir ve 37°C'de zayıf üreme gösterir (Aubry et al., 2017b). Bu nedenle enfeksiyonların çoğu vücut dışında ekstremitelerde gelişir (Aubry et al., 2017b; Delghandi et al., 2020). Lezyonlar genellikle ekstremitelerde olmak üzere yüzeysel granülatöz yangı şeklini alır (Şekil 2.6A), ancak daha derin dokuları da kapsayarak tenosinovitis (Şekil 2.6B), bursitis, artrit ve osteomyelitis ile sonuçlanabilir (Lahey, 2003; El Amrani et al., 2010; Gauthier, 2015; Sin et al., 2019). Sistemik hastalıklar nadir olarak bağışıklığı baskılanmış hastalarda ortaya çıkabilir (Streit et al., 2006).



Şekil 2.6 İnsanlarda *M. marinum* kaynaklı bazı klinik olgular. A: El üstünde papüllamatöz granülatöz nodül (El Amrani et al., 2010), B: Yüzük parmağında *M. marinum* kaynaklı tenosinovitis olgusu (Sin et al., 2019)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Etik Bildirim

Çalışma için T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan Etik kurul onayı alınmıştır (2020/10).

3.1.2. Akvaryum Balığı Örneklerinin Alınması

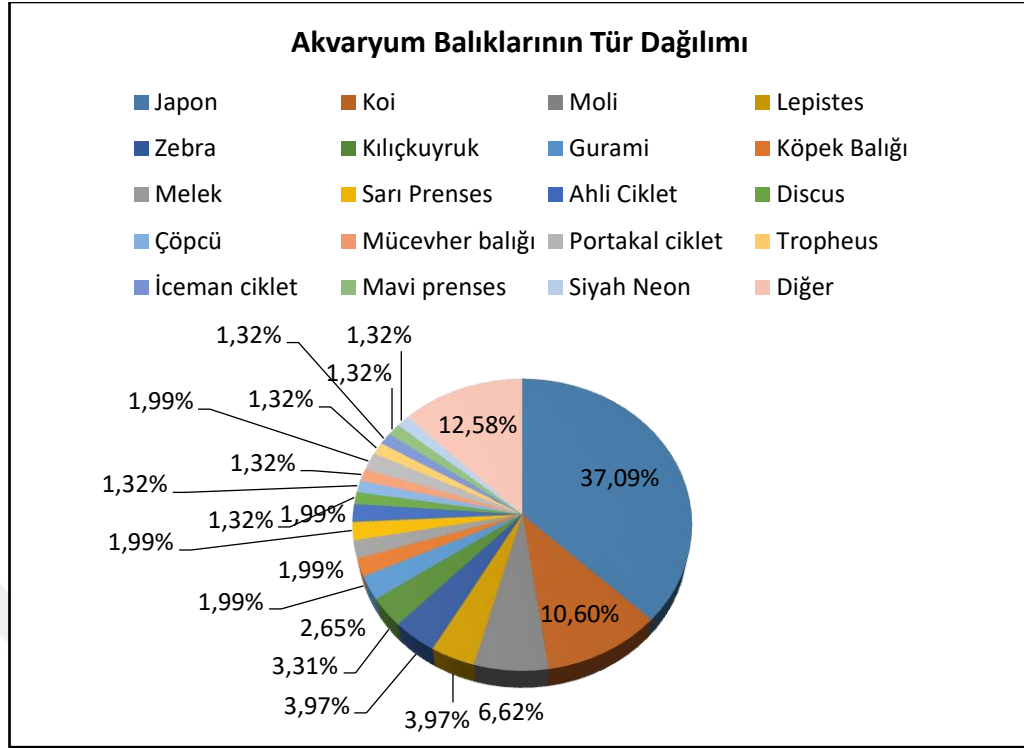
Araştırmada Samsun ilinde akvaryum balığı satışı yapan 16 ticari işletmeden 148 adet, 2 amatör yetiştiriciden 3 adet olmak üzere toplamda 36 farklı türde 151 adet akvaryum balığı toplandı. Balık örnekleri Ocak 2022-Ekim 2022 tarihleri arasında alındı. Örnekleme yapılan balık türlerin belirlenmesinde işletme bazında yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan türler seçildi. Örnekleme esnasında işletmede varsa hastalık belirtisi gösteren balıklar, yoksa sağlıklı görünüme sahip balıklar rastgele seçildi. Çalışmada örnekleme yapılan bazı balık türlerine ait görseller Şekil 3.1'de sunuldu. Örnekleme yapılan akvaryum balıklarına ait bilgiler ise Tablo 3.1 ve Şekil 3.2'de verildi. Çalışmada en fazla örnekleme yapılan balık türü 56 adet ile Japon balığı oldu.



Şekil 3 1. Örnekleme yapılan bazı balık türlerine ait görseller. A: Discus balığı, B: Japon balığı, C: Koi balığı, D: Köpek balığı, E: Sarı prenses, F: Koi balığı, G: Mücevher balığı H: Vatoz, I: Mavi prenses

Tablo 3.1. Örnekleme yapılan akvaryum balıklarına ait bilgiler

No	Örnekleme Yapılan Balık Türleri	Adet	Ortalama Ağırlık (g)
1	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	56	16
2	Koi (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	16	12
3	Moli (<i>Poecilia latipinna</i>)	10	3
4	Lepistes (<i>Poecilia reticulata</i>)	6	1
5	Zebra (<i>Brachydanio rerio</i>)	6	1
6	Kılıçkuyruk (<i>Xiphophorus helleri</i>)	5	2
7	Gurami (<i>Colisa fasciata</i>)	4	2
8	Köpek Balığı (<i>Pangasius pangasius</i>)	3	13
9	Melek (<i>Pterophyllum scalare</i>)	3	2
10	Sarı Prenses (<i>Labidochromis caeruleus</i>)	3	24
11	Ahli ciklet (<i>Sciaenochromis fryeri</i>)	3	8
12	Discus (<i>Symphysodon aequifasciatus</i>)	2	37
13	Çöpcü (<i>Corydoras paleatus</i>)	2	5
14	Mücevher balığı (<i>Hemichromis guttatus</i>)	2	15
15	Portakal ciklet (<i>Metriaclima estherae</i>)	3	11
16	Tropheus (<i>Tropheus moorii</i>)	2	22
17	Sarıkuyruk ciklet (<i>Pseudotropheus acei</i>)	2	7
18	Mavi prenses (<i>Chindongo socolofi</i>)	2	12
19	Siyah Neon (<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>)	2	1
20	Kedi Balığı (<i>Clarias batrachus</i>)	1	187
21	Kankuyruk Tetra (<i>Aphyocharax anisitsi</i>)	1	2
22	İmparator ciklet (<i>Aulonocara maylandi</i>)	1	27
23	Cüce vatoz (<i>Ancistrus dolichopterus</i>)	1	7
24	Beta balığı (<i>Betta splendens</i>)	1	1
25	Bakır tetra (<i>Hasemania nana</i>)	1	2
26	Auratus ciklet (<i>Melanochromis auratus</i>)	1	14
27	Kırmızı göz tetra (<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>)	1	3
28	Magnum Zebra (<i>Amatitlania nigrofasciatus</i>)	1	33
29	Makas kuyruk (<i>Rasbora trilineata</i>)	1	5
30	Mpanga ciklet (<i>Pseudotropheus sp. elongatus mpanga</i>)	1	15
31	Rasbora (<i>Trigonostigma heteromorpha</i>)	1	4
32	Tetra (<i>Aphyocharax anisitsi</i>)	1	8
33	Tinfoil barbus (<i>Barbus schwanenfeldii</i>)	1	40
34	Calico ciklet (Melez Tür)	1	2
35	Vatoz (<i>Pterygoplichthys gibbiceps</i>)	1	20
36	Melez Tür	3	1
Toplam		151	



Şekil 3.2. Örnekleme yapılan akvaryum balıklarının tür dağılımları

3.2. Yöntem

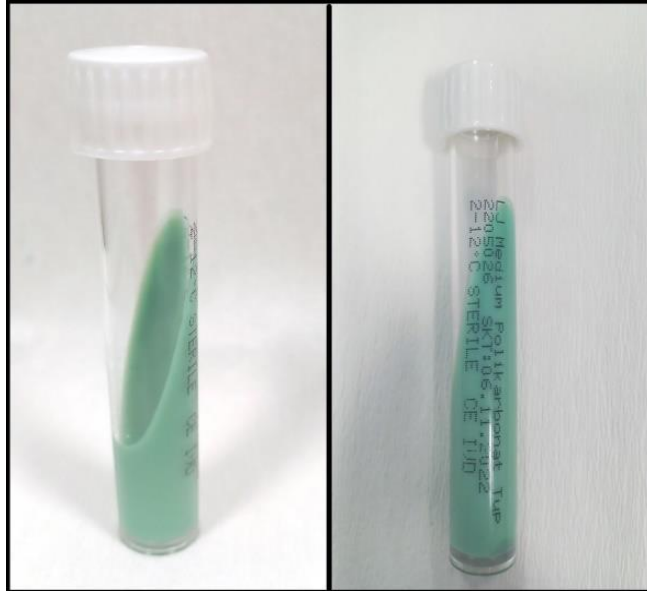
3.2.1. Akvaryum Balıklarının Laboratuvar Muayenesi

Ticari işletmelerden ve amatör yetiştiricilerden alınan akvaryum balıkları canlı olarak laboratuvara getirildi. Nekropsi işlemi öncesi balıklar yüksek dozda (300-500 mg/L) MS 222 (Tricaine methanesulphonate, Sigma-Aldrich) uygulanarak ötenazi yapıldı (Kuruger et al., 2022). Ötenazi işlemi sonrası balıkların nekropsisi yapıldı ve her bir balığın dalak, karaciğer ve böbrekleri aseptik olarak çıkarılarak organ havuzu oluşturuldu. Çok küçük balık türlerinin iç organları bütün olarak değerlendirildi. Balıkların iç organları 2 ila 3 ml steril fizyolojik tuzlu solüsyonunda doku homojenizatörü (Bead Ruptor Elite Homogenizer Omni International, Kanada) yardımı ile homojenize edildi. Bu aşamada yaklaşık olarak 1-2 g doku örneği kullanıldı. Hazırlanan homojenat dekontaminasyon amacıyla 4000 g'de 4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek pelete 1 ml %2 HCl ilave edildi. Bu aşamada karışıma pH indikatörü olarak 10 µl %2 fenolftalein eklendi. 15 dk beklendikten sonra karışım %1 NaOH ile nötralize edildi (karışımın rengi pembeye, açık mor'a dönüşüncüye kadar). Daha sonra karışım yukarıdaki gibi tekrar santrifüj edildi ve pelet 0,5 ml %0,85 steril fizyolojik tuzlu ile sulandırıldı (Shukla et al., 2013).

Dekontaminasyon işlemi sonrası elde edilen karışımdaki ADB'lerin belirlenmesi amacıyla karışımdan 10 µl alınarak smearlar hazırlandı ve sonrasında EZN boyama yapıldı. Bu amaçla EZN boyama kiti (RTA lab. Katalog No: 07005) kullanıldı. Kurutma ve tespit işleminden sonra preparatlar EZN karbol fuksin solüsyonu ile kaplandı ve alttan 2-3 dk kaynamayacak şekilde ısıtıldı. Daha sonra distile su ile yıkandı. Asit-alkol solüsyonu ile 30 sn dekolarizasyon yapıldı. 15 sn distile su ile tekrar yıkandı. Preparatlar EZN metilen mavisi solüsyonu ile 1 dk bekletildikten sonra kurulandı. İmmersiyon yağı damlatılarak mikroskopta mavi zemin üzerinde kırmızı çomak şeklindeki ADB'ler gözlemlendi.

3.2.2. Mikobakteriyel Türlerin İzolasyonu

Kültür için dekontamine edilmiş homojenattan 10 µl alınarak LJ besiyerlerine (17×115 mm polikarbonat tüp içerisinde, RTA Lab., Katalog No: 4007) ekildi (Şekil 3.3). Ekim yapılan besi yerleri 30±1 °C'de inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri günlük olarak 3-4 hafta boyunca kontrol edildi. Şüpheli koloniler mikroskopik olarak EZN boyama yapılarak incelendi ve aynı zamanda subkültüre edildi (Zanoni et al., 2008). Kontamine olan besiyerleri değerlendirme dışı bırakıldı. Elde edilen saf kültürler %15 gliserin içeren Middlebrook 7H9 Broth (Difco™ Middlebrook 7H9 Broth, BD 271310) besiyerinde muhafaza edildi.



Şekil 3.3. Löwenstein-Jensen slantları (17×115 mm polikarbonat tüp içerisinde)

3.2.3. Mikobakteriyel Türlerin İdentifikasyonu

Elde edilen isolatlar moleküler olarak *hsp65* (heat shock protein, ısı şok proteini) gen bölgelerinin PCR ile amplifiye edilmesi ve sonrasında dizi analizlerinin yapılması ile identifiye edildi. Bu amaçla öncelikle isolatların DNA ekstraksiyonları prensibi spin kolon ile filtrasyon esasına dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti ile (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen) üretici firma kullanım talimatlarına göre yapıldı. Kit içeriğine ek olarak Gram pozitif bakteriler için 0,06 g Tris-HCl, 0,15 g EDTA, 240 ml Triton X-100, 0,4 g lizozimden oluşan 20 ml lizozim lizis buffer hazırlandı. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları Nanodrop (Thermo) ile 260 nm'de ölçüldü. DNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

İsolatların *hsp65* gen bölgelerinin çoğaltılmasında Tb11: ACCAACGATGGTGTGTCCAT ve Tb12: CTTGTCTGAACCGCATACCT primerleri kullanıldı (Telenti et al., 1993). PCR amplifikasyonunda 10 µl template DNA, 25 µl 2X DreamTaq™ Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific™), 1 µl 100 µM Tb11 ve Tb 12 primerleri ve 13 µl PCR water (Thermo Scientific™) içeren 50 µl hacimde PCR karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım termal siklus (Bio-Rad T100) cihazına yerleştirilerek 94°C'de 5 dk ön denatürasyon ve sonrasında 94°C'de 1 dk denatürasyon, 60°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 1 dk uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifiye edildi. Amplifikasyon sonrası oluşan son ürünler etidium bromid (2mg/ml) içeren %1,5 agaroz jel elektroforezinde 100 V'da 60 dk yürütüldü ve sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. 439 bp'lik son amplifikasyon ürününün görüldüğü isolatlar pozitif olarak değerlendirildi ve amplikonlar dizi analizi için -20°C'de muhafaza edildi.

İsolatlara ait *hsp65* gen bölgelerinin dizi analizleri hizmet alımı karşılığında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (KİTAM)'nde gerçekleştirildi. Bu aşamada öncelikle elde edilen amplikonların saflaştırılması yapıldı ve dizi analizleri ABI 3130 DNA analiz cihazında (Applied Biosystems) Tb11 ve Tb12 primerleri kullanılarak iki yönlü olarak gerçekleştirildi.

İki yönlü DNA dizisi belirlenen *hsp65* gen bölgelerinin nükleotid baz dizilerini gösteren kromotogramların kalite skorları Geneious Prime (Kearse et al., 2012) ve

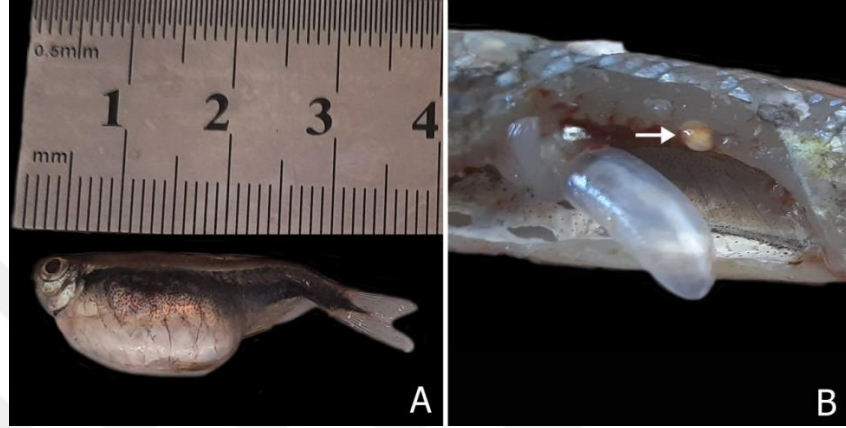
Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen) programları ile analiz edildi. Kromotogramların kalite skorlarının belirlenmesinde Phred skoru 20'nin ($Q \geq 20$) üzerinde olan nükleotid bazları dikkate alındı (Ewing and Green, 1998; Ewing, et al., 1998). İleri ve geri yönlü DNA dizilerin kendi aralarında birleştirmeleri Geneious Prime (Kearse et al., 2012) ve Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen) programları ile yapıldı ve ortak bir nükleotid dizisi elde edildi. Elde edilen ortak dizilerin GenBank veri tabanında BLAST analizleri (Altschul et al., 1997) yapılarak GenBank'a daha önceden kaydedilen diğer mikobakteriyel türlere ait *hsp65* gen bölgeleri ile karşılaştırılarak izolatların identifikasyonları yapıldı. Her bir izolatın *hsp65* gen bölgesine ait nükleotid dizileri GenBank veri tabanına kaydedilerek erişim numaraları alındı.

Çalışmada tespit edilen mikobakteriyel türlere ait *hsp65* gen bölgesi dizileri ile daha önce GenBank veri tabanına kaydedilen mikobakteriyel türlere ait *hsp65* gen bölgesi dizilerinin çoklu hizalamaları ClustalW algoritması (Thompson et al., 1994) kullanılarak BioEdit programı ile yapıldı (Hall, 1999). Çoklu dizi hizalamasından belirsiz şekilde ya da oldukça farklı hizalanan nükleotidler “daha az katı seçim” seçeneği işaretlenerek Gblocks 0.91b programı kullanılarak kaldırıldı (Castresana, 2000). İzolatların *hsp65* gen bölgelerinin filogenetik ağacı Maximum Likelihood metodu ve Tamura–Nei modeli kullanılarak 1000 tekrarlı olarak MEGA X programı ile oluşturuldu (Tamura and Nei, 1993; Kumar et al., 2018). Filogenetik ağaçta iç düğümlerde ön yükleme değerleri (≥ 70) rapor edildi (Hillis and Bull, 1993) ve dış grup olarak *M. tuberculosis* ATCC 27294 (JF491311) *hsp65* gen bölgesi dizisi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Akvaryum Balıklarının Laboratuvar Muayenesi

Antemortem ve postmortem muayene sonucunda 151 akvaryum balığında tüberküloz şüpheli lezyona rastlanılmadı. İki balıkta omurga deformasyonuna, üç balıkta ise paraziter lezyonlara rastlanıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Balıklarda görülen bazı makroskopik bulgular. A; Siyah neon tetra balığında omurga deformasyonu, B; Tetra balığında metaserker (parazit)

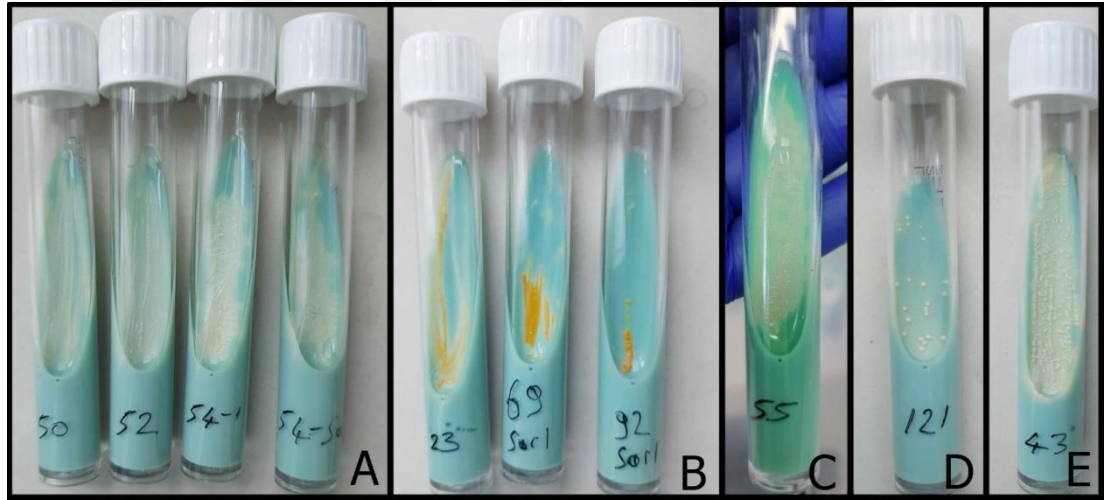
Balık dokularının dekontaminasyonu ve sonrasında ADB'lerin belirlenmesi amacıyla yapılan EZN boyamada 151 akvaryum balığının 28'inin (%18,54) ADB pozitif olduğu saptandı.

4.2. Mikobakteriyel Türlerin İzolasyonu

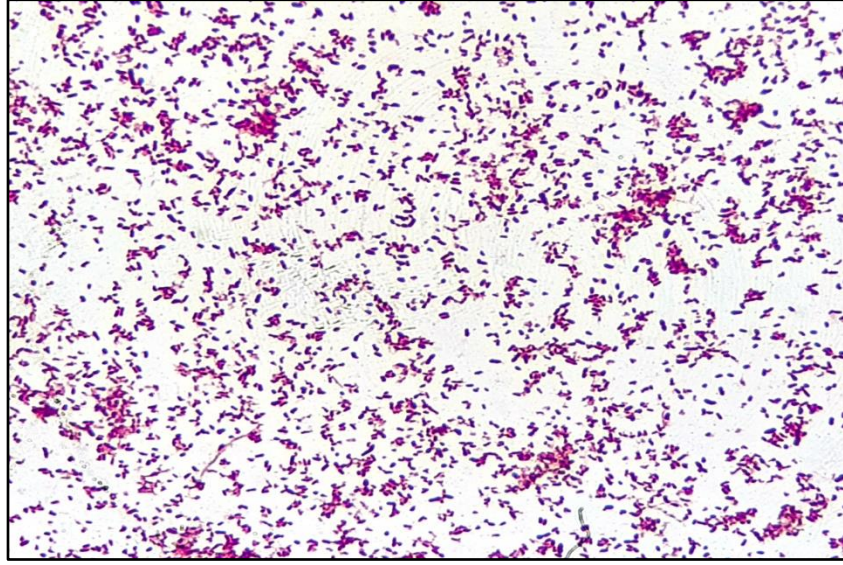
Akvaryum balıklarından elde edilen doku homojenatları dekontaminasyon işleminin ardından mikobakteriyel türlerin izole edilmesi için LJ besiyerlerine ekildi. LJ besiyerleri üzerinde üçüncü günden itibaren üremeler görülmeye başlandı. Üreyen kolonilerin sarı, beyaz, krem-beyaz, mukuslu, saydam, kuru karakterlerde koloniler olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2 ve 4.3). Sonuç olarak 151 balık örneğinin 43'ünde (%28,47) yukarıda bahsedildiği üzere farklı renk ve karakterde toplamda 50 adet mikobakter şüpheli koloni izole edildi ve bu koloniler seçilerek subkültüre edildi. Ayrıca kolonilerden tekrar EZN boyama yapılarak ADB'ler gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.2 LJ besiyerinde çeşitli karakterdeki mikobakteri kolonileri



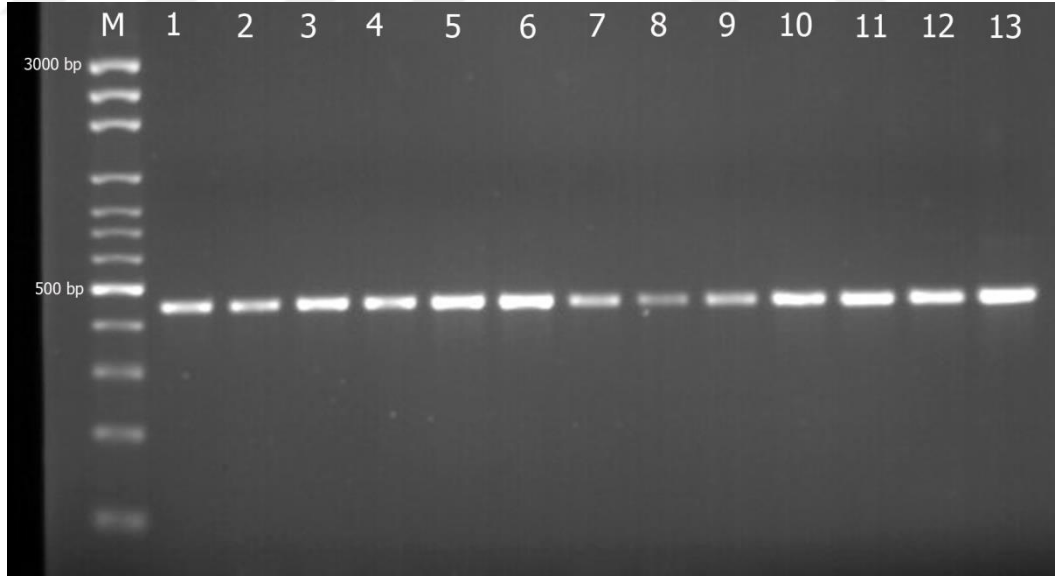
Şekil 4.3. LJ besiyerinde mikobakteri kolonileri. A: *Mycobacteroides chelonae*, B: *Mycobacterium gordonae*, C: *Mycobacteroides abscessus*, D ve E: *Mycobacterium* sp.



Şekil 4.4. EZN boyamada ADB'lerin görünümü

4.2.1. Mikobakteriyel Türlerin İdentifikasyonu

İzolatların *hsp65* gen bölgelerinin Tb11 ve Tb12 primerleri ile amplifiye edilmesi sonucu 43 balıktan elde edilen 50 izolatın 439 bp'lik PCR ürünü verdiği (Şekil 4.5) saptandı. Bu izolatların bir sonraki aşamada *hsp65* gen bölgelerinin dizi analizleri yapıldı.

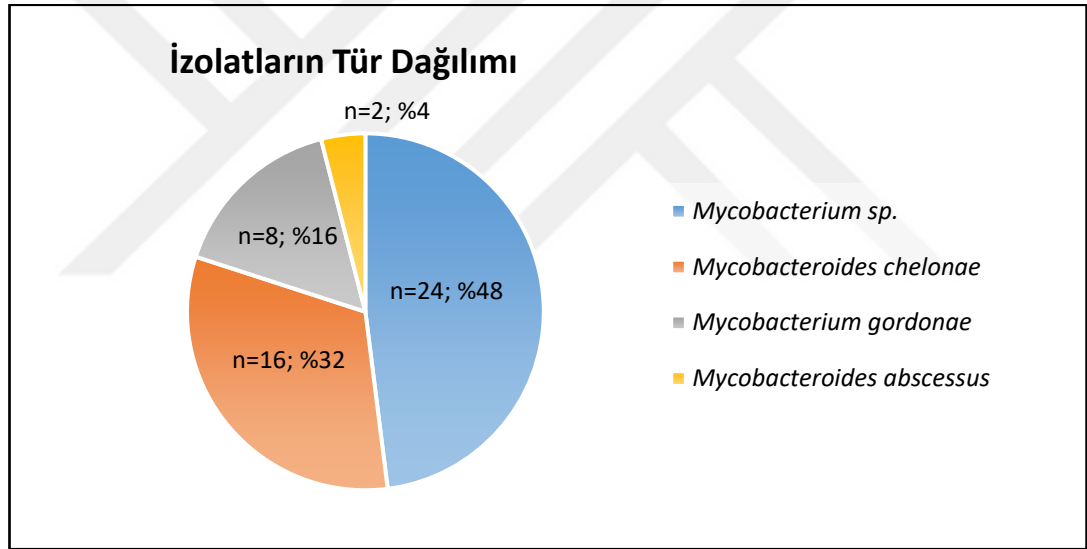


Şekil 4.5. İzolatların *hsp65* gen bölgesinin (439 bp) PCR ile görüntülenmesi. M; Marker (0,1-3 kbp), 1-13 *hsp65* gen bölgesi pozitif izolatlar

Dizi analizleri sonucunda her bir izolata ait elde edilen ortak dizilerin BLAST analizleri yapıldı ve GenBank'a daha önceden kaydedilen diğer mikobakteriyel türlere ait *hsp65* gen bölgeleri ile karşılaştırıldı. Bu analizler sonucu 50 izolatın 24'ü

Mycobacterium sp. (%48), 16'sı *Mycobacteroides chelonae* (%32), 8'i *Mycobacterium gordonae* (%16), ve 2'si *Mycobacteroides abscessus* (%4) olarak identifiye edildi (Şekil 4.6). İzolatlara ait *hsp65* gen bölgelerinin nükleotid dizilerinin GenBank erişim numaraları Tablo 4.1'de verildi. Ek olarak izolatların *hsp65* gen bölgesi dizilerine ait olarak oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.7'de verildi.

Çalışmada örnekleme yapılan 16 akvaryum satış yerinin 11'inde (%68,75) ve 36 balık türünün 20'sinde (%55,55) mikobakteriyel türler tespit edildi. Ayrıca izolatların *hsp65* gen bölgesine yönelik yapılan PCR analizinde pozitif olarak değerlendirilen 43 balığın 7'sinde iki farklı mikobakteri türü izole edildi. Bununla birlikte 3 farklı işletmeden alınan köpek balıklarında, alındıkları akvaryumlarda mikobakteriyel etkenler izole edilmesine rağmen herhangi bir mikobakteriyel etken izole edilemedi.



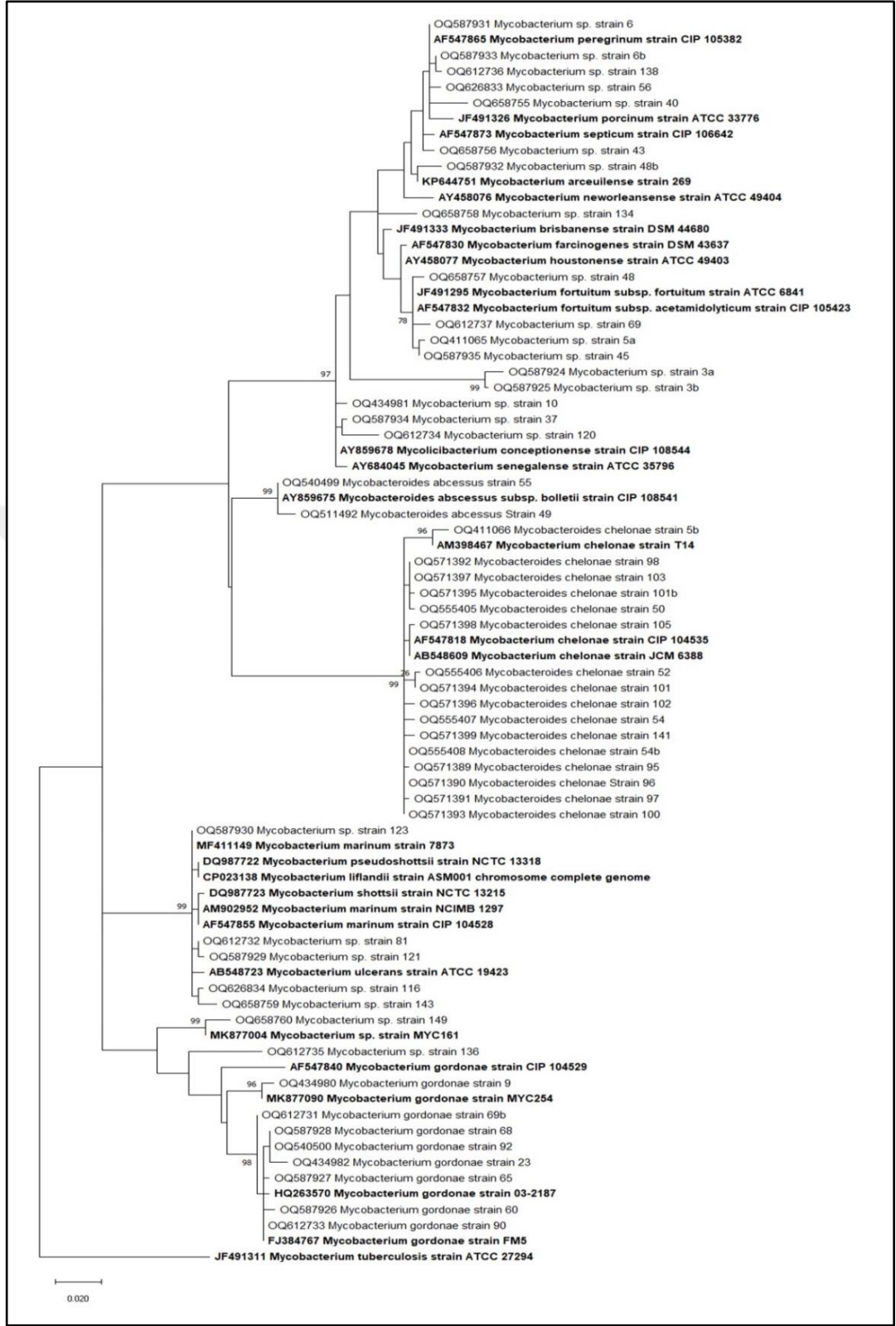
Şekil 4.6. Mikobakteri izolatlarının tür dağılım grafiği

Tablo 4.1. Çalışmada izole edilen Mikobakteriyel türler

No	İzolat No	Balık Türü	İzole Edilen Tür	GenBank Erişim Kodu
1	3a	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ587924
2	3b	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ587925
3	5a	Koi (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ411065
4	5b	Koi (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ411066
5	6	Melek (<i>Pterophyllum scalare</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ587931
6	6b	Melek (<i>Pterophyllum scalare</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ587933
7	9	Mavi presnes (Chindongo socolofi)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	OQ434980
8	10	Portakal ciklet (<i>Metriaclicha estherae</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ434981
9	23	Kılıçkuyruk (<i>Xiphophorus helleri</i>)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	OQ434982
10	37	Siyah Neon (<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ587934
11	40	Auratus ciklet (<i>Melanochromis auratus</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ658755
12	43	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ658756
13	45	Sarı presnes (<i>Labidochromis caeruleus</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ587935
14	48	Vatoz (<i>Pterygoplichthys gibbiceps</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ658757
15	48b	Vatoz (<i>Pterygoplichthys gibbiceps</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ587932
16	49	Discus (<i>Symphysodon aequifasciatus</i>)	<i>Mycobacteroides abscessus</i>	OQ511492
17	50	Lepistes (<i>Poecilia reticulata</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ555405
18	52	Zebra (<i>Brachydanio rerio</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ555406
19	54	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ555407
20	54b	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ555408
21	55	Discus (<i>Symphysodon aequifasciatus</i>)	<i>Mycobacteroides abscessus</i>	OQ540499
22	56	Sarıkuyruk ciklet (<i>Pseudotropheus acei</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ626833
23	60	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	OQ587926
24	65	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	OQ587927
25	68	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	OQ587928
26	69	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ612737
27	69b	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	OQ612731
28	81	Moli (<i>Poecilia latipinna</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ612732
29	90	Koi (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	OQ612733
30	92	Koi (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	<i>Mycobacterium gordonae</i>	OQ540500
31	95	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571389
32	96	Melez tür	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571390
33	97	Zebra (<i>Brachydanio rerio</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571391
34	98	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571392
35	100	Melez tür	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571393
36	101	Zebra (<i>Brachydanio rerio</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571394
37	101b	Zebra (<i>Brachydanio rerio</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571395
38	102	Zebra (<i>Brachydanio rerio</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571396
39	103	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571397

Tablo 4.1. (devam)

No	İzolat No	Balık Türü	İzole Edilen Tür	GenBank Erişim Kodu
40	105	Mücevher balığı (<i>Hemichromis guttatus</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571398
41	116	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ626834
42	120	Koi (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ612734
43	121	Koi (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ587929
44	123	Koi (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ587930
45	134	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ658758
46	136	Koi (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ612735
47	138	Japon (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ612736
48	141	Çöpcü (<i>Corydoras paleatus</i>)	<i>Mycobacteroides chelonae</i>	OQ571399
49	143	Melez tür	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ658759
50	149	Kırmızı göz tetra (<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>)	<i>Mycobacterium</i> sp.	OQ658760



Şekil 4.7. Filogenetik ağaç. Çalışmada elde edilen mikobakter izolatları ile diğer mikobakter türlerinin *hsp65* gen bölgelerinin filogenetik ağacı. Filogenetik ağaç Maximum Likelihood metodu ve Tamura-Nei modeli kullanılarak 1000 tekrarlı olarak yapıldı. GenBank erişim numaraları takson isimlerinin önünde belirtilmiştir. Koyu renk ile gösterilen izolatlar GenBank veri tabanına kaydedilmiş diğer mikobakteriyel türlerdir. Dalların önündeki rakamlar destek değerlerini göstermektedir

5. TARTIŞMA

Balıklerde mikobakteriyel etkenlerin neden olduğu enfeksiyonlar balık tüberkülozu veya balık mikobakteriyozisi olarak isimlendirilmektedir ve bu enfeksiyonlar tatlı ve tuzlu suda yetiştiriciliği yapılan balık türlerinde ve özellikle, akvaryum balıklarında görölmektedir (Gauthier and Rhodes, 2009). Son yıllarda akvaryum balığı yetiştiriciliğinin artması mikobakteriyel enfeksiyonlara olan ilgiyi de arttırmıştır (Edirisinghe et al., 2014). Akvaryum balıklarında mikobakteriyel enfeksiyonların insidansı kültür balıklarına oranla daha yüksek oranda seyretmektedir. Bunun başlıca nedeni ise mikobakteriyel enfeksiyonların kronik bir seyir göstermesidir (Toranzo et al., 2005). Akvaryum balıklarında mikobakteriyel türlerin varlığı ve dağılımları hakkında dünya genelinde birçok çalışma yapılmıştır (Lescenko et al., 2003; Beran et al., 2006; Kusar et al., 2017). Bu çalışmalarda sağlıklı görünüme sahip akvaryum balıklarının bile mikobakteriyel türleri taşıyabildiği belirlenmiş ve hastalığın zoonotik önemine vurgu yapılmıştır (Beran et al., 2006; Shukla et al., 2014). Ülkemizde ise akvaryum balıklarında mikobakteriyel türlerin dağılımlarının belirlenmesine yönelik sadece bir bildirim rastlanılmıştır (Baş, 2011). Bu bağlamda konu ile ilgili araştırma açığının kapatılması ve gelecek çalışmalara temel olması açısından bu tez çalışması önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında örnekleme yapılan 16 ticari işletmenin 11'inde (%68,75) mikobakteriyel türler izole edilmiştir. Çalışmada identifiye edilen üç önemli türün (*Mycobacteriodes chelonae*, *M. gordanae* ve *Mycobacteriodes abscessus*) hem balıklarda (Antuofermo et al., 2014; Kato et al., 2019; Kam et al., 2022) hem de insanlarda (Kang et al., 2010; Chang et al., 2021; Riopel et al., 2023) enfeksiyona neden olabilmesi çalışmanın balık sağlığı ve halk sağlığı açısından önemini ortaya koymaktadır.

Akuvatik canlılarda mikobakteriyozisin laboratuvar teşhisinde geleneksel mikrobiyolojik metotlar, proteomik ve immünolojik yöntemler kullanılmaktadır. Geleneksel mikrobiyolojik metotlar içerisinde örneklerden direk mikroskopi ile ADB'lerin belirlenmesi ve katı besiyerlerinde mikobakteriyel türlerin izolasyonu ve biyokimyasal testler yer almaktadır (Maboni et al., 2023). ADB smear boyası ve kültür halk sağlığı laboratuvarlarında her zaman birlikte yapılan iki ayrı testtir (Seyfahmadi et al., 2017). ADB'lerin hastalıktan etkilenen dokularda saptanması olası bir tanının konulmasına yardımcı olabilecek ilk aşamadır (Smith et al., 2019).

Bu amaçla yaygın olarak kullanılan boya EZN boyasıdır ve bu boya ile smearlardan, dokulardan ve diğer örneklerden ve izole edilen kolonilerden aside dirençli mikobakteriler tanımlanabilmektedir (Maboni et al., 2023). ADB'ler balıklarda oluşan mikobakteriyel granülomlarda ve sağlıklı görünüme sahip balıkların dokularında görülebilmektedir (Gauthier et al., 2003; Beran et al., 2006; Shukla et al., 2014). Ancak hem deneysel hem de doğal enfeksiyonlarda ADB içermeyen granülomların da görüldüğü bildirilmiştir (Gauthier et al., 2003; Shukla et al., 2013). Dolayısıyla alınan örneklerde her zaman EZN boyama ile ADB'lerin saptanması mümkün olamayabilir ve devam eden süreç eksik tanıyla sonuçlanabilir (Maboni et al., 2023). Bu nedenle mikroskopik bakının kültür incelemesine göre daha az duyarlı bir aşama olduğu bildirilmekte (Seyfahmadi et al., 2017) ve kültür aşamasının mikobakteriyozisin tanısında hala önemli bir teşhis aracı olduğu görülmektedir (Maboni et al., 2023). Bu tez çalışmasında 151 akvaryum balığı klinik olarak muayene edilmiş ve mikobakteriyozis yönünden şüpheli herhangi bir klinik tabloya rastlanılmamıştır. Yine bu balıkların nekropsisinde balıkların iç organlarında granülom ve benzeri yapılar görülmemiştir. Balıkların iç organlarından alınan örneklerin EZN boyaması sonucunda örneklerin %18,54'ünde ADB'ler saptanmış, kültür sonrası ise örneklerin %28,47'sinde mikobakteriyel türler izole edilmiştir. Bu çalışmada pozitif mikroskopi sonuçları ile bakteriyoloji sonuçları arasında gözlenen bu farklılık benzer şekilde başka çalışmalarda da elde edilmiştir. İran'da Seyfahmadi vd. (2017), tarafından yapılan çalışmada sağlıklı görünüme sahip EZN boyamada 42 balık örneğinin %19,04'ünde (42 örneğin 8'inde) ADB'lerin varlığı saptanmış, kültür sonrası ise örneklerin %28,57'sinden (42 örneğin 12'sinde) mikobakteriyel türler izole edilmiştir. Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada balıkların %14,3'ünden ADB'ler tespit edilmiş ve mikobakteriler balıkların %42,9'undan izole edilmiştir (Beran et al., 2006). Polonya'da yapılan diğer bir çalışmada balıkların %15,44'ünde mikroskopla ADB'ler tespit edilmiş ve bu örneklerin %50,74'ünden mikobakteriler izole edilmiştir (Puk and Guz, 2020). Hindistan'da yapılan bir çalışmada Shukla vd. (2013), granüloamatöz lezyonlara sahip 20 akvaryum balığının %60'ının ADB pozitif olduğunu, %65'inin ise kültür pozitif olduğunu saptamışlardır. Yayma preparatlarda saptanan ADB pozitiflik oranları ile bakteriyoloji sonuçları arasında görülen farklılıkların örneklerdeki mikobakteri sayılarının farklı olmasına (Puk and Guz, 2020) veya patojenin türü ve üreme aşamasına bağlı olabileceği bildirilmiştir (Maboni et al., 2023).

NTM izolatlarının genus ve tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan fenotipik özellikler ve biyokimyasal testler, komplike bir prosedüre sahip olup uzun inkübasyon süreleri gerektirir (Maboni et al., 2023). Ayrıca bu konvansiyonel metotların türlerin kesin bir şekilde tanımlanmasında yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Ong et al., 2010). Bu nedenle, mikobakteri türlerinin hızlı tespiti ve tanımlanmasında moleküler bazlı çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Shukla et al., 2014). Bu yöntemler ile yeni türlerin karakterizasyonu ve alt tür düzeyinde NTM türlerinin tanımlaması yapılabilmektedir (Ryu et al., 2016). Bu tez çalışmasında izole edilen NTM türlerinin tanımlanması dizilemede altın standart hedef genlerden biri olarak tanımlanan *hsp65* geni (Maboni et al., 2023) kullanılarak yapılmıştır. Polonya’da yapılan bir çalışmada, akvaryum yetiştiricilerinden ve petshoplardan alınan ve hastalık belirtisi gösteren 136 adet akvaryum balığından 99 adet mikobakteriyel izolat elde edilmiş ve bu izolatlar *hsp65* gen bölgesi dizi analizi hedef alınarak identifiye edilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri izolatların tamamını tür düzeyinde identifiye ettiklerini bildirmiştir (Puk and Guz, 2020). Bir başka çalışmada ise 109 klinik NTM suşuna ait 16S rRNA, *hsp65* ve *rpoB* gen bölgeleri dizileri, veri tabanında var olan diziler ile karşılaştırılmış ve tür düzeyinde tanımlama oranlarının 16S rRNA, *hsp65* ve *rpoB* gen bölgeleri için sırasıyla %71,3, %86,79 ve %81,55 olduğu belirlenmiştir (Kim and Shin, 2018). Bu tez çalışmasında ise *hsp65* gen bölgesi dizi analizi ile izole edilen 50 izolatın %52’si tür düzeyinde identifiye edilmiş olup, %48’i cins düzeyinde tanımlanmıştır. McNabb vd. (2004)’e göre, *hsp65* geninin bir kısmının dizi analizi sonucunda %97’nin üzerinde olan eşleşmeler mikobakteriyel türlerinin tanımlanmasında geçerli kabul edilebilmektedir. Bu tez çalışmasında Japon balıklarından elde edilen 3a (GenBank Erişim No:OQ587924) ve 3b (GenBank Erişim No:OQ587925) numaralı izolatlar ile koi balığından izole edilen 136 (GenBank Erişim No:OQ612735) numaralı izolat ve kırmızı göz tetra balığından izole edilen 149 (GenBank Erişim No:OQ658760) numaralı izolatın BLAST analizleri sonucunda GenBank veri tabanında bulunan nükleotid koleksiyonu ile %97’nin altında eşleşmelere sahip olduğu belirlenmiş olup, bu dört izolatın yeni türler olabileceği değerlendirilmiştir. Tür bazında isimlendirilemeyen diğer 20 izolatın ise iki veya daha fazla mikobakteri türü ile %97’nin üzerinde benzerliğe sahip oldukları belirlenmiş olup bu izolatlar ile 3a, 3b, 136 ve 149 numaralı izolatlar *Mycobacterium* sp. olarak adlandırılmıştır (Tablo 4.1). Bu veriler, mikobakteriyel izolatların karakterizasyonunda tek bir gen bölgesinin dizi analizinin

yeterli olmadığı, WGS analizi (Dohal et al., 2021) veya farklı korunmuş gen bölgelerinin dizi analizlerinin kullanıldığı multilokus sekans analizi (Kim and Shin, 2018) gibi genetik tabanlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Özellikle, WGS analizi yeni mikobakteri türlerinin karakterizasyonuna, direnç ve virülans faktörlerini kodlayan gen mutasyonlarının tanımlanmasına katkıda bulunmaktadır (Dohal et al., 2021).

Bu tez çalışmasında identifiye edilen 3 mikobakteri türünün (*M. chelonae*, *M. gordonae* ve *M. abscessus*) akvaryum balıklarından saptandığına dair yayınlar bulunmaktadır. Bunlardan biri Polonya’da akvaryum balıklarında mikobakteri türlerinin varlığının belirlenmesine yönelik yapılmış olup, çalışmada *M. chelonae*, *M. gordonae* ve *M. abscessus*’un yanı sıra *M. marinum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum*, *M. senegalense*, *M. septicum*, *M. neoaurum*, *M. mucogenicum*, *M. salmoniphilum*, *M. saopaulense* ve *M. szulgai* de izole edilmiştir (Puk and Guz, 2020). Benzer şekilde akvaryum balıklarında mikobakteri türlerinin varlığının belirlendiği bir başka çalışma İtalya’da yapılmıştır. Bu çalışmada da *M. chelonae*, *M. gordonae* ve *M. abscessus* ile birlikte *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. marinum*, *M. nonchromogenicum* ve *M. interjectum* izole edilmiştir (Zanoni et al., 2008). Çalışmamızdan farklı olarak Slovenya’da (Kusar et al., 2017), İsveç’de (Hongslo and Jansson, 2014), Çekya’da (Beran et al., 2006; Slany et al., 2014) ve Hindistan’da (Shukla et al., 2013) akvaryum balıkları üzerinde yapılan çalışmalarda aralarında *M. chelonae* ve *M. gordonae*’nin de dahil olduğu farklı mikobakteri türleri izole edilmiş olup *M. abscessus* izole edilememiştir. İran’da yapılan bir çalışmada ise çalışmamızda izole edilen türlerden olan *M. chelonae* ve *M. abscessus* izole edilememiş olup, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. terrea*, *M. flavescens*, *M. gordonae* ve *M. asiaticum* izole edilmiştir (Seyfahmadi et al., 2017). Hindistan’da yapılan bir çalışmada ise, hastalık belirtisi gösteren akvaryum balıklarından *M. abscessus*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. conceptionense*, *M. parascrofulaceum* ve *M. senegalense* türleri izole edilmiş olup, bu tez çalışmasında baskın tür olduğu belirlenen *M. chelonae* izole edilememiştir (Shukla et al., 2014).

Türkiye’de akvaryum balıklarında mikobakteri türlerinin varlıklarının belirlenmesi üzerinde yapılmış olan tek çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada 87 akvaryum balığından *M. fortuitum* (6 izolat), *M. marinum* (3 izolat) ve *M. chelonae* (2 izolat) türleri izole edilmiş olup, %6,89 izolasyon oranıyla *M. fortuitum*’un baskın

tür olduğu bildirilmiştir (Baş, 2011). Bu tez çalışmasında ise *M. chelonae*'nin (%32) baskın tür olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, yapılan literatür taramasına göre, bu tez alışması Türkiye'de akvaryum balıklarından *M. gordonae* ve *M. abscessus*'un izole edildiği ilk çalışmadır.

M. marinum akvaryum balığı yetiştiriciliği ile ilişkilendirilen ve iyi bilinen bir insan patojenidir (Kusar et al., 2017). Bu türün yapılan çalışmalarda yaygın olarak saptandığına dair birçok yayın bulunmaktadır. Örneğin, Çekya'da (Slany et al., 2014), İsveç'de (Hongslo and Jansson, 2014) ve Polonya'da (Puk and Guz, 2020) akvaryum balıklarından izole edilen mikobakteri türleri arasında *M. marinum* baskın tür olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında ise BLAST analizleri sonucu *Mycobacterium* sp., olarak adlandırılan 81 (GenBank Erişim No: OQ612732), 116 (GenBank Erişim No: OQ626834), 121 (GenBank Erişim No: OQ587929), 123 (GenBank Erişim No: OQ587930) ve 143 (GenBank Erişim No: OQ658759) numaralı izolatların *M. marinum*, *M. pseudoshottsii*, *M. liflandii* ve *M. ulcerans* ile %99'un üzerinde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu izolatların ileri genetik çalışmalar sonrası *M. marinum* olabileceği düşünölmüştür.

6. SONUÇ

Akvaryum endüstrisinin tüm gelişmiş ülkelerdeki büyük ticari önemi, süs balıkları arasında görülen hastalık etkenlerinin daha iyi anlaşılması ihtiyacını ortaya koymuştur. Bu bağlamda, son yıllarda akvaryum balıklarındaki NTM'ler üzerine ilginin giderek arttığı görülmektedir. Özellikle tüm dünyada NTM'lerin farklı akvaryum balığı türlerindeki varlığının belirlenmesine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır (Beran et al., 2006; Hongslo and Jansson, 2014; Slany et al., 2014; Puk and Guz, 2020). Bu çalışmalarda sağlıklı görünüme sahip balıkların bile NTM'leri taşıyabildiği belirlenmiş olup, NTM'lerin halk sağlığı açısından da büyük bir öneme sahip oldukları vurgulanmaktadır.

Yapılan literatür taramasında Türkiye'de akvaryum balıklarında mikobakteriyel türlerin belirlenmesi ile ilgili tek çalışmaya rastlanılmıştır (Baş, 2011). Bu tez çalışması ile Samsun ili akvaryum balıklarında NTM'lerin varlığı ve dağılımları belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ile izolasyon çalışmalarında kültür yönteminin direk mikroskopi yöntemine göre daha duyarlı olduğu, kültür yöntemi ile EZN boyamada ADB saptanamayan örneklerden mikobakteri türlerinin izole edilebildiği ortaya konulmuştur. Mikobakteri türlerinin kesin tanısında *hsp65* gen bölgesini hedef alan moleküler çalışmaların tür düzeyinde tanımlamada yetersiz kaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, mikobakteriyel türlere ait elde edilen *hsp65* gen bölgesi dizileri GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. Böylece ülkemiz için kullanılabilecek genetik bir veri tabanı oluşturulmuştur.

Samsun ilinde akvaryum balığı satış yerlerinde yüksek oranda mikobakteri tespit edilmesi (%68,75) balık sağlığı ve halk sağlığı açısından önemli bir risk teşkil etmektedir. Bu tür zoonotik patojenlerin varlığını tespit etmek ve insanlara bulaşmasını önlemek için tek sağlık yaklaşımı gereklidir. Özellikle, akvaryum balığı satış yerlerinin düzenli aralıklarla mikobakteri yönünden incelenmesi gerektiği, satıcıların işletmelerinde genel biyogüvenlik kurallarına uyulması gerektiği ve yurt dışından ithal edilen süs balıkları için ithalatçı firmalardan hastalıktan ari belgesi alınması gerektiği sonucuna varılmıştır.

NTM'lerin halk sağlığı açısından taşıdığı önem nedeniyle bu çalışmanın ülkemiz akvaryum balığı sektörü ve bu sektörde çalışanlar için farkındalık yaratması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Adekambi, T., Colson, P., and Drancourt, M. (2003). *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 41,5699-5708.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, Z., Zhang, J., Miller, W., and Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17). 3389-3402.
- Ang, P., Rattana-Apiromyakij, N., and Goh, C. (2000). Retrospective study of *Mycobacterium marinum* skin infections. *International Journal of Dermatology*, 39(5), 343-7.
- Antuofermo, E., Pais, A., Nuvoli, S., Hetzel, U., Burrai, G. P., Rocca, S., and Prearo, M. (2014). *Mycobacterium chelonae* associated with tumor-like skin and oral masses in farmed Russian sturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*). *BMC Veterinary Research*, 10(1), 1-9.
- Aronson, J. (1926). Spontaneous tuberculosis in salt water fish. *Journal of Infectious Diseases*, 39, 315-320.
- Arundhati, M., Tulika, M., Jess, H., Liam, T., Waldemar, V., Nicholas, H., and Sanjib, B. (2019). Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles'heel for the TB-causing pathogen. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 548-575.
- Ashburner, L. D. (1977). *Mycobacteriosis* in hatchery-confined chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum) in Australia. *Fish Biology*, 10, 523-528.
- Aubry, A., Mougari, F., Reibel, F., and Cambau, E. (2017a). *Mycobacterium marinum*. Schlossberg D. (ed) in: *Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. Seventh Edition*. (s. 43;735-746). Washington, DC,USA: ASM Press.
- Aubry, A., Mougari, F., Reibel, F., and Cambau, E. (2017b). *Mycobacterium marinum*. *Microbiology Spectrum*, 5(2), 17-38.
- Austin, B., and Austin, D. A. (eds.) (2016). *Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish Sixth Edition* (pp. 115-141). Switzerland. Springer International Publishing.
- Avsever, M. L., Çavuşoğlu, C., Eskiizmirli, S., Türe, M., Korun, J., and Çamkerten, I. (2016). First isolation of *Mycobacterium marinum* from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus auratus*) cultured in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 36(5), 193-200.
- Avsever, M. L., Çavuşoğlu, C., Günen, M., Yazıcıoğlu, Ö., Eskiizmirli, S., Didinen, B., Özden, M. (2014). The first isolation of *Mycobacterium marinum* from cultured *Argyrosomus regius*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 34(4), 124-129.
- Babamahmoodi, F., Babamahmoodi, A., and Nikkahan, B. (2014). Review of *Mycobacterium marinum* infection reported from Iran and report of three new cases with sporotrichoid presentation. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16:e10120. doi: 10.5812/ircmj.10120.
- Backman, S., Ferguson, H. W., Prescott, J. F., and Wilcock, B. P. (1990). Progressive panophthalmitis in a chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum): a case report. *Journal of Fish Diseases*, 13,345-353.
- Baş, B. (2011). Balıklarda ve sularda mikobakterilerin pcr-rflp analizi ile incelenmesi doktora tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Ankara.

- Bataillon, E., Moeller, A., and Terre, L. (1902). Über die identitat des Bacillus des Karpfens (Bataillon, Dubard et terre) und des bacillus der Blindsschleuche (Moeller). *Zentralblatt für tuberculose*, 3, 467-468.
- Bayram, G. ve Emekdaş, G. (2008). Mikobakteri türlerinin identifikasyonunda polimeraz zincir reaksiyonu-parça uzunluk polimorfizmi tekniği ile klasik yöntemler arasındaki uyumun belirlenmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1 (3), 8-13.
- Beecham, H., Oldfield, E., Lewis D. E., and Buker J. L. (1991). *Mycobacterium marinum* infection from shucking oysters. *Lancet*, 337(8755), 1487.
- Beran, V., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., and Pavlik, I. (2006). Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment. *Journal of Fish Diseases*, 29(7), 383-93.
- Bhalla, G. S., Sarao, M. S., Kalra, D., Bandyopadhyay, K., and John, A. R. (2018). Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria. *Practical Laboratory Medicine*, 18, 12:e00107.
- Boos, S., Schmidt, H., Ritter, G., and Manz, D. (1995). Effectiveness of oral rifampicin against mycobacteriosis in tropical fish. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 108(7), 253-255.
- Bozzetta, E., Varello, K., Giorgi, I., Fioravanti, M. L., Pezzolato, M., Zanoni, R. G., and Prearo, M. (2010). *Mycobacterium marinum* infection in a hybrid striped bass farm in Italy. *Journal of Fish Diseases*, 33(9), 781-785.
- Büyüktaş, E. ve Kızak, V. (2018). İstanbul Avrupa yakasında bulunan akvaryum işletmelerinin genel profilinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 14(3), 196-207.
- Brennan, P., and Goren, M. (1979). Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex. and *Mycobacterium intracellulare* serotype 9. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 4205-4211.
- Cardoso, P., Moreno, A., Moreno, L., Oliveria, C., Baroni, F., Maganha, S., and Balian, S. (2019). Infectious diseases in aquarium ornamental pet fish: prevention and control measures. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 56(2), 1-16.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 540-552.
- Chang, C. T., and Whipps, C. M. (2015). Activity of Antibiotics against *Mycobacterium* species commonly found in laboratory zebrafish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 27(2), 88-95.
- Chang, C. T., Doerr, K. M., and Whipps, C. M. (2017). Antibiotic treatment of zebrafish mycobacteriosis: tolerance and efficacy of treatments with tigecycline and clarithromycin. *Journal of Fish Diseases*, 40(10), 1473-1485.
- Chang, H. Y., Tsai, W. C., Lee, T. F., and Sheng, W. H. (2021). *Mycobacterium gordonae* infection in immunocompromised and immunocompetent hosts: a series of seven cases and literature review. *Journal of the Formosan Medical Association*, 120(1), 524-532.
- Chen, S. C., Yoshida, T., Adams, A., Thompson, K. D., and Richards, R. H. (1996). Immune response of rainbow trout to extracellular products of *Mycobacterium* spp. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8, 216-222.
- Chiaradia, L., Lefebvre, C., and Parra, J. (2017). Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Scientific Reports*, 7, 12807.

- Chinabut, S. (1999). Viral, Bacterial, and Fungal Infections. Woo P. T. K., and Bruno, D. W. (Eds.). In, *Fish Disease and Disorders* (pp. 397-415). Wallingford, UK: CAB International.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Hana, Y., Xu, X. V., de Meyer, S. and Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461-466.
- CLSI. (2018). Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by targeted DNA sequencing, 2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cohn, L. M., Waggoner, R. F., and McClatchy, J. K. (1968). The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *American Review of Respiratory Disease*, 98:295-296.
- Cribier, B., Aubry, A., Caumes, E., Cambau, E., Jarlier, V., and Chosidow, O. (2011). Aspects histopathologiques de l'infection à *Mycobacterium marinum*. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 138, 17-22.
- Cui, Z., Samuel-Shaker, D., Watral, V., and Kent, M. L. (2010). Attenuated *Mycobacterium marinum* protects zebrafish against mycobacteriosis. *Journal of Fish Diseases*, 33, 371-375.
- Çelik, İ., Çelik, P. ve Şahin, T. (2014). Akvaryum sektörünün mevcut durumu, sorunlar ve çözüm önerileri. *1. Ulusal Akvaryum Balıkçılığı ve Sorunları Çalıştayı Sonuç Raporu Antalya*, 11-19.
- Davidovich, N., Pretto, T., Sharon, G., Zilberg, D., Blum, S. E., Baider, Z., and Rorman, E. (2020). Cutaneous appearance of mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum*, affecting gilthead seabream (*Sparus aurata*) cultured in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, 528, 735507.
- de Zwaan, R., van Ingen, J., and van Soolingen, D. (2014). Utility of rpoB gene sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 2544-2551.
- Decostere, A., Hermans, K., and Haesebrouck, F. (2004). Piscine Mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. *Veterinary Microbiology*, 99, 159-166.
- Delghandi, M., El-Matbouli, M., and Menanteau-Ledouble, S. (2020). Mycobacteriosis and Infections with Non-tuberculous Mycobacteria in Aquatic Organisms: A Review. *Microorganisms*, 7:8(9), 1368.
- Desmond, E. P., Hall, G. S., Lin, G., Pfyffer, G. E., Ridderhof, J. C., Siddiqi, H. S., Wallace RJ Jr, Warren NG, and Witebsky FG. (2011). Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. 2nd edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
- Dohal, M., Porvazník, I., Solovič, I., and Mokřý, J. (2021). Whole genome sequencing in the management of non-tuberculous mycobacterial infections. *Microorganisms*, 9(11), 2237.
- Durupınar, B. (1996). Mikobakteriler ve çevre koşullarına dayanıklılıkları. *O.M.Ü. Tıp Dergisi*, 13 (4), 297-304.
- Edirisinghe, E. A., Dissanayake, D. R., Abayasekera, C. L., and Arulkanthan, A. (2014). Occurrence of nontuberculous mycobacteria in aquatic sources of Sri Lanka. *International Journal of Mycobacteriology*, 3(4), 242-246.
- Eisenstadt, J., and Hall, G. (1995). Microbiology and classification of mycobacteria. *Clinics in Dermatology*, 13(3), 197-206.

- El Amrani, M., Adoui, M., Patey, O., and Asselineau, A. (2010). Upper extremity *Mycobacterium marinum* infection. *Orthopaedics and Traumatology Surgery and Research*, 96(6), 706-711.
- Ewing, B., and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8(3). 186-194.
- Ewing, N., Hillier, L., Wendl, M., and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8(3).175-185.
- Fedrizzi, T., Meehan, C., Grottola, A., Giacobazzi, E., Fregni Serpini, G., Tagliazucchi, S., Jousson, O., Tortoli, E., and Segata, N. (2017). Genomic characterization of nontuberculous mycobacteria. *Scientific Reports*, 7, 45258.
- Francis-Floyd, R. (2011). *Mycobacterial infections of fish* (pp. 1-12). USA: Southern Regional Aquaculture Center.
- Gauthier, D., Rhodes, M., Vogelbein, W. K., Kator, H., and Ottinger, C. (2003). Experimental mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54(2), 105-117.
- Gauthier, D., Latour, R., and Eisey D. M., Bonzek C. F., Gartland J, Burge E. J. (2008). Mycobacteriosis-associated mortality in wild striped bass (*Morone saxatilis*) from Chesapeake Bay, U.S.A. *Ecological Society of America*, 18, 1718-1727.
- Gauthier, D., and Rhodes, M. (2009). Mycobacteriosis in fishes: A review. *Veterinary Journal*, 180, 33-47.
- Gauthier, D. (2015). Bacterial zoonoses of fishes: a review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. *Veterinary Journal*, 203(1), 27-35.
- Gauthier, D., and Rhodes, M. (2017). *Mycobacterium spp.* Woo, P. and Cipriano, R. (Eds.) In, *Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection* (pp. 245-257). Wallingford, UK: CABI.
- Goris, J., Konstantinidis, K., Klappenbach, J., Coenye, T., Vandamme, P., and Tiedje, J. M. (2007). DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 81-91.
- Griffiths, P., Babb, J., and Fraise, A. (1999). Mycobactericidal activity of selected disinfectants using a quantitative suspension test. *Journal of Hospital Infection*, 41(2), 111-21.
- Grupta, R., Lo, B., and Son, J. (2018). Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus mycobacterium into an emended genus mycobacterium and four novel genera. *Frontiers in Microbiology*, 13(9), 67.
- Guz, L., and Puk, K. (2022). Antibiotic susceptibility of mycobacteria isolated from ornamental fish. *Journal of Veterinary Research*, 66(1), 69-76.
- Haenen, O. L., Karunasagar, I., Manfrin, A., Zncic, S., Lavilla-Pitogo, C., Lawrence, M., and Karunasagar, I. (2020). Contact-zoonotic bacteria of warm water ornamental and cultured fish. *Asian Fisheries Science*, 33(S1), 39-45.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hancı, İ. ve Onuk, E. E. (2016). Balıkların başlıca bakteriyel zoonozları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 27(2), 123-130.

- Hashish, E., Merwad, A., Elgaml, S., Amer, A., Kamal, H., Elsadek, A., and Sitohy, M. (2018). *Mycobacterium marinum* infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology and management; a review. *Veterinary Quarterly*, 38(1), 35-46.
- Herbst, L. H., Costa, S. F., Weiss, L. M., Johnson, L. K., Bartell, J., Davis, R., Levi, M. (2001). Granulomatous skin lesions in moray eels caused by a novel mycobacterium species related to *Mycobacterium triplex*. *Infection and Immunity*, 69, 4639-4646.
- Hillis, D., and Bull, J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42, 182-192.
- Hongslo, T., and Jansson, E. (2014). Occurrence of different species of mycobacteria in aquarium fish from Swedish pet-shops. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 34, 78-86.
- Ingles, V., Roberts, R., and Bromage, N. (1994). *Bacterial Diseases of Fish*. Cambridge, UK. Blackwell Science.
- Iseman, M. (2002). Tuberculosis therapy: past, present and future. *European Respiratory Journal*, 36, 87-94.
- ITC. (2023). https://www.trademap.org/Country_SelProductCountry_TS.aspx?nvpm=. https://www.trademap.org/Country_SelProductCountry_TS.aspx?nvpm=
- Kam, J. Y., Hortle, E., Warner, S. E., Wright, K., Luo, K., and Oehlers, S. H. (2022). Rough and smooth variants of *Mycobacterium abscessus* are differentially controlled by host immunity during chronic infection of adult zebrafish. *Nature Communications*, 13(1), 952.
- Kang, G. C., Gan, A. W., Yam, A., Tan, A. B., and Tay, S. C. (2010). *Mycobacterium abscessus* hand infections in immunocompetent fish handlers: case report. *The Journal of Hand Surgery*, 35(7), 1142-1145.
- Kartika, N., Sukenda, S., and Nuryati, S. (2022). Monovalent *Mycobacterium fortuitum* oral vaccination on giant gourami (*Osphronemus Goramy*) to prevent mycobacteriosis. *Aquaculture International*, 30, 2775-2791.
- Kato, G., Kondo, H., Aoki, T., and Hirono, I. (2010). BCG vaccine confers adaptive immunity against *Mycobacterium* sp. infection in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(2), 133-40.
- Kato, G., Kakazu, T., Yamada, D., Lau, L. M., Nakajima, K., Sato, S., and Sano, M. (2019). Granulomatous inflammation in gibel carp *Carassius auratus langsdorfii* against *Mycobacterium gordonae*. *Developmental and Comparative Immunology*, 91, 93-100.
- Kawakami, K., and Kusuda, R. (1990). Efficacy of rifampicin, streptomycin and erythromycin against experimental *Mycobacterium* infection in cultured yellowtail. Nippon Suisan Gakkaishi. *Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries*, 56, 51-53.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Thierer, T., Ashton, B., and Meintjes, P. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Keller, C., Wenker, C., Jermann, T., Hirschi, R., Schildger B., Meier, R., and Schmidt-Posthaus, H. (2018). Piscine mycobacteriosis - Involvement of bacterial species and reflection in pathology. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 160(6), 385-393.
- Kent, M. L., Whipps, C. M., Matthews, J. L., Florio, D., Watral, V., Bishop-Stewart, J. K., Bermudez, L. (2004). Mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities.

- Kim, S. H., and Shin, J. H. (2018). Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, *hsp65*, and *rpoB*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(1), e22184.
- Koh, W. J. (2017). Nontuberculous mycobacteria-overview. Schlossberg D. (Ed.). In *Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. Seventh edition* (s. 39, 655-660). Washington, DC: ASM Press: ASM Press.
- Korun, J., Olgac, V., Akgun-Dar, K., Colorni, A., and Diamant, A. (2005). Mycobacteriosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., cultured in Turkey. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57, 215-222.
- Kothavade, R. J., Dhurat, R. S., Mishra, S. N., and Kothavade, U. R. (2013). Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32, 161-188.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547.
- Kurokawa, S., Kabayama, J., Fukuyasu, T., Castillo, C. S., Hikima, J., and Jung, T. (2013). Bacterial classification of fish-pathogenic mycobacterium species by multigene phylogenetic analyses and MALDI biotyper identification system. *Marine Biotechnology*, 15, 340-348.
- Kušar, D., Zajc, U., Jenčič, V., Ocepek, M., Higgins, J., Žolnir-Dovč, M., and Pate, M. (2017). Mycobacteria in aquarium fish: results of a 3-year survey indicate caution required in handling pet-shop fish. *Journal of Fish Diseases*, 40(6), 773-784.
- Kusunoki, S., and Ezaki, T. (1992). Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(2), 240-5.
- Lahey, T. (2003). Invasive *Mycobacterium marinum* infections. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 1496-1498.
- Lansdell, W., Dixon, B., Smith, N., and Benjamin, L. (1993). Isolation of several *Mycobacterium* species from fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5, 73-76.
- Lescenko, P., Matlova, L., Dvorska, L., Bartos, M., Vavra, O., Navratil, S., Pavlik, I. (2003). Mycobacterial infection in aquarium fish. *Veterinarni Medicina*, 48, 71-78.
- Lewis, S., and Chinabut, S. (2011). Mycobacteriosis and Nocardiosis. P. Woo, and D. Bruno (Eds.). In, *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd Edition* (pp. 397-416). Oxfordshire UK: CABI.
- Linell, F., and Norden, A. (1954). *Mycobacterium balnei*, a new acid-fast bacillus occurring in swimming pools and capable of producing skin lesions in humans. *Acta tuberculosea Scandinavica. Supplementum*, 33, 1-84.
- Maboni, G., Prakash, N., and Moreira, M. A. (2023). Review of methods for detection and characterization of non-tuberculous mycobacteria in aquatic organisms. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10406387231194619.
- Mainous, M., and Smith, S. (2005). Efficacy of common disinfectants against *Mycobacterium marinum*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17, 284-288.

- McNabb, A., Eisler, D., Adie, K., Amos, M., M., Rodrigues, M., Stephens, G., Black, W. A., and Isaac-Renton, J. (2004). Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3000-3011.
- Miliner, R. A., Stottmeier, K. D., and Kubica, G. P. (1969). Formaldehyde: a photothermal activated toxic substance produced in Middlebrook 7H10 medium. *American Review of Respiratory Disease*, 99, 603-607.
- Mugetti, D., Varello, K., Gustinelli, A., Pastorino, P., Menconi, V., Florio, D., and Prearo M. (2020). *Mycobacterium pseudoshottsii* in Mediterranean fish farms: new trouble for European aquaculture? *Pathogens*, 9(8), 610.
- Muktar, Y., and Tesfaye, S. (2016). Present status and future prospects of fish vaccination: a review. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 7, 299.
- Narendrakumar, L., Sudhagar, A., Preena, P. G., Nithianantham, S. R., Mohandas, S. P., and Swaminathan, T. R. (2022). Detection of *Mycobacterium marinum* and multidrug-resistant bacteria in a chronic progressive disease outbreak among Siamese fighting fish (*Betta splendens*) in India. *Biologia*, 1-9.
- Noga, E. (2010). *Fish disease: diagnosis and treatment Second Edition* (s. 55, 204-208). Iowa 50014-8300, USA: Wiley Blackwell.
- Noga, E., Wright, J., and Pasarell, L. (1990). Some unusual features of mycobacteriosis in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Comparative Pathology*, 102(3), 335-344.
- Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., and Pavlik, I. (2004). Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Veterinary Medicine*, 49, 343-358.
- Ong, C. S., Ngeow, Y. F., Yap, S. F., and Tay, S. T. (2010). Valuation of PCR-RFLP analysis targeting *hsp65* and *rpoB* genes for the typing of mycobacterial isolates in Malaysia. *Journal Of Medical Microbiology*, 59(11), 1311-1316.
- Pala, S. ve Yılmaz, E. (2020). Ordu ili'nde (Türkiye) akvaryum sektörünün durumu, sorunları ve çözüm önerileri. *Acta Aquatica Turcica*, 16(3), 387-395.
- Parisot, T. (1958). Tuberculosis of fish. *Bacteriological reviews*, 22, 240-245.
- Pasnik, D. J., and Smith, S. (2005). Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine for *Mycobacterium marinum* in fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 103, 195-206.
- Pereira, A., Ramos, B., Reis, A., and Cunha, M. (2020). Non-tuberculous mycobacteria: molecular and physiological bases of virulence and adaptation to ecological niches. *Microorganisms*, 8(9), 1380.
- Petrini, B. (2006). *Mycobacterium marinum*: Ubiquitous agent of waterborne granulomatous skin infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25, 609-613.
- Phung, T., Caruso, D., Godreuil, S., Keck, N., Vallaeys, T., and Avarre, J. (2013). Rapid detection and identification of nontuberculous mycobacterial pathogens in fish by using high-resolution melting analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 7837-7845.
- Ponpornpisit, A., Areechon, N., Kono, T., Kitao, Y., Sakai, M., Katagiri, T., and Endo, M. (2009). Detection of Mycobacteriosis in guppy, *Poecilia reticulata*, by loop-mediated isothermal amplification method. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 29, 3-9.

- Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., and Woods, G. L. (2017). Mycobacteria. In *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Seventh edition* (s. 19,1791-1865). Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health.
- Puk, G., and Guz, L. (2020). Occurrence of *Mycobacterium spp.* in ornamental fish. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 27(4), 535-539.
- Rhodes, M. W., Kator, H., Kaattari, I., Gauthier, D., Vogelbein, W., and Ottinger, C. A. (2004). Isolation and characterization of mycobacteria from striped bass *Morone saxatilis* from the Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1-2), 41-51.
- Rhodes, M. W., Kator, H., Kotob, S., van Berkum, P., Kaattari, I., Vogelbein, W. K., Ottinger, C. A. (2003). *Mycobacterium shottsii* sp. nov., a slowly growing species isolated from Chesapeake Bay striped bass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 421-424.
- Richter, M., and Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 53, 1582-1587.
- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J. L., and Pierre-Audigier, C. (1999). *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 852-857.
- Riopel, N. D., Wood, K., and Stokes, W. (2023). Disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection secondary to an indwelling catheter in an immunocompetent host. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 32, 100373.
- Ross A. J. (1960). *Mycobacterium salmoniphilum* sp. nov. from salmonid fishes. *American Review of Respiratory Disease*, 81,241-250.
- Ross, A. J. and Brancato, F. P. (1959). *Mycobacterium fortuitum* Cruz from the Tropical fish *Hyphessobrycon innesi*. *Journal of Bacteriology*, 78, 392-395.
- Ross, A. J., Earp, B., and Wood, J. (1959). Mycobacterial infections in adult salmon and steelhead trout returning to the Columbia River basin and other areas in 1957. *United States Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report on Fisheries*, 332-334.
- Runyon, E. (1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Medical Clinics of North America*, 43, 273-290.
- Ryu, Y. J., Koh, W. J., and Daley, C. L. (2016). Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease: clinicians perspectives. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 79(2), 74-84.
- Salati, F., Meloni, M., Fenza, A., Angelucci, G., Colorni, A., and Orrù, G. (2010). A sensitive FRET probe assay for the selective detection of *Mycobacterium marinum* in fish. *Journal of Fish Diseases*, 33, 47-56.
- Sarli, G., Morandi, F., Zanoni, R., Brunetti, B., Mandrioli, L., Florio, D., and Prearo, M. (2005). Comparison of immunohistochemistry and Ziehl-Neelsen for the detection of Mycobacterium infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25, 182-185.
- Sevim, P. (2012). Mersin'de avlanan *Mullus spp.*'de *Mycobacterium spp.* varlığı ve mikrobiyal yükün araştırılması bilimsel doktora tezi Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı. Mersin.
- Seyfahmadi, M., Moaddab, S. R., and Sabokbar, A. (2017). Identification of mycobacteria from unhealthy and apparently healthy aquarium fish using both conventional and PCR analyses of *hsp65* gene. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 47(4), 571-578.

- Shukla, S., Sharma, R., and Shukla, S. K. (2013). Detection and identification of globally distributed mycobacterial fish pathogens in some ornamental fish in India. *Folia Microbiologica*, 58(5), 429-36.
- Shukla, S., Sharma, R., and Kumar, A. (2014). Identification of Mycobacterium species from apparently healthy freshwater aquarium fish using partial sequencing and PCR-RFLP analysis of heat shock protein (*hsp65*) gene. *Journal of Applied Ichthyology*, 30(3), 513-520.
- Sin, E., Pseudos, G., and Marcos, L. A. (2019). *Mycobacterium marinum* Tenosynovitis following steroid injection in an avid seaman from Long Island, New York. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(6), 1193.
- Slany, M., Makovcova, J., Jezek, P., Bodnarova, M., and Pavlik, I. (2014). Relative prevalence of *Mycobacterium marinum* in fish collected from aquaria and natural freshwaters in central Europe. *Journal of Fish Diseases*, 37(6), 527-33.
- Smith, P. A., Elliott, D. G., Bruno, D. W., and Smith, S. A. (2019). Mycobacteriosis. Smith S. A. (Ed.). In, *Fish Diseases and Medicine* (s. 5, 112-114). Boca Raton, Florida: Taylor and Francis Group, LLC.
- Spickler, A. R., and Dvorak, G. D. (2020). Piscine Mycobacteriosis *The Center for Food Security and Public Health*. Retrieved from. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>.
- Stamm, L., Morisaki, J., Gao, L., Jeng R. L., McDonald K. L., Roth R., Takeshita S., Heuser J., Welch M. D., and Brown E. J. (2003). *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *Journal of Experimental Medicine*, 198(9), 1361-1368.
- Stavri, H., Brănuaru-Gheorghiu, M., Moldovan, O., Raileanu, M., Popa, M. I., Popa, L., and Ene, L. (2005). Rapid immunochromatographic serum assay of nontuberculous mycobacterial infections. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*, 9, 42.
- Stinear, T., Jenkin, G., Johnson, P., and Davies, J. (2000). Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence. *Journal of Bacteriology*, 182, 6322-6330.
- Stoskopf, M. (1993). Bacterial diseases of freshwater tropical fishes. In *Fish Medicine*, 1.st. (pp. 559-561). North Carolina: Saunders Company.
- Streit, M., Böhlen, L. M., Hunziker, T., Zimmerli, S., Tschärner, G. G., Nievergelt, H., and Braathen, L. R. (2006). Disseminated *Mycobacterium marinum* infection with extensive cutaneous eruption and bacteremia in an immunocompromised patient. *European Journal of Dermatology*, 16(1), 79-83.
- Swift, S., and Cohen, H. (1962). Granulomas of the skin due to *Mycobacterium balnei* after abrasions from a fish tank. *New England Journal of Medicine*, 267(24), 1244-1246.
- Talaat, A., Reimschuessel, R., and Trucksis, M. (1997). Identification of mycobacteria infecting fish to the species level using polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Veterinary Microbiology*, 58(2-4), 229-237.
- Talaat, A., Reimschuessel, R., and Wasserman, S. S., Trucksis M. (1998). Goldfish, *Carassius auratus*, a novel animal model for the study of *Mycobacterium marinum* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 66(6), 2938-42.
- Tamura, K., and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512-526.
- Tanghe, A., Denis, O., Lambrecht, B., Motte, V., Van Den Berg, T., and Huygen, K. (2000). Tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85A is immunogenic and protective when

- administered by intramuscular needle injection but not by epidermal gene gun bombardment. *Infection and Immunity*, 68, 3854-3860.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E. C., and Bodmer, T. (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 175-178.
- Teska, J. D., Twerdok, E. L., Beaman, J., Curry, M., and Finch, A. R. (1997). Isolation of *Mycobacterium abscessus* from Japanese medaka. *Journal of Aquatic Animal Health*, 9, 234-238.
- Thompson, J., Higgins, D., and Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Timur, G., Urku, C., Canak, Ö., Genc Erkose, G., and Erturan, Z. (2015). Systemic mycobacteriosis caused by *Mycobacterium marinum* in farmed meagre (*Argyrosomus regius*), in Turkey. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, IJA_67.2015.1162, 8 pp.
- Tissera, K. (2010). Global Trade in Ornamental Fish 1998 to 2007. In *International Aqua Show* (p. 7). Kerala, India: Cochin.
- Tolon, T. ve Emiroglu, D. (2014). Akvaryum balıkları pazar yapısı ve tüketici tercihlerinin değerlendirilmesi. 1. *Ulusal Akvaryum Balıkçılığı ve Sorunları Çalıştayı Sonuç Raporu Antalya*, 119-124
- Tolon, M. T. (2020). Akvaryum balıkları uluslararası ticareti. Tolon, M. T. ve Yücel, B. (Eds.), *Tarım bilimleri ve su ürünlerinde vizyonel çalışmalar* (10,131-152). Ankara: Akademisyen Kitabevi A.Ş.
- Toranzo, A., Magarinos, B., and Romalde, J. (2005). A review of the main bacterial fish disease in mariculture systems. *Aquaculture*, 246, 37-61.
- Toranzo, A. E., Romalde, J. L., Magariños, B., and Barja, J. L. (2009). Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Options Méditerranéennes*, 86, 155-176.
- Tortoli, E. (2010). Standard operating procedure for optimal identification of mycobacteria using 16S rRNA gene sequences. *Standards in Genomic Sciences*, 3, 145-152.
- Tortoli, E. (2014). Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 727-752.
- Tortoli, E., Fedrizzi, T., Meehan, C., Trovato, A., Grottola, A., Giacobazzi, E., Serpini, G. F., Tagliazucchi, S., Fabio, A., Bettua, C., Bertorell, and Cirillo, D. (2017). The new phylogeny of the genus *Mycobacterium*: the old and the news. *Infection, Genetics and Evolution*, 56, 19-25.
- Tortoli, E. (2018). Commentary: phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2065.
- Tsai, M., Wang, P., Yoshida, S., Aono, A., and Mitarai, S. (2019). Establishment of loop-mediated isothermal amplification for rapid and convenient detection of *Mycobacterium marinum* complex. *Journal of Microbiological Methods*, 164, 105671.
- Turenne, C. (2019). Nontuberculous mycobacteria: Insights on taxonomy and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 72, 159-168.
- Türkmen, G. ve Alpbaz, A. (2001). Türkiye’ye ithal edilen akvaryum balıkları ve sonuçları üzerine araştırmalar. *Erciyes Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 18(3-4), 483-493.

- Ucko, M., and Colorni, A. (2005). *Mycobacterium marinum* infections in fish and humans in Israel. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 892-895.
- Uma, A., and Ronald, B. S. (2016). Drug resistance in *Mycobacterium fortuitum* isolated from gold fish, *Carassius auratus*. *International Journal of Science, Environment*, 5, 4411-4417.
- Urku, C., Genc, G. E., Wittwer, F., Erturan, Z., and Pfyffer, G. (2018). Mycobacteriosis in farmed sea bream (*sparus aurata*) caused by *Mycobacterium frederiksbergense* in Turkey. *Acta Veterinaria-Beograd*, 68(4), 391-400.
- Vaerewijck, M., Huys, G., Palomino, J., Swings, J., and Portaels, F. (2005). Mycobacteria in drinking water distribution systems: Ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 911-934.
- Van der Sar, A., Abdallah, A., Sparrius, M., Reinders E., and Bitter, W. (2004). *Mycobacterium marinum* strains can be divided into two distinct types based on genetic diversity and virulence. *Infection and Immunity*, 72(11), 6306-6312.
- Van Ingen, J., Blaak, H., and de Beer, J. (2010). Rapidly growing nontuberculous mycobacteria cultured from home tap and shower water. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), 6017-9.
- Van Ingen, J. (2015). Microbiological diagnosis of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Clinics in Chest Medicine*, 36(1):43-54.
- Von Betegh, L. (1910). More reviews on experimental tuberculosis of marine fish. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 153, 54.
- Watral, V., and Kent, M. (2007). Pathogenesis of *Mycobacterium spp.* in zebrafish (*Danio rerio*) from research facilities. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145(1), 55-60.
- Whipps, C. M., Dougan, S. T., and Kent, M. L. (2007a). *Mycobacterium haemophilum* infections of zebrafish (*Danio rerio*) in research facilities. *FEMS Microbiology Letters*, 270, 21-26.
- Whipps, C., Butler, W., Pourahmad, F., Watral, V., and Kent, M. (2007b). Molecular systematics support the revival of *Mycobacterium salmoniphilum* (ex Ross 1960) sp. nov., nom. rev., a species closely related to *Mycobacterium chelonae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2525-2531.
- Whipps, C., Gauthier, D., and Kent, M. (2020). Fish Mycobacteriosis. Woo P, Leong J. A, and. Buchmann K. (Eds.). In, *Climate Change and Infectious Fish Diseases* (pp. 265-275). Oxfordshire UK: CABI.
- Whittington, R., and Chong, R. (2007). Global trade in ornamental fish from an Australian perspective: the case for revised import risk analysis and management strategies. *Preventive Veterinary Medicine*, 81(1), 92-116.
- Yardımcı, H. (2006). Mycobacterium İnfeksiyonları. N. Aydın, ve J. Paracıkoğlu (Eds.), *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)* (s. 87-107). Ankara: İlke-Emek Matbaacılık ve Yayıncılık.
- Yüce, A. (2003). Nontüberkuloz mikobakteri infeksiyonlarının klinik önemi. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu*. Samsun.
- Zanoni, R. G., Florio, D., Fioravanti, M. L., Rossi, M., and Prearo, M. (2008). Occurrence of *Mycobacterium spp.* in ornamental fish in Italy. *Journal of Fish Diseases*, 31, 433-441.
- Zeeli, T., Samra, Z., and Pitlik, S. (2003). Ill from eel? *Lancet Infectious Diseases*, 3(3), 168.

- Zhang, D., Ji, C., Zhang, X., Li T. T., Li A. H., and Gong X. N. (2015). Mixed mycobacterial infections in farmed sturgeons. *Aquaculture Research*, 46(8), 1914-1923.
- Ziklo, N., Colorni, A., Gao, L. Y., Du, S. J., and Ucko, M. (2018). Humoral and cellular immune response of european seabass *Dicentrarchus labrax* vaccinated with heat-killed *Mycobacterium marinum*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 30, 312-324.





T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Tarih/Sayı:16/10/2020/57

Karar No 2020-10

ETİK KURUL RAPORU

Kurulumuza 16/10/2020 tarihinde başvurusu yapılan Prof. Dr. Ertan Emek ONUK'un yürütücüsü bulunduğu " Samsun ilinde akvaryum balıklarında mikrobakteriyel türlerin dağılımlarının belirlenmesi" konusundaki araştırma projesi kurulun 21/10/2020 tarihli oturumunda değerlendirilmiştir.

Karar: Projenin yürütülmesi uygun görülmüştür.

Üye

Dr.Nesrihan Urmancı

Üye

Ahı Kayalarlı Acartürk

Üye

Kemal Gürkan Kütük

Başkan

Dr. Erdem Saka

Üye

Sirhan PİR

Üye

Serdar Odacı

Üye

Adem ÖZTÜRK

Üye

Ayşegül DAL TABAĞ

ÖZ GEÇMİŞ

İlker HANCI Samsun Veteriner Sağlık Meslek Lisesi'ni 1995 yılında bitirdikten sonra Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 23.06.2001 tarihinde mezun oldu. 26.07.2018 tarihinde OMÜ SBE Su Ürünleri Hastalıkları (Tezli) Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programını bitirdi. 2018 yılında OMU LEE Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Sucul Hayvan Hastalıkları doktora programına başladı. Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsünde Veteriner Hekim olarak görev yapan İlker HANCI iyi derecede İngilizce (YDS:83,75) bilmektedir. Temel ilgi alanları, satranç ve kitap okumaktır. 01.11.2023

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0003-1031-6263.

Yayınlar:

1. Hanci, I. ve Onuk, E. E. (2016). Balıkların başlıca bakteriyel zoonozları. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 27 (2): 123-130.
2. Hanci, I. ve Onuk, E. E. (2018). *Lactococcus garvieae* izolatlarının antimikrobiyal direnç profillerinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 29(2), 94-103.
3. Demirbaş, E., Aktaş, C., Kaydu, V., Aksoy, E., Hanci, I., Tekay, Ü. O., ve Onuk, E. E. (2023). *Yersinia ruckeri* izolatlarında biyofilm oluşumunun ve bazı virulens faktörlerinin belirlenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 34(1), 81-88.
4. Hanci, I. ve Onuk, E. E. Phenotypic and genotypic determination of antimicrobial resistance profile for *Lactococcus garvieae* isolates. 5th International VETistanbul Group Congress, 74 pp. 23-27 Eylül 2018, Ohrid, Makedonia. Oral Presentation.
5. Hanci, I ve Onuk, E. E. First detection of *Mycobacteroides abscessus* from discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) in Samsun, Turkey Third International Congress on Biological and Health Sciences 185 pp.14-16 April 2023 Online Poster Presentation.