



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI (VETERİNER) ANABİLİM DALI

***YERSİNİA RUCKERİ* İZOLATLARININ
GENOTİPLENDİRİLMESİNDE PCR TABANLI DNA
FİNGERPRİNTİNG TEKNİKLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI
ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seda KÖSTERELİ

**Samsun
Ocak-2019**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI (VETERİNER) ANABİLİM DALI

**YERSİNİA RUCKERİ İZOLATLARININ
GENOTİPLENDİRİLMESİNDE PCR TABANLI DNA
FİNGERPRİNTİNG TEKNİKLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI
ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seda KÖSTERELİ

**Danışman
Doç. Dr. Ertan Emek ONUK**

**Samsun
Ocak-2019**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Seda KÖSTERELİ tarafından Doç. Dr. Ertan Emek ONUK danışmanlığında hazırlanan “*Yersinia ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde PCR tabanlı DNA fingerprinting tekniklerinin karşılaştırmalı analizi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 15/01/2019 tarihinde yapılan sınav ile Su Ürünleri Hastalıkları (Veteriner) Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Soner ALTUN, Uludağ Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Ertan Emek ONUK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....
Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, tez konusunun seçilmesinde ve çalışmaların yürütülmesinde büyük katkısını gördüğüm tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ertan Emek ONUK'a, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ ve Doç. Dr. Banu YARDIMCI'ya destekleri için sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.18.012 proje numarası ile desteklenmiştir.

ÖZET

***YERSİNİA RUCKERİ* İZOLATLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİNDE PCR TABANLI DNA FİNGERPRINTİNG TEKNİKLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden elde edilmiş olan *Y. ruckeri* izolatlarının tiplendirilmesinde farklı PCR tabanlı DNA fingerprinting metodlarını değerlendirmektir.

Materyal ve Metot: Gökkuşuğu alabalıklarından izole edilmiş on sekiz *Y. ruckeri* izolatı ERIC2 primerinin kullanıldığı enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR metodu, P5, P6 ve M13 primerlerinin kullanıldığı randomly amplified polymorphic (RAPD) DNA-PCR metodu ve (GTG)5 primerinin kullanıldığı (GTG)5-PCR metodu ile karakterize edildi.

Bulgular: Test edilen tüm primerlerin doğru bir analiz için kullanılabilir amplifikasyon ürünü oluşturduğu belirlendi. Kluster ve ayırım gücü analizi sonuçlarına göre, *Y. ruckeri*'nin moleküler tiplendirmesi için en uygun primerin ERIC2 primeri olduğu, bunu P5, P6, M13 ve (GTG) 5 primerinin takip ettiği belirlendi.

Sonuç: ERIC-PCR DNA fingerprinting metodu *Y. ruckeri*'nin epidemiyolojik sürveyansının belirlenmesinde güçlü bir genotipik araç olarak düşünülebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: ERIC-PCR; (GTG)5-PCR; Moleküler tiplendirme; RAPD-PCR; *Y. ruckeri*

ABSTRACT

COMPARATIVE ANALYSIS OF PCR-BASED DNA FINGERPRINTING TECHNIQUES IN THE GENOTYPING OF *YERSINIA RUCKERI* ISOLATES

Aim: The aim of the present study was to evaluate different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing *Y. ruckeri* isolates from different geographic region of Turkey.

Material and Method: Eighteen *Y. ruckeri* isolates obtained from rainbow trout were characterized by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR with ERIC2 primer, randomly amplified polymorphic (RAPD) DNA-PCR with P5, P6 and M13 primer and (GTG)5-PCR with (GTG)5 primer.

Results: It was determined that all the primers tested generated an appropriate pattern of amplified products suitable for accurate analysis. Based on the results of cluster analysis and discriminant function analysis, ERIC2 primer was found to be the most suitable primer for molecular typing of *Y. ruckeri*, followed by P5, P6, M13, and (GTG)5 primer.

Conclusion: In conclusion, the ERIC-PCR DNA fingerprinting method can be considered as a powerful genotypic tool for epidemiological surveillance of *Y. ruckeri*.

Keywords: ERIC-PCR; (GTG)5-PCR; Molecular typing; RAPD-PCR; *Y. ruckeri*

SİMGELER VE KISALTMALAR

PFGE	: Pulsed field jel elektroforezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
ERIC	: Enterobacterial repetitive intergenic consensus
cm	: Santimetre
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
AP PCR	: Arbitrarily primed PCR
REP-PCR	: Repetitive extragenic palindromic PCR
MLVA/VNTR	: Multiple-locus variable number tandem repeat analizi
MLST	: Multi locus sekans analizi
RAPD	: Random amplified polymorphic DNA
(GTG)₅	: Politrinükleotid
µl	: Mikrolitre
sn	: Saniye
mM	: Milimol
µM	: Mikromol
ng	: Nanogram
U	: Ünite
pmol	: Pikomol
ml	: Mililitre
dk	: Dakika

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Etiyoloji	2
2.2. Klinik Tablo.....	4
2.3. Bulaşma	5
2.4. Teşhis.....	6
2.5. Kontrol ve Tedavi	7
2.6. Bakterilerde Tiplendirme.....	8
2.6.1. DNA Amplifikasyonuna Dayanan Tiplendirme Metotları	9
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1. Materyal.....	12
3.2. Metot.....	13
3.2.1. İzolatların DNA Ekstraksiyonu	13
3.2.2. İzolatlar Arası Genetik İlişkinin Belirlenmesi	13
4. BULGULAR	16
4.1. İzolatların DNA Ekstraksiyonu	16
4.2. İzolatlar Arası Genetik İlişkinin Belirlenmesi	16
5. TARTIŞMA	24
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	28
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	34

1. GİRİŞ

Nüfusun ve beslenme sorunlarının hızla arttığı dünyada, zengin bir protein kaynağı olan su ürünlerine olan talep giderek artmaktadır. Su ürünleri stoklarından ekonomik ve sürekli olarak yararlanmak için kaynakların korunarak üretiminin devamlılığının sağlanması gerekmektedir. Bu nedenle yetiştiricilik yoluyla mevcut su ürünleri üretiminin artırılmasına yönelik çalışmalar, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde giderek yoğunluk kazanmaktadır (Türel, 2002). Ülkemizde de su ürünleri sektörü hızlı bir gelişim sürecine girmiş ve yetiştiricilik yoluyla elde edilen ürün miktarı 2017 yılı verilerine göre 276 bin 502 tona ulaşmıştır. Bu üretim hacmi içerisinde en yüksek yetiştiriciliği yapılan balık türü ise 109 bin 657 ton'luk üretim ile hem iç sularda hem de dış sularda yetiştiriciliği yapılan alabalık olmuştur (GTHB, 2018).

Su ürünleri sektöründe yaşanan gelişim sürecini engelleyen faktörlerin başında meydana getirdikleri ekonomik kayıplar ile infeksiyöz hastalıklar gelmektedir. Ülkemiz su ürünleri sektöründe en sık görülen bakteriyel kökenli hastalıklardan birisi de *Yersinia ruckeri*'nin neden olduğu yersinyozis veya enterik kırmızı ağız adı ile bilinen hastalıktır.

Bakteriyel tiplendirme yöntemleri ile infeksiyöz hastalıklarının epidemiyolojileri, salgınların kökenleri, seyri, patogenezi ve bakteri genetiği gibi alanlarda faydalı bilgiler edinilebilmektedir. "DNA parmak izi" oluşturmayı hedefleyen moleküler tiplendirme yöntemleriyle, epidemiyolojik olarak ilişkili olan aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır. İzolatların kökenleri aynı mı, farklı mı? sorusuna yanıt aranmaktadır (Durmaz, 2008).

Bu tez çalışması ile PCR tabanlı farklı DNA fingerprinting metotları kullanılarak; Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan *Y. ruckeri* izolatlarının aralarındaki genetik ilişkilerin belirlenmesinde metotların etkinlikleri karşılaştırılmalı olarak ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçların bu hastalıkla mücadele ve korunma stratejilerinin geliştirilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Y. ruckeri; özellikle salmonid balıkların yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açan yersinyozis veya “enterik kırmızı ağız” (Enteric Red Mouth) olarak bilinen hastalığının etiyolojik ajanıdır (Tobback ve ark., 2007). Hastalık ilk defa 1950’li yıllarda Amerika’nın Idaho eyaletinin Hagerman vadisindeki gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde yüksek mortalite ile seyreden septisemik bir hastalık olarak rapor edilmiş ve 1966 yılında Ross ve ark., tarafından tam olarak tanımlanmıştır (Horne ve Barnes, 1999). Hastalık etkeni Ewing ve ark. (1978), tarafından ilk izolasyonu yapan Rucker’e ithafen *Y. ruckeri* olarak isimlendirmişlerdir.

Hastalık başlıca salmonid balıklarda görülmesine rağmen diğer balık türlerini de etkilemektedir (Horne ve Barnes, 1999). Günümüzde oldukça yaygın bir dağılıma sahip olan hastalık Kuzey Amerika, Avustralya, Güney Afrika ve Avrupa’da görülmüştür (Tobback ve ark., 2007). Türkiye’de ise *Y. ruckeri* ilk defa İzmir’de gökkuşağı alabalık yetiştiriciliği yapılan bir işletmeden 1990 yılında Çağırğan ve Yürekli Türk tarafından izole edilmiştir (Çağırğan ve Yürekli Türk, 1991).

Y. ruckeri’nin konakçı aralığı sadece balıklar ile sınırlı değildir. Etkenin aynı zamanda misk faresi (*Ondatra zibethicus*), kerkenez (*Falco* spp.), deniz martıları (Laridae), kaplumbağalar (*Cheloniidae*) ve insanlardan izole edildiğine dair bildirimler bulunmaktadır (Farmer ve ark., 1985; Willumsen, 1989; Tobback ve ark., 2007). Bu gibi çok sayıda rapor, *Y. ruckeri*’nin geniş bir konakçı aralığına ve coğrafi dağılıma sahip olduğunu ve hem epizootilere hem de zoonoz hastalıklara neden olabileceğini göstermektedir (Kumar ve ark., 2015).

2.1. Etiyoloji

Enterobacteriaceae familyası içerisinde yer alan *Yersinia* genusuna mensup türler, Gram-negatif, çubuk şeklinde, fakültatif anaerobik bir özellik göstermekte olup, insanlar, balıklar dahil olmak üzere birçok omurgalı hayvanda hastalığa neden olmaktadır (Kumar ve ark., 2015). *Y. ruckeri* 1950’lerde Amerika Birleşik Devletleri Idaho, Hagerman vadisinde gökkuşağı alabalıklarından tanımlanmıştır (Ross ve ark., 1966).

Y. ruckeri’nin serotip, biyotip ve dış membran protein tipine göre farklı suşları bildirilmiş ve kategorilendirilmiştir. En yaygın olarak Davies (1990) tarafından

bildirilen metot kullanılmaktadır. Buna göre spesifik antiserum ile O antijeni reaksiyonuna dayanılarak O1, O2, O5, O6 ve O7 olmak üzere 5 farklı serotipi tanımlanmıştır. İlerleyen dönemde 1993 yılında tiplendirme şemaları güncellenmiş ve türler farklı alt grupları içeren dört serotipe ayrılmıştır. Serotip O1, O1a (serovar I) ve O1b (serovar III) olmak üzere iki alt gruba, serotip O2 (serovar II) O2a, O2b ve O2c olmak üzere üç alt gruba ayrılmıştır. Diğer serotipler serotip O3 (serovar V) ve serotip O4 (serovar VI) olarak tanımlanmıştır. Salmonidlerdeki epizootiklerin büyük çoğunluğuna hareketli serotip olan O1a neden olduğu bildirilmiştir (Romalde ve Toranzo, 1993). Ancak son yıllarda Avrupa ve Amerika'da daha önce aşılınmış olan salmonidlerdeki hastalık raporlarının sayısı artmış ve bu salgınların bir kısmının hareketsiz *Y. ruckeri* izolatlarından kaynaklandığı belirlenmiştir (Fouz ve ark., 2006; Arias ve ark., 2007).

Ayrıca *Y. ruckeri* suşlarının hareket ve lipaz salgılama yeteneğine göre farklı bir sınıflandırma daha yapılmıştır. Bu iki özelliğe dayanılarak suşlar iki biyotipe ayrılmıştır. Biyotip 1 içerisinde yer alan suşlar hareket ve lipaz sekresyonu yönünden pozitif iken, biyotip 2 içerisinde yer alan suşlar negatiftir. *Y. ruckeri*, biyokimyasal olarak glikoz-fermentatif, katalaz pozitif, nitrat-redüktif, oksidaz-negatif, β -galaktosidaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz pozitif, hidrojen sülfür (H₂S) ve indol negatiftir (Horne ve Barnes, 1999; Tobback ve ark., 2007). Bununla birlikte *Y. ruckeri* 22 °C'de inkube edildiğinde metil red, sitrat kullanımı pozitif, sitokrom oksidaz ve üreaz negatiftir (Bercovier ve Mollaret, 1984). Genel olarak *Y. ruckeri*'nin biyokimyasal özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Y. ruckeri izolatlarının genetik yapısı ve varyasyonlar, multilokus enzim elektroforezi, pulsed field jel elektroforezi (PFGE), yağ asidi metil ester profilleri, ribotiplendirme gibi moleküler teknikler kullanılarak araştırılmıştır. Tüm bu araştırmalar *Y. ruckeri* O1a suşlarının yüksek düzeyde genetik homojeniteye sahip olduğunu göstermiştir (Schill ve ark., 1984; Huang ve ark., 2013). 16S rRNA dizi analizi, Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR, (GTG)₅-PCR ve Western blot analizlerinin kullanıldığı çalışmalarda ise biyotip 1 ve biyotip 2 suşları arasında genetik ve antijenik farklılıkların bulunduğu ortaya konulmuştur (Arias ve ark., 2007; Tinsley ve ark., 2011).

Tablo 1. *Y. ruckeri*'nin biyokimyasal özellikleri (Horne ve Barnes, 1999'dan).

Özellik	Reaksiyonlar	Enzimatik Özellik	Reaksiyonlar
Adonitol	-	Eskulinaz	-
Arabinoz	-	Arjinin Dehidrolaz	+(%59);+d(%41)
Sellobiyoz	-	Beta-Galaktosidaz	+
Dulsitol	-	Kazeinaz	+(%51)
Eritritol	-	Katalaz	+
Eskulin	-	Kitinaz	-
Galaktoz	-	Kondroitin Sülfataz	-
Glukoz	+	Sitokrom Oksidaz	-
Gliserol	+(%70);+d(%15)	Deoksiribonükleaz	-
İnositol	-	Elastinaz	-
Laktoz	-	Fibrinolaz	-
Maltoz	+	Jelatinaz	+(%52);+d(%41);-(%6)
Mannitol	+	Hyaluronidaz	-
Mannoz	+(%97)	Lesitinaz	+(%81)
Melibiyoz	-	Lipaz: Tween 20	+
Metil Red	+(%79)	Tween 40	+
Mucate	-	Tween 60	+
Rafinoz	-	Tween 80	+(%86)
Ramnoz	-	Tween 85	+(%74)
Salisin	-	Lizin Dekarboksilaz	+(%88)
Sorbitol	+(%25);+d(%75)	Ornitin Dekarboksilaz	+
Nişasta	-	Pektinaz	-
Sukroz	-	Fenilalanin Deaminaz	-
Trehaloz	+(%97)	Fosfataz	-
Ksiloz	-	Ribonükleaz	-
		Tributyrynase	-
Sitrat Kullanımı	+(%3);+d(94);-(%3)	Üreaz	-
KCN'de Büyüme	+(%24)		
Hemoliz	+		
H ₂ S Üretimi	-		
İndol Üretimi	-		
Motilite	+(%82)		
Nitrat İndirgeme	+(%85);+d(%12);-(%3)		
Nitrit İndirgeme	-		

+: pozitif reaksiyon, d: değişken reaksiyon, -: negatif reaksiyon

2.2. Klinik Tablo

Gökkuşluğu alabalıklarında enterik kırmızı ağız hastalığının çoğunlukla 7-10 cm büyüklüğündeki balıkları etkilediği belirtilmektedir. Hastalık yaşlı ve büyük balıklarda daha çok kronik formda ortaya çıkmaktadır. Hastalığın en şiddetli seyrettiği su sıcaklığı

15-18 °C'dir. 10 °C'nin altında hastalığın gözükmediği bildirilmektedir (Busch, 1982; Austin ve Austin, 1987; Horne ve Barnes, 1999). Hastalık salgınları düşük seviyeli ölümlerle başlamakta zamanla bu ölümler devam ederek sonuçta kümülatif olarak yüksek kayıplara (mortalite) neden olmaktadır (Horne ve Barnes, 1999; Tobback ve ark., 2007).

Hastalık akut, subakut ve kronik formlarda seyretmektedir. Akut form daha çok su sıcaklığının aniden yükseldiği ilkbahar döneminde ve genç balıklarda görülmektedir. Hastalık aniden çıkmakla beraber, bazı vakalarda ağızda, yüzgeçlerin tabanında, operkulumlarda ve anüs etrafında eritem görüldüğü bildirilmektedir (Horne ve Barnes, 1999). Deride ve vücudun değişik kısımlarında hemorajiler görülebilmektedir. İç organlarda, peritonda, vücut yağında, gonadlarda ve mezenteriumlarda eritem ve peteşiyel hemorajilere de rastlanılmaktadır. İntestinal organlar genellikle eritemiktir ve kanlı bir mukusla doludur. Dalak ve böbrek şişkindir. Karaciğer soluk renktedir. Kaslarda peteşiler görülebilir (Rucker, 1966, Austin ve Austin, 1987; Bullock ve Cipriano, 1990).

Subakut vakalar da akut vakalara benzerlik gösterir, ama hastalık belirtileri daha şiddetlidir. Ayrıca tek veya çift taraflı ekzoftalmus görülebilir. Böbrek ve dalak daha şişkindir ve genel eritem görülebilmektedir (Post, 1987).

Kronik vakalar akut veya subakut vakalardan daha farklıdır. Hasta balıklarda kısmi veya tam körlük şekillenebilmektedir. Derinin rengi iyice koyulaşmıştır. Hasta balıklar su yüzeyinde halsiz (letarjik) ve düzensiz bir şekilde yüzerler. Bazılarında abdomen gergin ve şişkin, bazılarında içine çekik olabilir. Yüzgeçlerin tabanında, ağızda ve operkulumlarda eritem görülebilir. Visera etrafında seröz sıvı birikimi ve genel eritem olabilmekte fakat hemoraji görülmemektedir. Böbrekler şişkin ve dalak büyümüştür. Karaciğer genellikle soluk renktedir (Busch, 1982; Austin ve Austin, 1987; Post, 1987).

2.3. Bulaşma

Y. ruckeri enfeksiyonları enfekte ve enfekte olmayan balıklar arasında doğrudan temas yoluyla bulaşabilir. *Y. ruckeri* enfeksiyonlarda taşıyıcı durumda olan balıklar önem taşımaktadır. Şöyleki taşıyıcı balıklar stres altında kaldığında enfeksiyonu yayabilmektedirler. Örneğin, taşıyıcı balıkların yaşadığı ortamdaki su sıcaklığı 25 °C'ye yükseltildiğinde klinik olarak sağlıklı balıklara *Y. ruckeri* aktardığı gözlemlenmiştir.

Ancak stres altında olmayan taşıyıcı balıklardan hiçbir aktarım gerçekleşmemiştir. Bakterinin dışkıyla saçılması bulaşmada önemli bir rol oynamaktadır ve *Y. ruckeri* konakçı dışında en az 4 ay yaşayabilmektedir (Tobback ve ark., 2007; Kumar ve ark., 2015). Yapılan bir çalışmada Gökkuşuğu alabalıklarında *Y. ruckeri* enfeksiyonundan 45 gün sonra dahi populasyonun % 25'inin, bağırsağının son bölümünde herhangi bir klinik tablo görülmeden etkeni taşıdığı belirlenmiştir (Busch ve Lingg, 1975).

Akuatik ortamlardaki sediment ve havuz, tank vb yüzeylerdeki bakterilerin hayatta kalmasında en önemli etmen biyofilm formasyonudur (Kumar ve ark., 2015). Coquet ve ark., (2002), balık işletmelerinde kullanılan tanklarda sıklıkla bulunan katı destekler üzerinde biyofilm oluşturabilen bir *Y. ruckeri* suşu izole etmişlerdir. Ayrıca *Y. ruckeri*'nin yayılması su omurgasızları ve kuşları içerisine alan olası vektörler ile ilişkilendirilmektedir (Kumar ve ark., 2015).

2.4. Teşhis

Hastalığın tanısında klinik belirtiler, bakteriyel izolasyon-identifikasyon ve histopatolojik bulgular önemlidir (Busch, 1982; Austin ve Austin, 1987). Gram negatif bakterilerin neden olduğu septisemilere benzerlik göstermesi nedeniyle klinik belirtiler ve otopsi bulgularına bakılarak hastalığın kesin teşhisi yapılamamaktadır. Klinik ve patolojik bulgular önem taşımakla beraber kesin tanı için hastalıklı organlardan etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılmalıdır.

Y. ruckeri rutin bakteriyolojik besiyerlerinin çoğunda ürer. Bakteriyolojik ekimler için genellikle Tryptic Soy Agar, Nutrient Agar, Walltman&Shotts, Rimler-Shotts Agar, Brain Heart Infusion Agar kullanılmaktadır (Walltman ve Shotts, 1984; Rodgers, 1992). 20-25 °C'de 24-48 saat inkubasyondan sonra gözle görülebilen koloniler oluşmaktadır (Horne ve Barnes, 1999). Etken identifikasyonu amacıyla şüpheli kolonilerden alınan bakteriler biyokimyasal testlere tabi tutulur. *Y. ruckeri* suşları genel olarak biyokimyasal reaksiyonlarda homojen karakter gösterirler. Ama metil red, voges-proskauer, lizin dekarboksilaz, arjinin hidrolaz ve laktoz fermentasyon testlerinde suşlar farklılık gösterebilmektedirler (Austin ve ark., 1982; Green ve Austin, 1983).

Hastalığın, genelde akut formda yüksek mortalite ve morbidite oranıyla seyretmesi hastalıktan kaynaklanan ekonomik kayıpları arttırmakta, bu nedenle teşhiste hızlı ve spesifik metotların kullanılma gerekliliğini arttırmaktadır. PCR metodu

geleneksel mikrobiyolojik metotlara alternatif olarak oldukça geniş bir kullanım alanı sunmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada Gibello ve ark. (1999), *Y. ruckeri* suşu ile deneysel olarak enfekte edilmiş ya da doğal olarak enfekte olmuş, alabalıklarda etkenin PZR yöntemi ile identifikasyonunun daha güvenli olacağını ve klasik kültür metotlarına nazaran daha kısa sürede sonuç vereceğini bildirmişlerdir. Lejeune ve Rurangirwa (2000) ile Altinok ve ark. (2001) da *Y. ruckeri*'nin teşhisi için PCR denemeleri yapan diğer araştırmacılar olarak literatüre girmişlerdir.

2.5. Kontrol ve Tedavi

Genel olarak hastalığın önlenmesi ve kontrolü iyi idare veya yönetim uygulamaları ve aşılama ile sağlanmaktadır. Klinik yersiniozis hastalığı stres ile ilişkili bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle hastalığın hali hazırda bulunduğu bölgelerde, hastalığın şiddetinin, stresin azaltılması, su kalitesinin kontrol edilmesi, uygun beslenme ve iyi sağlık uygulamalarının sürdürülmesi ile azaltılabileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte hastalığın önlenmesi için etkeni bulundurmeyen stokların alınması, stokların aşılması ve/veya aşılansız stokların alınması ve yüksek riskli dönemlerde yemlemenin azaltılması önerilmektedir (Furones ve ark., 1993).

Balıklarda bakteriyel patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlarda çoğu zaman enfeksiyon sonrası tedavi, antibiyotik kullanımına dayanmaktadır. Yersiniozis'in tedavisinde de oksolonik asit (10 gün boyunca günlük 10 mg/kg) ve oksitetrasiklin (10 gün boyunca günlük 50-75 mg/kg) gibi antibakteriyellerin kullanılabileceği bildirilmiştir (Furones ve ark., 1993). *Y. ruckeri*, çeşitli antibiyotiklere duyarlı olmasına rağmen, birçok antimikrobiyal bileşiğe karşı direnç kazandığı çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda *Y. ruckeri* izolatlarının antibiyotiklere karşı değişken oranda direnç kazandığı ortaya konulmuştur (Kırkan ve ark. 2000; Akşit ve Kum, 2008; Akaylı ve ark. 2013). Altun ve ark. (2013) tarafından, gökkuşağı alabalığı kökenli *Y. ruckeri* izolatlarının Türkiye'de balıklarda kullanım için ruhsatlanmış antibiyotiklerden olan florfenikol, oksitetrasiklin ve trimetoprim-sulfamethoxazole karşı direnç geliştirmiş olduklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Balta ve ark. (2016), yersiniozis vakalarında en sık kullanılan antibiyotiklerden oksitetrasiklin'e karşı % 62,8 ve trimetoprim+sulfametoksazol'a karşı % 14,9 direnç şekillendiğini tespit etmiştir. Son yıllarda *Y. ruckeri* izolatlarında antimikrobiyal direncin yayılımında rol oynayan antibiyotik direnç genlerinin varlığını belirlemeye

yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda etkenin *tetA*, *tetB* (Balta ve ark., 2010), *sulII* (Türe ve Alp, 2016), *sulI*, *tetC*, *tetE*, *tetD*, ve *floR* direnç genlerini taşıdığı bildirilmiştir (Duman ve ark., 2017).

Antibiyotik direnç gelişimi ile ilgili kaygılar etkenin kontrolünde alternatif metotlar üzerinde çalışılmasına neden olmuştur. Bu amaçla özellikle probiyotik bakteri ve immunostimulan kullanımı önem kazanmıştır (Toback ve ark., 2007; Kumar ve ark., 2005).

2.6. Bakterilerde Tiplendirme

Bakteriler arasındaki klonal ilişkinin ortaya konulmasıyla epidemik izolatlar, sporadik veya endemik olanlardan ayrılmakta, salgınla ilişkili suşlar belirlemekte; salgının kapsamı, kaynak ve rezervuarı hakkında bilgiler edinilebilmektedir (Durmaz, 2008).

Teorik olarak fenotipik ve genotipik olarak iki ayrı tiplendirme sistemi bulunmaktadır. Fenotipik tiplendirmede kullanılan çeşitli kültür medyumlarındaki koloni morfolojisi, biyokimyasal testler, seroloji, toksin duyarlılığı, patojenite ve antibiyotik duyarlılığı gibi özellikler yakından ilişkili suşlar arasında ayırım yapmak için yeterince çeşitlilik sağlamamaktadırlar. Son zamanlarda, genetik yapısına göre bakteriyel suşların ayırt edilmesi olarak bilinen genotiplendirme, yüksek ayırım gücü nedeniyle bakteriyel suşların genotiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir suşun belirli bir genotiplendirme yöntemiyle elde edilen genetik profili, parmak izi kadar benzersiz olabilir. Bu nedenle, genotiplendirme aynı zamanda DNA parmak izi olarak adlandırılmaktadır (Li ve ark., 2009).

Mevcut bakteriyel tiplendirme metotları; DNA bant modeli, DNA dizi analizi ve DNA hibridizasyon temelli metotlar olmak üzere üç ana kategori altında sınıflandırılabilir. Bu kategorilerden birincisi DNA bant modeline dayanan genotiplendirme metotlarıdır. Bu metotların esasını genomik DNA'nın amplifikasyonu ile veya restriksiyon enzimleri ile DNA'nın kesilmesiyle üretilen DNA bantlarının (fragmanları) boyutlarındaki farklılıklara göre incelenen suşların ayırt edilmesi oluşturur. PFGE ve restriction fragment length polymorphism (RFLP) analizi restriksiyon enzimleri ile kesim esasına dayanan tiplendirme yöntemleridir. Arbitrarily primed PCR (AP-PCR), repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR), multiple-locus variable number tandem repeat analizi (MLVA/VNTR) ise DNA'nın

amplifikasyonuna dayalı tiplendirme yöntemleri içerisinde yer almaktadır (Li ve ark., 2009).

İkinci kategoride DNA dizileme tabanlı genotipleme yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler, hedef bölgenin orijinal nükleotid dizisini üretir ve bakteriyel suşlar arasındaki ayrımı doğrudan DNA'larındaki polimorfizmlerinden yapar. Bu yöntemlerin başlıcaları gen sekans analizi, multi locus sekans analizi (MLST) ve genom sekansı'dır (Li ve ark., 2009).

Üçüncü kategoride DNA hibridizasyon temelli yöntemler yer almaktadır. Bu yöntemler çoğunlukla DNA macroarray ve microarray çalışmaları olarak adlandırılırlar. Bu teknikte, bakteriyel suşlar, DNA'larının bilinen dizilere ait problemler ile hibridizasyon analizi sonucu ayırt edilirler. Genom dizilemesi dışında, genotipleme yöntemlerinin ayırım yeteneği türe bağlıdır (Li ve ark., 2009).

Çalışmalarda uygun genotipleme yönteminin seçilmesi çalışılan hedefe ve metodun tiplendirebilirliğine, tekrarlanabilirliğine, maliyetine, uygulama kolaylığına, yorumlanmasına ve sonuçların elde edilme zamanı gibi çeşitli değişkenlere bağlı olarak değişmektedir. Ek olarak, özellikle yeni genotipleme yöntemlerini değerlendirirken, bakteriyel genotipleme sonuçları her zaman klinik ve epidemiyolojik veriler ışığında analiz edilmelidir (Li ve ark., 2009).

2.6.1. DNA Amplifikasyonuna Dayanan Tiplendirme Metotları

DNA'nın amplifikasyonuna dayalı tiplendirme yöntemlerinde; rastgele seçilmiş veya çoğunlukla kromozom üzerindeki çok sayıda tekrarlayan dizilimleri hedef alan primerler kullanılarak tekrar dizilimlerin aralarında kalan DNA parçalarının çoğaltılması saptanmaktadır. Her şuşa ait çoğaltılmış DNA parçalarının sayısı ve büyüklük farklılıkları elektroforez yardımıyla gösterilerek, şuşlar arasındaki yakınlık derecesi ortaya konulmaktadır. Bu yöntemlerin farklı mikroorganizma gruplarına uygulanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu, kısa sürede sonuç verdiği ve ekonomik olarak uygun oldukları bildirilmektedir. Bununla birlikte elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde standart kriterlerin olmaması bu yöntemlerin kullanımını etkileyen önemli bir faktördür. ERIC-PCR, REP-PCR, random amplified polymorphic DNA (RAPD), AP-PCR, BOX-PCR ve MLVA/VNTR genotiplendirmede kullanılan başlıca DNA amplifikasyonuna dayanan yöntemlerdir (Durmaz, 2008).

AP-PCR, bilinmeyen genomik bölgelerin rasgele primerler kullanılarak amplifiye edilmesine dayanan PCR'in klasik bir varyasyonudur (Li ve ark., 2009). RAPD yöntemi rastgele bir DNA segmentinin rastlantısal olarak seçilmiş bir nükleotid sekansı ile PCR ile amplifiye edilmesine dayanmaktadır (Fidanboylu, 2010). Bu nedenle AP-PCR aynı zamanda RAPD-PCR olarak da adlandırılmaktadır (Li ve ark., 2009). RAPD uygulamasında 9-10 baz uzunluğunda kısa rastgele nükleotid diziler (primer) kullanılmaktadır. Bu primerler düşük annealing sıcaklığında kromozomal DNA'ya hibridize olarak bakteriyel genom üzerindeki bölgelerin en azından amplifikasyonu başlatmak için kullanılabilirler. Bu rastgele primer bölgelerinin sayısı ve konumu bakteriyel bir türün farklı suşlarına göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle, amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile ayrılmasından sonra bakteriyel bir suş için karakteristik olan bir bant modeli elde edilir (Olive ve Bean, 1999).

Bu yöntemler ile elde edilen sonuçlar seçilen primerlere ve amplifikasyon koşullarına göre değişmekte, laboratuvar içi veya laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik oranlarında farklılıklar görülmektedir. Dolayısıyla bu yöntemlerin en büyük dezavantajı henüz standardizasyonun sağlanamamış olmasıdır. Bu sorunların giderilmesi için test protokolünün DNA ekstraksiyonundan başlayarak sabit tutulması gerekmektedir. Laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlamak için, M13 olarak bilinen universal primer'in kullanılması önerilmektedir (Durmaz, 2008). Bununla birlikte kullanıma hazır RAPD analiz boncuklarının (Ready-To-Go RAPD analysis beads) RAPD analizinde standardizasyon ve optimizasyonun sağlanmasında yararlı olabileceği bildirilmektedir (Li ve ark., 2009)

Bakteriyel genomlar içerisinde doğal olarak bulunan bir dizi tekrarlanan DNA sekansı bulunmaktadır. Bu sekanslar genom üzerinde çok sayıda kopya halinde dağılmış bir şekilde yerleşmiştir. Bu dağınık tekrarlanan DNA elementlerinin fonksiyonları hala bilinmemekle birlikte, bunların varlığı bakterilerin DNA parmak izlerinin ortaya konulması için kullanışlı parametrelerdir (Li ve ark., 2009). Bu metotlarda kullanılan primerler tekrarlanan DNA dizilimlerinin komplementeridir ve bu primerler kullanılarak, tekrarlar arasında kalan DNA parçalarının amplifikasyonu yapılmaktadır. Tekrarlanan elementlerinin sayısı ve yerleşimindeki farklılıklar, bakteriyel türe özgü bant profilini oluşturmaktadır. Tekrarlanan dizilimlerin dört grubu tanımlanmıştır. Bunlar:

REP dizilimler, ERIC dizilimler, BOX dizilimler ve politrinükleotid (GTG)₅ dizilimlerdir. Bu tekrarlayan dizilimlere dayalı beş ayrı (REP-PCR, ERIC1-PCR, ERIC2-PCR, BOX-PCR ve (GTG)₅-PCR) rep-PCR uygulaması vardır ve bu yöntemler değişik bakteri gruplarının tiplendirilmesinde kullanılmaktadır (Durmaz, 2008). Bu tekrarlayan dizilimler içerisinde REP ve ERIC sekansları tiplendirmede en yaygın kullanılan dizilimlerdir. BOX elementlerinin REP ve ERIC dizilimleri ile sekans ilişkisi bulunmamaktadır (Olive ve Bean, 1999).

MLVA analizi, kromozom üzerindeki tekrarlanan DNA'nın birçok bölgesinde gözlenen kalıtsal değişimlerin gösterilmesi esasına dayanır. Çok sayıda lokus analiz edildiğinde, her lokustaki tekrar birimlerinin sayısına göre tiplendirilen suş için rakamsal bir formül oluşturulmaktadır. Bu yöntemin dezavantajları; dizi analiz sistemi veya fragment analizöre gereksinim duyması, tekrarlanan DNA'daki değişimlerin epidemiyolojik verilerle uyumsuzluğa yol açabilecek derecede hızlı olabilmesidir (Durmaz, 2008).

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

Çalışmada Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan 18 adet Gökkuşığı alabalığı kökenli *Y. ruckeri* saha izolatu kullanıldı (Tablo 2). Çalışmadan önce gliserinli buyyon (%15) içerisinde -20 °C'de saklanan izolatlar Trypticase soy broth'a (Merck, Almanya) pasajlanarak 25 °C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan *Y.ruckeri* saha izolatları, izolasyon yerleri ve tarihi

No	İzolatlar	İzolasyon Yeri		İzolasyon Yılı
1	Dersu BD	Antalya	Akdeniz	2017
2	Aşağı Gökdere BD	Isparta	Akdeniz	2015
3	15 SA	Isparta	Akdeniz	?
4	17 SA	Isparta	Akdeniz	1998
5	27 SA	Bolu	Karadeniz	1997
6	Y1 EO	Samsun	Karadeniz	2007
7	Y2 EO	Samsun	Karadeniz	2007
8	Y3 EO	Samsun	Karadeniz	2007
9	Y4 EO	Samsun	Karadeniz	2007
10	YK BD	İzmir	Ege	2015
11	18/1 SA	Denizli	Ege	1991
12	18/2 SA	Denizli	Ege	1995
13	28 SA	Manisa	Ege	1998
14	35 SA	Denizli	Ege	1996
15	35/1 SA	Denizli	Ege	1996
16	36 SA	Yalova	Marmara	1998
17	5 SA	Adapazarı	Marmara	1996
18	6 SA	Kırıkkale	İç Anadolu	1997

3.2. Metot

3.2.1. İzolatların DNA Ekstraksiyonu:

İzolatların DNA ekstraksiyonları prensibi spin kolon ile filtrasyon esasına dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Invitrogen, Kanada) kullanılarak yapıldı. Buna göre izolatların bir gecelik subkültürlerinden 1 ml alındı (yaklaşık 2×10^9 hücre) ve hücreler santrifüj edilerek toplandı. Elde edilen pelet 180 µl PureLink® Genomik Digestion Buffer içerisinde süspanse edildi ve üzerine 20 µl proteinaz K eklendi. Süspansiyon homojen hale gelinceye kadar vorteks ile karıştırıldı. Karışım hücreler lize oluncaya kadar 55 °C’de 30 dk süre ile su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra üzerine 20 µl RNase A eklendi ve vorteksenerek 2 dk oda ısısında bekletildi. İnkübasyon sonrasında 200 µl PureLink® Genomik Lysis/Binding buffer eklenerek homojen bir hale gelinceye kadar vortekslendi. Elde edilen karışımın üzerine 200 µl % 96-100’lük etanol eklendi ve yaklaşık 10 sn homojen bir solüsyon elde edilinceye kadar vortekslendi. Hazırlanmış olan lizat PureLink® Spin kolonu içerisine aktarıldı ve 10000xg’de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta yer alan koleksiyon tüpleri atıldı ve spin kolonlarına yeni koleksiyon tüpleri takıldı. Sonrasında kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu 1 eklendi. Kolon 10000xg’de 1 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki kolon tekrar atıldı ve yeni koleksiyon tüpü takıldı ve kolon’a 500 µl yıkama tamponu 2 eklendi. Kolon 15000xg’de 3 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki kolon atıldı ve DNase-RNase içermeyen mikrotüp üzerine konulan koleksiyon tüpüne 100 µl elüsyon buffer eklendi. Kolon 2 dk süre ile oda ısısında inkübe edildikten sonra 8000xg’de 1 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen DNA’ların konsantrasyonları Nanodrop (Thermo) ile 260 nm’de ölçüldü. İzolatlara ait DNA konsantrasyonları genotiplendirme çalışmalarında kullanılmak üzere 15 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Sonrasında DNA’lar PCR çalışmalarında hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.2.2. İzolatlar Arası Genetik İlişkinin Belirlenmesi:

İzolatlar arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde 3 farklı PCR tabanlı DNA fingerprinting tekniği kullanıldı. Bu metotlarda kullanılan primerlerin *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla öncelikle rastgele 7 izolat seçildi ve aşağıda bildirilen primerler ile reproducible

(üretken) bant verip vermedikleri belirlendi. Üretken bant elde edilemeyen primerler çalışmadan çıkartıldı. Bu aşamada seçilen primer ve/veya primerler diğer izolatların genotiplendirilmesinde kullanıldı. Her bir genotiplendirme metodunda PCR master mix'in oluşturulmasında içeriğinde 0,05 U/µl Taq DNA polymerase, reaction buffer, 4 mM MgCl₂, 0,4 mM her bir dNTP (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) bulunan 2×PCR master mix'i (Thermo) kullanıldı. Böylece herbir teknik için tüm değişkenler sabitlendi. Her bir fingerprinting tekniği için 60 ng template DNA, 8 pmol primer (2 µl), 12,5 µl 2×PCR master mix ve distile sudan oluşan toplam 25 µl PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Sonraki amplifikasyon aşamaları ise araştırmacılar tarafından bildirilen koşulların veya modifikasyonları kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası elde edilen ürünler etidium bromid (2µg/ml) içeren %1,5'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında Jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

Oluşan bant paternlerinin dendogramları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) ile, CHEF-DR® III, Quantity One® yazılımı (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kullanılarak çizildi. Analizlerin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla rastgele 7 izolat seçildi ve analizler arka arkaya 3 kez tekrarlandı. İzolatlar arasındaki genetik yakınlık % 90 benzerlik katsayısına göre hesaplandı.

Y.ruckeri izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılan PCR tabanlı DNA fingerprinting teknikleri ve bu tekniklerde kullanılan primerler aşağıda verildi.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR: Bu metotta random primer olarak M13 (GAG GGT GGC GGT TCT), P5 (AAC GCG CAA C) ve P6 (CCC GTC AGC A) primerleri kullanıldı (Grundmann ve ark., 1997; Mancuso ve ark., 2007).

M13 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR'da oluşturulan PCR master mix'i 94°C'de 5 dk ön denatürasyon ve sonrasında 94°C'de 1 dk denatürasyon, 50°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 2dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

P5 ve P6 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR'da oluşturulan PCR master mix'i 95°C'de 5 dk ön denatürasyon ve sonrasında 95°C'de 1 dk denatürasyon, 35°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 2dk uzama olmak üzere 30 siklus ve 72°C'de 10 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR: Bu metoda ERIC2 (AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G) primeri kullanıldı (Versalovic ve ark., 1991). ERIC2 primerinin kullanıldığı ERIC-PCR’da oluşturulan PCR master mix’i 95°C’de 7 dk ön denatürasyon ve sonrasında 94°C’de 1 dk denatürasyon, 52°C’de 1 dk primer bağlanma, 65°C’de 8 dk uzama olmak üzere 30 siklus ve 65°C’de 16 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

(GTG)5-PCR: Bu metoda GTG5 (5’-GTG GTG GTG GTG GTG-3’) primeri kullanıldı (Huang ve ark., 2013). (GTG)5 primerinin kullanıldığı (GTG)5-PCR’da oluşturulan PCR master mix’i 95°C’de 7 dk ön denatürasyon ve sonrasında 94°C’de 1 dk denatürasyon, 52°C’de 1 dk primer bağlanma, 65°C’de 8 dk uzama olmak üzere 30 siklus ve 65°C’de 16 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

4. BULGULAR

4.1. İzolatların DNA Ekstraksiyonu:

Çalışmada kullanılan izolatlardan ticari DNA ekstraksiyon kiti ile elde edilen DNA'ların konsantrasyonu Nanodrop (Thermo Scientific) ile ölçüldü. Elde edilen bulgular Tablo 3'de sunuldu.

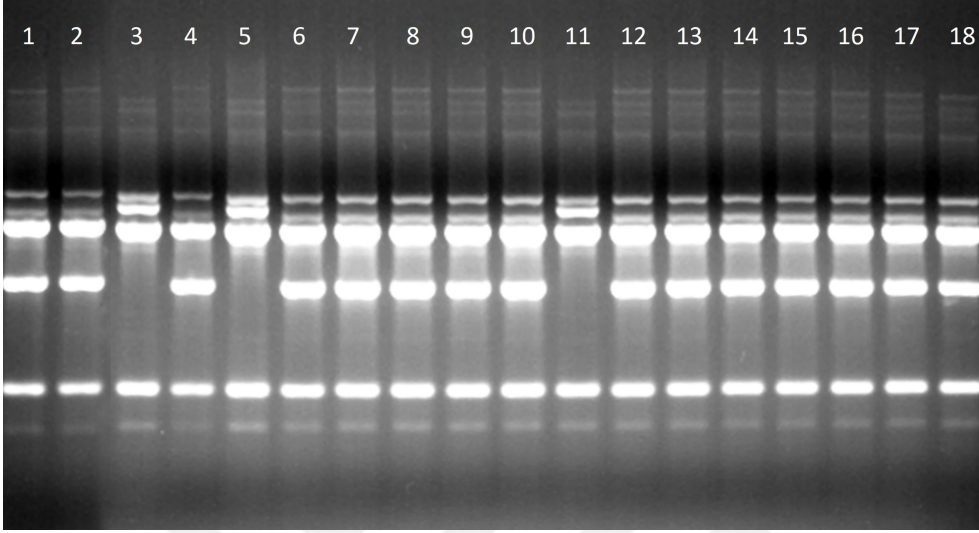
Tablo 3. Çalışmada kullanılan izolatlardan elde edilen DNA'ların konsantrasyonları

No	İzolatlar	Nükleik Asit Konsantrasyonu	Birim
1	Dersu BD	29,6	ng/μl
2	Aşağı Gökdere BD	72,1	ng/μl
3	15 SA	192,4	ng/μl
4	17 SA	238	ng/μl
5	27 SA	366,3	ng/μl
6	Y1 EO	71,8	ng/μl
7	Y2 EO	45,5	ng/μl
8	Y3 EO	251	ng/μl
9	Y4 EO	316,7	ng/μl
10	YK BD	85,4	ng/μl
11	18/1 SA	390	ng/μl
12	18/2 SA	339	ng/μl
13	28 SA	51,7	ng/μl
14	35 SA	183,1	ng/μl
15	35/1 SA	201,5	ng/μl
16	36 SA	256,8	ng/μl
17	5 SA	177,7	ng/μl
18	6 SA	206,4	ng/μl

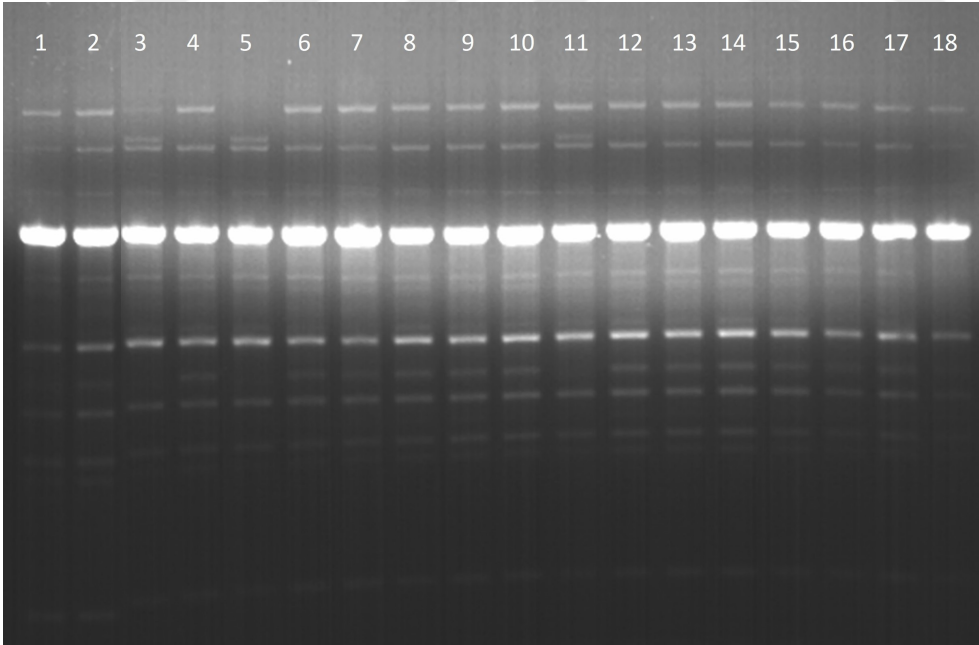
4.2. İzolatlar Arası Genetik İlişkinin Belirlenmesi:

Y. ruckeri izolatları arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde PCR tabanlı DNA fingerprinting metotlarında kullanılan primerlerin rastgele seçilen 7 izolatının kullanıldığı ön denemede üretken bant paterni verdiği saptandı. Sonraki aşamada ise denemeler bütün izolatlar kullanılarak tekrar edildi.

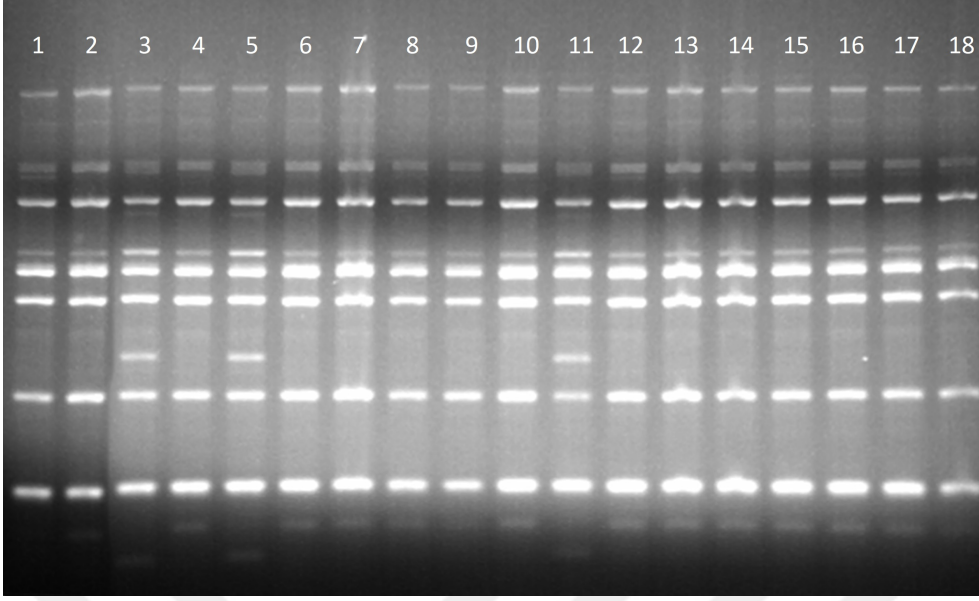
Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR: Bu metotta M13, P5 ve P6 primerlerinin kullanılması ile izolatların sergiledikleri bant paternleri Şekil 1, 2 ve 3'de verildi.



Şekil 1. M13 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR analizinde elde edilen elektroforez görüntüsü. 1-18; *Y. ruckeri* saha izolatları



Şekil 2. P5 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR analizinde elde edilen elektroforez görüntüsü. 1-18; *Y. ruckeri* saha izolatları

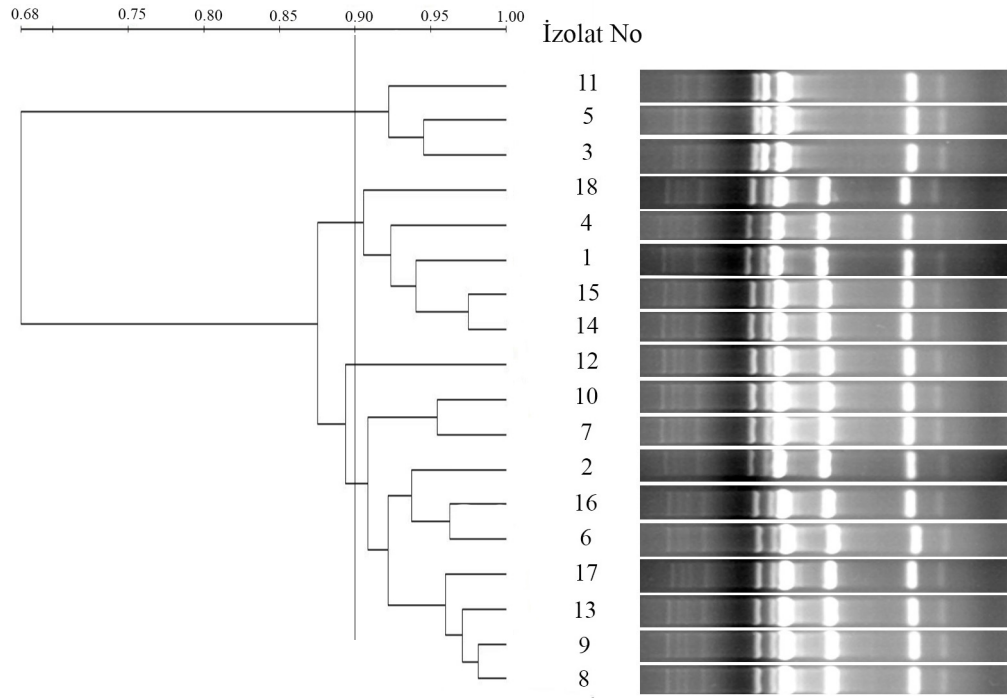


Şekil 3. P6 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR analizinde elde edilen elektroforez görüntüsü. 1-18; *Y. ruckeri* saha izolatları

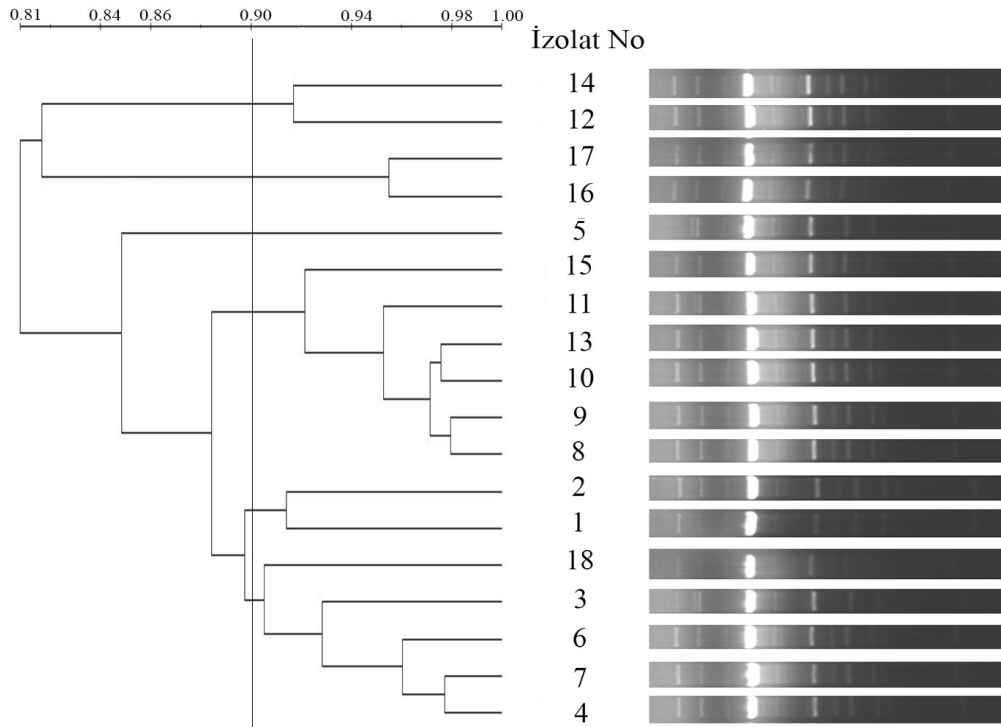
Y.ruckeri izolatlarının M13 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre bir tekli (unique) tip ve 3 küme içerisinde olmak üzere toplam 4 farklı genotip (M1, M2, M3 ve M4) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. Bu genotiplerin sırasıyla 3, 5, 1 ve 9 izolat içerdiği, M4 no'lu genotipin baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 4). Testin ayırım gücü (Discriminatory Power) 0.6797 olarak hesaplandı. Testin tekrarlanabilirliği % 100 olarak belirlendi.

Y.ruckeri izolatlarının P5 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre bir tekli (unique) tip ve 5 küme içerisinde olmak üzere 6 genotip (P5a, P5b, P5c, P5d, P5e ve P5f) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. P5d no'lu genotipin içerdiği 6 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 5). Testin ayırım gücü 0.817 olarak hesaplandı. Testin tekrarlanabilirliği % 100 olarak belirlendi.

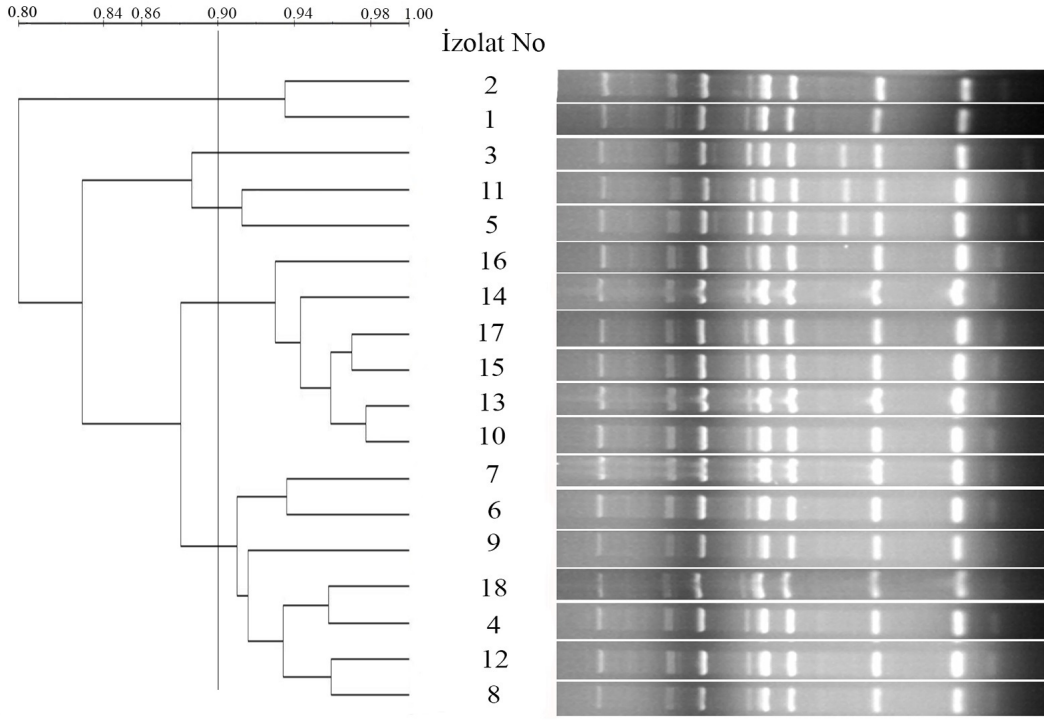
Y.ruckeri izolatlarının P6 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre bir tekli (unique) tip ve 4 küme içerisinde olmak üzere toplam 5 genotip (P6a, P6b, P6c, P6d ve P6e) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. P6e no'lu genotipin içerdiği 7 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 6). Testin ayırım gücü 0.7516 olarak hesaplandı. Testin tekrarlanabilirliği % 100 olarak belirlendi.



Şekil 4. *Y. ruckeri* izolatlarının M13 primeri ile sergiledikleri RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

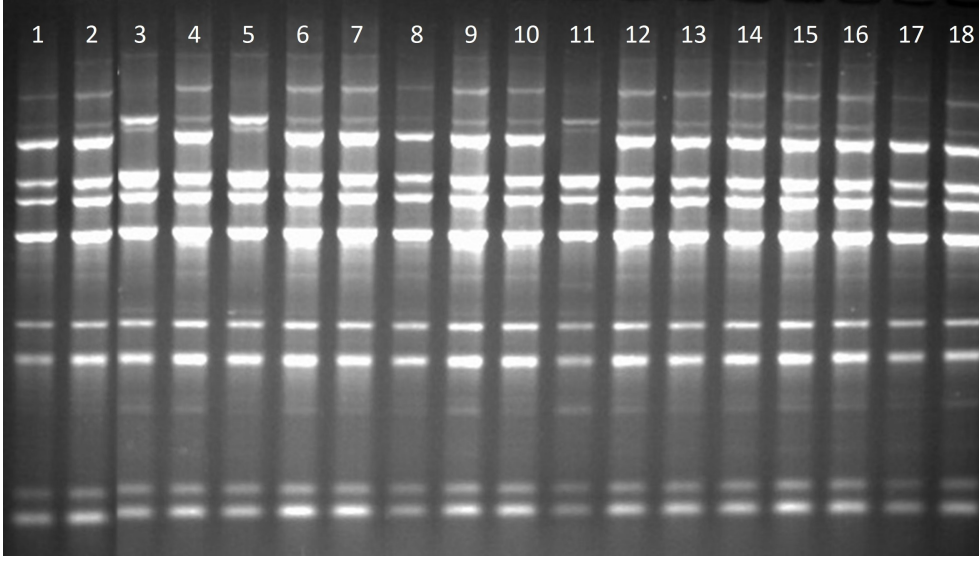


Şekil 5. *Y. ruckeri* izolatlarının P5 primeri ile sergiledikleri RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

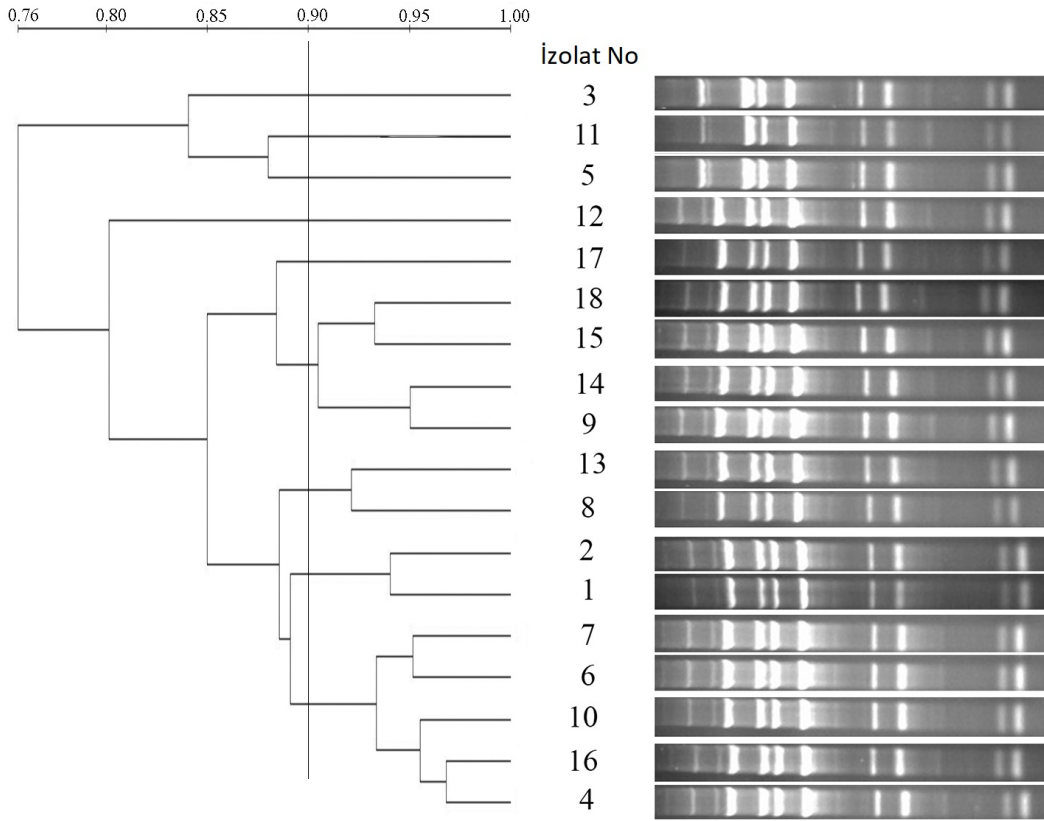


Şekil 6. *Y. ruckeri* izolatlarının P6 primeri ile sergiledikleri RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR: Bu metotta ERIC2 primerinin kullanılması ile izolatların sergiledikleri bant paternleri Şekil 7’de verildi. *Y. ruckeri* izolatlarının ERIC2 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre beş tekli (unique) tip ve 4 küme içerisinde olmak üzere toplam 9 genotip (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 ve E9) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. E9 no’lu genotipin içerdiği 5 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 8). Testin ayırım gücü 0.8824 olarak hesaplandı. Testin tekrarlanabilirliği % 100 olarak belirlendi.

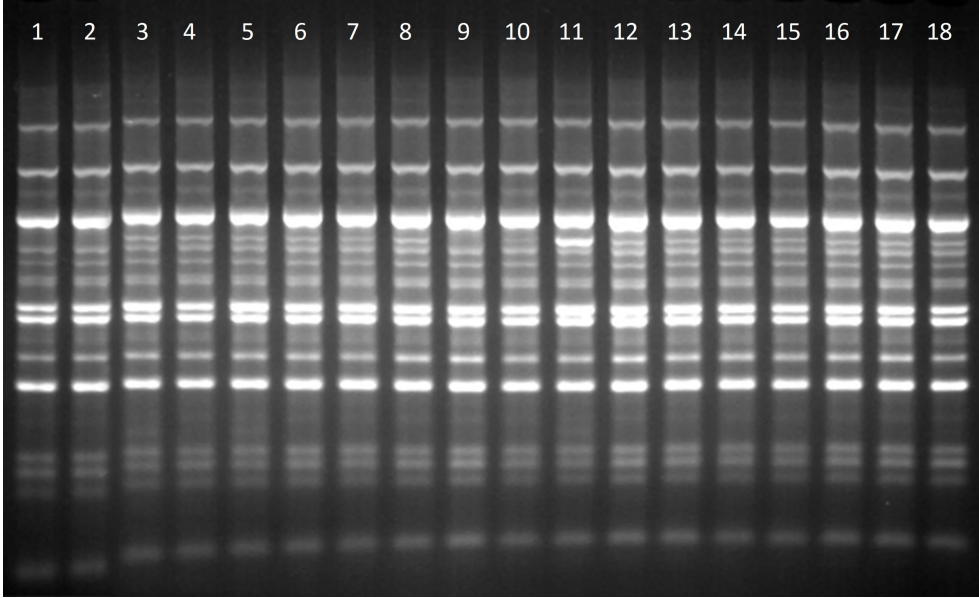


Şekil 7. ERIC2 primerinin kullanıldığı ERIC-PCR analizinde elde edilen elektroforez görüntüsü. 1-18; *Y. ruckeri* saha izolatları

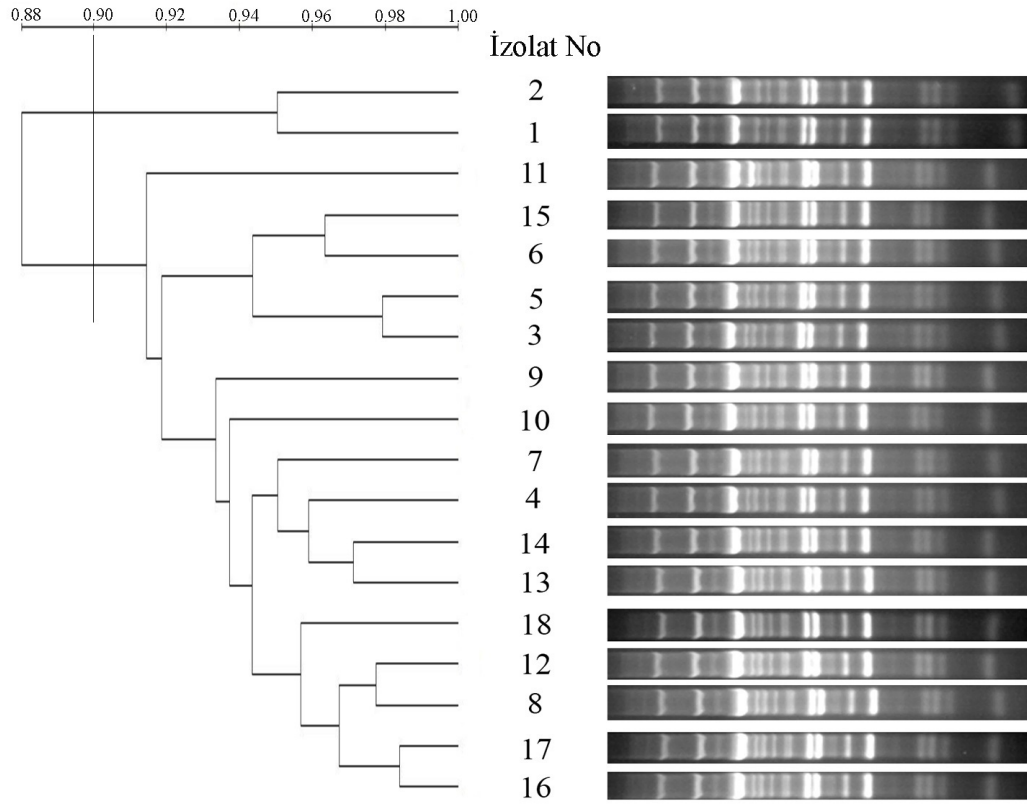


Şekil 8. *Y. ruckeri* izolatlarının ERIC2 primeri ile sergiledikleri ERIC-PCR bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

(GTG)5-PCR: Bu metotta (GTG)5 primerinin kullanılması ile izolatların sergiledikleri bant paternleri Şekil 9’da verildi. *Y. ruckeri* izolatlarının (GTG)5 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre 2 genotip (G1 ve G2) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. G2 no’lu genotipin içerdiği 16 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 10). Testin ayırım gücü 0.2092 olarak hesaplandı. Testin tekrarlanabilirliği % 100 olarak belirlendi.



Şekil 9. (GTG)5 primerinin kullanıldığı (GTG)5-PCR analizinde elde edilen elektroforez görüntüsü. 1-18; *Y. ruckeri* saha izolatları



Şekil 10. *Y. ruckeri* izolatlarının GTG5 primeri ile sergiledikleri (GTG)5-PCR bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

5. TARTIŞMA

Y. ruckeri, Yersiniozis veya “Enteric Red Mouth Disease-Enterik Kırmızı Ağız Hastalığı” olarak bilinen, hem tatlı su hem de deniz salmonidlerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olan önemli bakteriyel hastalıklardan biridir (Kumar ve ark., 2015). Hastalık ülkemiz de kültürü yaygın bir şekilde yapılan gökkuşuğu alabalıklarında yaygın olarak görülmektedir (Öztürk ve Altınok, 2014).

Farklı coğrafik yerleşkelerden ya da balık türlerinden izole edilmiş olan bakteriyel patojenlerin karakterizasyonu için, tür içinde güvenilir markırlar bulmak amacıyla çok çeşitli tiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. Önceleri izolatların biyokimyasal ve serolojik test sonuçlarını içeren fenotipik özelliklerine dayanılarak yapılan tiplendirme çalışmaları (Davies ve Frerichs, 1989; Romalde ve ark., 1993), ilerleyen yıllarda yerini moleküler yöntemlerin ön plana çıktığı çalışmalara bırakmıştır. Fenotipik metotlara oranla genotipik metotlar ile daha güvenilir sonuçlar elde edilmesi bu metotların kullanımını arttıran başlıca faktör olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte bu metotların en önemli avantajları standardize edildikleri zaman stabil karakter göstermeleri, izolatların tüm farklı polimorfik özelliklerini ortaya koyabilmeleri yani güçlü ayırım yeteneğine sahip olmaları, benzer reagenler, aletler ve prosedürler kullanılarak bakteri, virüs, mantar ve parazitler gibi oldukça farklı mikroorganizma türleri için kullanılabilmesi, ucuz, hızlı, basit ve duyarlı yöntemler olmalarıdır (Köksal, 1999).

Günümüze kadar *Y. ruckeri* izolatlarının moleküler olarak tiplendirilmesinde RAPD-PCR, ERIC-PCR, (GTG)5-PCR, REP-PCR, MLST ve PFGE (Bastardo ve ark., 2011a; Bastardo ve ark., 2012; Altun ve ark., 2013; Huang ve ark., 2013; Duman ve ark., 2017) gibi yöntemler kullanılmıştır. Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalarda kullandıkları yöntemlerin *Y. ruckeri* izolatların tiplendirilmesindeki kullanılabilirliğini ve metotların ayırım güçlerini tekli veya kombine olarak değerlendirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da DNA amplifikasyonuna dayanan tiplendirme metotlarından olan RAPD-PCR, ERIC-PCR ve (GTG)5-PCR’ın izolatların tiplendirilmesinde kullanılabilirliği ve ayırım güçleri karşılaştırılmalı olarak ortaya konulmuştur.

Türkiye’de *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde araştırmacıların genellikle, ERIC-PCR metodunu ve bu metotta ERIC2 primerini kullandıkları görülmektedir. Onuk ve ark. (2011), 97 *Y. ruckeri* izolatının ERIC2 primeri ile

genotiplendirmişler ve % 75 benzerlik katsayısına göre izolatları 6 genotip içerisinde sınıflandırmışlardır. İzolatların % 59,8'inin baskın genotip içerisinde dağıldığını saptamışlardır. Araştırmacılar genel olarak Türkiye'nin farklı bölgelerden elde edilen izolatların bütün genotipler içerisinde dağıldığını ortaya koymuş ve bu durumun balık transferinin yaygın olarak yapıldığının göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Altun ve ark. (2013), 15 *Y. ruckeri* saha izolatu ve 2 referans suşu inceledikleri çalışmalarında ERIC2 primeri ile % 70 benzerlik katsayısına göre izolatları 2 ayrı küme içerisinde gruplamış, kümelerden birincisinin 2 genotip, ikincisinin ise 3 genotip içerdiğini saptamışlardır. Predominant genotip'in 5 izolat (% 29,4) içerdiği belirlenmiştir. Ek olarak izolatlarının coğrafik orjinlerine göre herhangi bir genogrup içerisinde gruplanmadığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada da benzer şekilde genotipler arasında izolatların coğrafik orjinlerine göre herhangi bir sınıflandırma yapılamamıştır. Duman ve ark. (2017), ise Türkiye kökenli 136 *Y. ruckeri* izolatu ERIC2 primeri ile % 72 benzerlik katsayısına göre 4 genogruba ayırmışlar ve izolatların izolasyon yıllarına göre farklı genogruplara dahil olduklarını ortaya koymuşlardır. Ege bölgesinden 2013 yılında izole edilen izolatların diğer izolatlara % 54 oranında benzerlik gösterdiğini, 124 adet izolatu % 90 oranında benzerlik gösterdiklerini, yine 2013 ve 2014 yılında elde edilen izolatların büyük oranda heterojen yapıda olduklarını, 2015 yılında elde edilen izolatların ise daha homojen bir yapıya sahip olduklarını ortaya koymuşlardır.

ERIC-PCR'dan farklı olarak Türkiye'de RAPD-PCR metodunun kullanıldığı başka bir çalışma Özer ve ark. (2008), tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar Mersin ilinden izole ettikleri 24 *Y. ruckeri* izolatu M13 primeri ile genotiplendirmişlerdir. Sonuç olarak izolatlarının tamamının aynı genetik profile sahip olduklarını ortaya koymuşlar ve bu metodun *Y. ruckeri* izolatlarının genetik karakterizasyonunda oldukça kullanılabilir olduğunu ve laboratuvar şartlarına kolayca adapte edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında benzer şekilde M13 primeri ile analiz edilen izolatların 15'inin yüksek düzeyde (% 88 ve üzeri) benzer olduğu belirlenmiştir. Üç izolatu ise (3, 5 ve 11 nolu) farklı bir kümede yer aldığı belirlenmiştir.

RAPD-PCR'da P5 ve P6 primerleri kullanılarak *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak farklı balık patojenlerinde bu primerler kullanılarak izolatlar arası genetik ilişkiler ortaya konulmuştur. Bu çalışmalardan bir tanesinde P5 ve P6 primerleri ile *Tenacibaculum maritimum* izolatları

genotiplendirilmiştir. Çalışmada P5 primeri ile bazı izolatlarda amplifikasyon ürünü elde edilememiştir. Dolayısıyla bu bakterilerin tiplendirilmesinde P5 primeri kullanılamayacağı ortaya konulmuştur. P6 primeri ile ise izolatların konakçı spesifitesine göre kümelere ayrıldığı belirlenmiştir (Avendano-Herrera ve ark., 2004). Diğer bir çalışmada ise P5 ve P6 primerlerinin *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* izolatlarının tiplendirilmesinde kullanılabilir olduğu belirlenmiş ve her iki primer ile yapılan grupta gruplar arasında yaklaşık aynı benzerlik katsayısı elde edilmiştir (Mancuso ve ark., 2007). Ravelo ve ark. (2003), farklı coğrafik bölge ve balık türlerinden izole edilen *Lactococcus garvieae* izolatlarını P5 ve P6 ile 3 geno gruba ayırmışlardır. Alabalıklardan izole edilen İspanya, Portekiz, İngiltere ve Türkiye izolatlarının 1. grupta, yine alabalıklardan izole edilen Fransa ve İtalya suşlarının 2. grupta ve sarıkuyruk balıklarından izole edilen Japon izolatları ile *L. garvieae* NCDO 2155 referans suşun ise 3. grupta kümelendiğini bildirmişlerdir. Foschino ve ark. (2008), *L. garvieae* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede M13 ve P5 primerlerini kullanmışlardır. M13 primerinin en iyi ayırım gücüne sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan P5 ve P6 primerlerinin her ikisi ile de izolatların yeterli düzeyde amplifikasyon ürünü verdiği, dolayısıyla her iki primerin *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılabilir olduğu ortaya konulmuştur. P5 primerinin ayırım gücünün (0.817) P6 primerinden yüksek olduğu belirlenmiştir.

Aşılınmış balıklarda görülen salgınlardan izole edilen *Y. ruckeri* izolatları arasındaki epidemiyolojik ilişkilerin farklı fenotipik ve moleküler tiplendirme metotlarının kombine edilerek kullanıldığı bir polifazik çalışmada, izolatlar ERIC-PCR ve REP-PCR metotları ile karşılaştırmalı olarak genotiplendirilmiştir. Elde edilen amplifikasyon sonuçları her iki yöntemin *Y. ruckeri* izolatlarını ayırt etmede başarılı olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte ERIC-PCR'ın REP-PCR'a oranla ayırım gücünün daha yüksek olduğu ve *Y. ruckeri* izolatlarını daha iyi ayırt ettiği belirlenmiştir (Bastardo ve ark., 2012). Şili ve Peru kökenli *Y. ruckeri* izolatlarının karakterize edildiği çalışmalarda da ERIC-PCR'ın REP-PCR'a oranla daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu ortaya konulmuştur (Bastardo ve ark., 2011a; Bastardo ve ark., 2011b). Benzer şekilde bu tez çalışmasında DNA'nın amplifikasyonuna dayanan tiplendirme metotların karşılaştırılması sonucu ayırım gücü en yüksek olan metodun ERIC-PCR olduğu ve bu metodun hastalığın epidemiyolojisinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Farklı tiplendirme metotlarının karşılaştırılması olarak değerlendirildiği çalışmada Huang ve ark. (2013) Almanya kökenli 83 *Y. ruckeri* izolatını karakterize etmişlerdir. Bu amaçla izolatların genotiplendirilmesinde (GTG)5-PCR, BOX-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR ve PFGE metodunu kullanmışlardır. İzolatlar REP-PCR ile iki, ERIC-PCR ile beş, (GTG)5-PCR ile dört ve BOX-PCR ile üç farklı küme içerisinde gruplandırılmıştır. PFGE metodu ile ise 17 farklı pulsetip elde edilmiştir. Çalışmada REP-PCR'ın 0,048 ile en düşük ayırım gücüne sahip olduğu yani test popülasyonundan rastgele seçilen iki izolatının farklı bir REP-PCR paterni gösterme olasılığının % 4,8 olduğu belirlenmiştir. REP-PCR metodunu sırasıyla BOX-PCR (0.071), (GTG)5-PCR (0.095) ve ERIC-PCR'ın (0.140) takip ettiği belirlenmiştir (Huang ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında ise farklı olarak değerlendirilen tiplendirme metotları arasında en düşük ayırım gücüne (GTG)5-PCR'ın sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç *Y. ruckeri* izolatlarının tiplendirilmesinde (GTG)5-PCR'ın kullanılabilirliğinin düşük olduğunu göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe yaygın olarak görülen ve ekonomik olarak önemli kayıplara neden olan *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde DNA amplifikasyonuna dayanan farklı tiplendirme metotları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu metotlar içerisinde ERIC-PCR ayırım gücü en yüksek metot olarak bulunmuştur. RAPD-PCR'da P5 ve P6 primerleri ilk kez kullanılmış olup her iki primerin *Y. ruckeri* izolatları ile amplifikasyon ürünü verdiği belirlenmiştir. (GTG)5-PCR'ın ise en düşük ayırım gücüne sahip olduğu ve *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde tercih edilmemesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte tez çalışmasında test edilen izolatların genetik olarak homojen bir yapıda olduğu belirlenmiştir.

Moleküler tiplendirme metotlarının epidemiyolojiye uyarlanması ve bakteriler arasındaki klonal ilişkilerin detaylı olarak ortaya konulması ile hastalıkların kapsamı, kaynağı ve rezervuarı hakkında bilgiler edinilebilmektedir. Bu bilgiler ışığında hastalıkla mücadelede etkin stratejiler geliştirilebilmektedir. Ülkemiz su ürünleri sektöründe hastalıkların kontrol altına alınmasında bu tarz çalışmaların bölgesel olarak yaygın bir şekilde devam etmesi ve ulusal veritabanları oluşturulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Akaylı T, Ürkü Ç, Çanak Ö. Kültür gökkuşağı alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'ından izole edilen gram-negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılığı. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 2013;6(2):17-22.
- Akşit D, Kum C. Gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008;19:1-7.
- Altınok I, Grizzle JM, Liu Z. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org* 2001;44:29-34.
- Altun S, Onuk EE, Çiftçi A, Duman M, Büyükekiz AG. Determination of phenotypic, serotypic and genetic diversity and antibiotyping of *Yersinia ruckeri* isolated from Rainbow trout. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 2013;19(2):225-232.
- Arias CR, Olivares-Fuster O, Hayden K, Shoemaker CA, Grizzle JM, Klesius PH. First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the U.S.A. *J Aquat Anim Health* 2007;19:35-40.
- Austin B, Austin DA. *Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish*. 1st Edition, Simon and Schuster, Chichester, UK, 1987;207-224.
- Austin B, Green M, Rodgers CJ. Morphological diversity among strains of *Yersinia ruckeri*, *Aquaculture*, 1982;27:73-78.
- Avendano-Herrera R, Rodríguez J, Magarinos B, Romalde JL, Toranzo AE. Intraspecific diversity of the marine fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* as determined by randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *J Appl Microbiol* 2004;96:871-877.
- Balta F, Balta ZD, Özgümüş OB, Çağırğan H. The Antimicrobial resistance and investigation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in the Eastern Black Sea Region. *J Anatol Environ Animal Sci* 2016;1(3):72-76.
- Balta F, Sandallı C, Kayis S, Ozgumus OB. Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 2010;30(6):211-219.
- Bastardo A, Bohle H, Ravelo C, Toranzo AE, Romalde JL. Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. *Dis Aquat Organ* 2011a;93:207-214.
- Bastardo A, Ravelo C, Romalde JL. Multilocus sequence typing reveals high genetic diversity and epidemic population structure for the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Environ Microbiol* 2012;14(8):1888-1897.

- Bastardo A, Sierralta V, Leon J, Ravelo C, Romalde JL. Phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in Peru. *Aquaculture* 2011b;317:229-232.
- Bercovier H, Mollaret HH. Genus XIV. *Yersinia* Van Loghem 1944 15. AL. In: Krieg NR, editors. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 Baltimore, William Wilkins: 1984;489-506.
- Bullock GL, Stuckey HM, Shotts EB. Enteric red mouth bacterium: Comparison of isolates from different geographical areas. *J Fish Dis* 1978;1:351-356.
- Bullock GL, Cipriano RC. Enteric red mouth disease of salmonids, *Fish Dis Leaflet* 82, 1990.
- Busch RA, Lingg AJ. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can* 1975;32:2429-2432
- Busch RA. Enteric Redmouth Disease. Symposium international de talloires. 10-12 May., Les antigenes des microorganismes pathogenes des poissons. Collection Fondation Marcel merieux. 1982;201-24.
- Coquet L, Cosette P, Junter GA, Beucher E, Saiter JM, Jouenne T. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2002;26:373-378.
- Çağırğan H, Yürekli Türk O. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout in Turkey. Fifth International Conference, Disease of Fish and Shellfish Book of Abstracts 1991;131.
- Davies RL, Frerichs GN. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *J Fish Dis* 1989;12:357-365.
- Davies RL. O-serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates. *Vet Microbiol* 1990;22:299-307.
- Duman M, Altun S, Cengiz M, Saticioglu IB, Buyukekiz AG, Sahinturk P. Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. *Dis Aquat Org* 2017;125:31-44.
- Durmaz R. Bakteri tiplendirme çalışmaları niçin gerekli?, XXXIII. Türk mikrobiyoloji kongresi, İstanbul, Kongre Kitabı, 2008;27-30.
- Ewing WH, Ross AJ, Brenner DJ, Fanning GR. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Red Mouth (RM) Bacterium, *Int J Syst Bacteriol* 1978;28:37-44.

- Farmer JJ 3rd, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1985;21:46-76.
- Fidanboylu A. Gram negatif bakterilerin moleküler tiplendirilmesinde bazı pcr tabanlı yöntemlerin karşılaştırılması. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Yüksek Lisans Tezi, 2010;34.
- Foschino R, Nucera D, Volponi G, Picozzi C, Ortoffi M, Bottero MT. Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. J Appl Microbiol 2008;105(3):652-62
- Fouz B, Zarza C, Amaro C. First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. J Fish Dis 2006;29:339-346.
- Furones MD, Rodgers CJ, Munn CB. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. Annu Rev Fish Dis 1993;3:105-125.
- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Su Ürünleri İstatistikleri. İnternet erişimi: <https://www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf>, Ağustos 2018.
- Gibello A, Blanco MM, Moreno MA, Cutuli MT, Domenech A, Domínguez L, Fernandez-Garaizabal JF. Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. Appl Environ Microbiol 1999;65:346-350.
- Green M, Austin B. The identification of *Yersinia ruckeri* and its relationship to other representatives of the Enterobacteriaceae. Aquaculture, 1983;34:185-192.
- Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn L, Gerner-Smidt P, Mahmer M, Seifert H, Vaneechoutte M. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 1997;35:3071-7.
- Horne MT, Barnes AC. Enteric Red Mouth Diseases (*Yersinia ruckeri*) In: Fish Diseases and Disorders Volume 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections. Ed.: P.T.K. Woo, D.W. Bruno, CAB International, New York, USA. 1999;455-479.
- Huang Y, Runge M, Michael GB, Schwarz S, Jung A, Steinhagen D. Biochemical and molecular heterogeneity among isolates of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in north west Germany. BMC Vet Res 2013;9:215
- Kırkan Ş, Göksoy EO, Kaya O. The isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trouts in

- Aydin region. Journal of Pendik Veterinary Microbiology (Turkey) 2000;31:27-30.
- Köksal F. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin hastane infeksiyonlarında kullanımı. Hastane İnfeksiyonları Derg 1999;3:189-95.
- Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. Vet Res 2015;46:103
- Lejeune JT, Rurangirwa FR. Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. J Vet Diagn Invest, 2000;12:558-561.
- Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS Microbiol Rev 2009;33;892-916.
- Mancuso M, Avendano-Herrera R, Zaccone R, Toranzo AE, Magarinos B. Evaluation of different DNA-based fingerprinting methods for typing *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. Biol Res 2007;39:71-82.
- Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999;37(6):1661-1669.
- Onuk EE, Çiftçi A, Fındık A, Çiftçi G, Altun S, Balta F, Özer S, Çoban AY. Phenotypic and Molecular characterization of *Yersinia ruckeri* isolates from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in Turkey. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2011;124(7-8):320-328.
- Özer S, Bulduklu P, Dönmez E, Koyuncu E, Serin MS, Aslan G, Tezcan S, Aydın E, Emekdas G. Phenotypic and genetic homogeneity of *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (*Walbaum*), in Mersin Province, Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol, 2008;28(3):97-104.
- Öztürk RÇ, Altınok İ. Bacterial and viral fish diseases in Turkey. Turk J Fish Aquat Sci, 2014;14:275-297.
- Post G. Bacterial diseases of fishes, Text Book of Fish Health, T.F.H. Publications, 1987;47-51.
- Ravelo C, Magarinos B, Lopez-Ramade S, Toranzo AE, Romalde JL. Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol 2003;41(2):751-756.
- Rodgers CJ. Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. J Fish Dis 1992;15:243-254.

- Romalde JL, Margarinos B, Barja JL, Toranzo AE. Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri*: proposal for a new intraspecies classification. *Syst Appl Microbiol* 1993;16:411-419.
- Romalde JL, Toranzo AE. Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium. *FEMS Microbiol Lett* 1993;112:291-300.
- Rucker AR. Red mouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull Off Int Epizoot*, 1966;65:825-830.
- Ross AJ, Rucker RR, Ewing WH. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Microbiol* 1966;12:763-770.
- Schill WB, Phelps SR, Pyle SW. Multilocus electrophoretic assessment of the genetic structure and diversity of *Yersinia ruckeri*. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:975-979.
- Tinsley JW, Lyndon AR, Austin B. Antigenic and cross-protection studies of biotype 1 and biotype 2 isolates of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Appl Microbiol* 2011;111:8-16.
- Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish, *J Fish Dis* 2007;30:257-268.
- Türe M, Alp H. Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. *J Vet Res* 2016;60(2):141-146.
- Türel M. Su Ürünleri Yetiştiricilik Alt Sektöründe Planlama. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Yüksek Lisans Tezi, 2002.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nuc Acid Res* 1991;19(24):6823-6831.
- Walltman WD, Jr Shotts EB. Medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*. *Can J Fish Aquat Sci* 1984;41:804-806.
- Willumsen B. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. *J Fish Dis* 1989;12:275-277.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Seda KÖSTERELİ

Doğum Yeri: Trabzon

Doğum Tarihi: 03.05.01990

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Ondokuz Mayıs Üni. Vet. Fakültesi, 2008- 2015, Samsun
Erdoğdu Lisesi, 2004-2007, Trabzon

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

E-posta: kostereli.seda@gmail.com