

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

***YERSİNİA RUCKERİ*'NİN LİPOPOLİSAKKARİT VE DIŞ MEMBRAN PROTEİN  
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Balıkçılık Tek. Müh. Gülşah AKYILDIZ**

**HAZİRAN 2013  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

***YERSİNİA RUCKERİ*'NİN LİPOLİSAKARİT VE DIŞ MEMBRAN PROTEİN**  
**PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Balıkçılık Tek. Müh. Gülşah AKYILDIZ**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**  
**“BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ YÜKSEK MÜHENDİSİ”**  
**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20.05.2013**  
**Tezin Savunma Tarihi : 21.06.2013**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. İlhan ALTINOK**

**Trabzon 2013**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında**  
**Gülşah AKYILDIZ tarafından hazırlanan**

***YERSİNİA RUCKERİ*'NİN LİPOPOLİSAKKARİT VE DIŞ MEMBRAN PROTEİN  
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 04/06/2013 gün ve 1508 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan : Prof. Dr. İlhan ALTINOK**

**Üye : Doç Dr. Erol ÇAPKIN**

**Üye : Doç Dr. Şevki KAYIŞ**



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**

**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans programında yürütülmüş ve TÜBİTAK 110O886 nolu proje tarafından desteklenmiştir. “*Yersinia ruckeri*’nin lipopolisakkarit ve dış membran protein profillerinin belirlenmesi” adlı bu çalışma KTÜ, Deniz Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

İlk defa 1991 yılında ülkemizde Denizli ilindeki bir işletmeden izole edilen ve daha sonra diğer bölgelerde de izole edilen yersiniosis etmeni *Y. ruckeri* hızla yayılım gösteren patojenlerden biridir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde özellikle yavru dönemde verilen kayıplar yüzünden işletmeler için önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bunun için hastalığa neden olan bakterinin moleküler ve genetik profilinin çıkartılarak dağılım ve kaynağının tam olarak belirlenmesi gerekmektedir. Bu araştırmalar mevcut *Y. ruckeri* izolatlarına biyokimyasal testler ve SDS-PAGE metodu uygulanarak aralarındaki benzerlikler ortaya konmuştur. Türkiye’de bulunan *Y. ruckeri* suşlarının tipleri belirlenmiş ve yurtdışı suşlarla karşılaştırılmıştır.

Tez danışmanlığımı üstlenerek bilgi ve desteklerini esirgemeyen ve her konuda desteğini hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. İlhan ALTINOK’a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Tez çalışmamın laboratuvar koşullarında benden yardımlarını esirgemeyen sayın hocalarım Doç. Dr. Erol ÇAPKIN’a, Arş. Gör. Ertuğrul TERZİ’ye ve özellikle hem laboratuvar çalışmasında hem de tezimin her adımında benimle ilgilenen ve bütün desteğini veren sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Halis BORAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimi yazmamda bana bilgisayarını vererek büyük katkı sağlayan ablam Öğr. Gör. Gökçe ARİFOĞLU’na ve tez çalışmam süresince benden manevi desteklerini esirgemeyen kuzenim Beyhan HORASANLI ve Sibel YILDIZ’a ve bütün zorluklara rağmen maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Gülşah AKYILDIZ  
Trabzon 2013

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Yersinia ruckeri*’nin lipopolisakkarit ve dış membran protein profillerinin belirlenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. İlhan ALTINOK’un sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri laboratuvarımızdan alıp analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun davrandığımı ve aksi bir durumun ortaya çıkması halinde her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 20/05/2013

Gülşah AKYILDIZ



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. <i>Yersinia ruckeri</i> .....	2
1.2.1. <i>Y. ruckeri</i> 'nin Morfolojisi ve Kültür Özellikleri .....	3
1.2.2. <i>Y. ruckeri</i> 'nin Biyokimyasal Özellikleri.....	3
1.2.3. <i>Y. ruckeri</i> 'nin Serolojik Yapısı.....	4
1.2.4. <i>Y. ruckeri</i> 'nin Patojenitesi ve Virülensliği .....	5
1.3. Yersiniosis (Enterik Kızıl Ağız) Hastalığı .....	6
1.3.1. Epizootiyolojisi ve Patogenezis.....	6
1.3.2. Hastalığın Klinik Bulguları .....	7
1.3.3. Hastalığın Teşhisi .....	8
1.3.4. Hastalığın Kontrolü ve Tedavisi.....	9
1.4. SDS-PAGE .....	10
1.5. Lipopolisakkarit.....	11
1.6. Gram-Negatif Bakterilerin Hücre Duvar Yapısı .....	12
1.7. Dış Membran Proteini (DMP) .....	13

1.8.	Biyokimyasal Teşhis Yöntemleri .....	13
1.9.	Önceki Çalışmalar .....	14
1.10.	Çalışmanın Önemi ve Amacı.....	16
2.	MATERYAL VE METOT .....	18
2.1.	Bakteri Örnekleri .....	18
2.1.	Lipopolisakkarit İzolasyonu .....	19
2.3.	Dış Membran Protein İzolasyonu .....	20
2.4.	SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Çözelti ve Jellerin Hazırlanması .....	20
2.4.1.	Amonyum Persülfat (%10 APS) .....	20
2.4.2.	Akrilamid/Bis (%30 T, %2,67 C).....	20
2.4.3.	Sodyum Dodesil Sülfat (%10 SDS w/v) .....	20
2.4.4.	Fix/stop Solüsyonu .....	21
2.4.5.	Gümüş Boyama Solüsyonu .....	21
2.4.6.	Developer Solüsyonu.....	21
2.4.7.	Gümüş Boyama Aşamaları.....	21
2.4.8.	Resolving Jel (Alt Jel) .....	22
2.4.9.	Stacking Jel (Üst Jel) .....	22
2.4.10.	İzolatların Biyokimyasal Karakterlerinin Belirlenmesi.....	22
2.4.11.	LPS ve DMP Profillerinin Analizi.....	22
3.	BULGULAR .....	22
3.1.	Biyokimyasal Test Sonuçları.....	22
3.2.	SDS-PAGE Analiz Sonuçları .....	26
4.	TARTIŞMA.....	31
4.1.	Biyokimyasal Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	31
4.2.	SDS-PAGE Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	33

5.	SONUÇLAR.....	36
6.	ÖNERİLER .....	37
7.	KAYNAKLAR.....	38
	ÖZGEÇMİŞ	



Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

*YERSİNİA RUCKERİ*'NİN LİPOPOLİSAKKARİT VE DIŞ MEMBRAN PROTEİN  
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Gülşah AKYILDIZ

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. İlhan ALTINOK  
2013, 45 Sayfa

Bu çalışmada *Yersinia ruckeri*'ye ait 40 suşun lipopolisakkarit (LPS) ve dış membran protein profilleri (DMP) sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği ile belirlenerek izolatlar arasındaki benzerlik araştırılmıştır. Ülkemizin değişik yöreleri ile ABD ve İtalya'dan izole edilen *Y. ruckeri* suşları incelenmiştir. *Y. ruckeri* izolatının tanımlanması amacıyla biyokimyasal testler uygulanmıştır. Klasik yöntemlerin uygulandığı testlerde suşlar arasında tam homojeniteye rastlanmamıştır. Benzerlik oranları düşük bulunan *Y. ruckeri* suşları LPS ve DMP analizinde 14 kümede toplanmıştır. Türkiye'den izole edilen suşlar hem LPS hem de DMP dendogramında ABD ve İtalya suşlarının arasında olduğu saptanmıştır. Yurtdışı suşları ile Türkiye'den izole edilen suşların benzerlik oranlarının %60 civarında olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak 40 suşa ait veriler benzerliklerine göre karşılaştırıldığında, biyotip, LPS ve DMP profilleri arasında belirgin bir ilişki bulunamamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Y. ruckeri*, LPS, DMP, SDS-PAGE, genotip

Master Thesis

SUMMARY

DETERMINATION OF THE LIPOPOLYSACCHARIDE AND OUTER MEMBRANE  
PROTEIN PROFILES OF *Yersinia ruckeri*  
Gülşah AKYILDIZ

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Fisheries Technology Engineering Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. İlhan ALTINOK  
2013, 45 Pages

Fourty strains of *Yersinia ruckeri* isolated from Turkey, Italy and USA were examined for lipopolysaccharide (LPS) and outer membrane protein (OMP) profiles by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique. Significant heterogeneities were observed among strains based on biochemical tests. Both LPS and OMP were grouped in 14 clusters with lower similarites wich indicate significant heterogeneity among strains. Turkish isolates were closely related to American and Italian isolates after analysing with unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) dendogram. Similarities between Turkish, Usa and Italian strains were around 60%. Based on similarity index, there was no relationship between phenotypes, LPS and OMP profile of 40 *Y. ruckeri* strains.

**Key Words:** *Y. ruckeri*, LPS, OMP, SDS-PAGE, genotyping

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Güç Kaynağı.....	11
Şekil 2. Gram (-) bakterilerde lipopolisakkarit'in hücre duvarında yerleşimi ve yapısı .....	12
Şekil 3. Gram negatif bakterinin hücre duvar yapısı .....	13
Şekil 4. SDS-PAGE ham görüntüleri .....	26
Şekil 5. Lipopolisakkarit dendogramı .....	27
Şekil 6. Dış membran proteinlerinin dendogramı .....	29

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Çalışmada kullanılan <i>Yersinia ruckeri</i> suşlarının izole edildiği yer, yıl ve temin eden kişiler .....	18
Tablo 2. Gümüş boyama yöntemi.....	21
Tablo 3. <i>Yersinia ruckeri</i> İzolatlarının Biyokimyasal Karakterizasyon Test Sonuçları.....	24

## SEMBOLLER DİZİNİ

DMP	Dış membran protein
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolisakkarit
OD	Optik yoğunluk
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sulfat poliakrilimit jel elektroforez

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Dünya nüfusunun artmasına paralel olarak, insan beslenmesinde önemli bir yeri olan protein kaynaklarının sınırlı olması dikkatleri su ürünlerine yöneltmiştir. Su kaynaklarından su ürünleri avcılığı ve yetiştiriciliği yapılarak yararlanılmaktadır. Gelişen teknoloji ile birlikte sanayileşmenin artması denizlerin ve iç suların giderek kirlenmesine ve bu kaynaklardan yararlanma oranının düşmesine yol açmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda ülkemizde ve dünyada kültür balıkçılığına verilen önem ve ilgi bir hayli artmıştır (Yonar, 2008).

Balıklar yaşadıkları ortam nedeniyle doğal olarak enfeksiyonlarla karşı karşıya kalmaktadır. Entansif yetiştiricilik yapılan yerlerde balıkların yoğun stoklanması enfeksiyöz hastalıkların büyük bir tehlike oluşturmasına neden olmaktadır. Bir balıkta başlayan hastalık çok kısa zamanda diğerlerine bulaşmakta ve yayılmaktadır (Ellis, 1988). *Yersinia* cinsinin neden olduğu enfeksiyonlar da bu hastalıklar içerisinde önemli bir yer tutmaktadır (Yonar, 2008).

Yersiniosis, alabalık işletmelerinde özellikle yavru döneminde önemli kayıplara neden olan ve sepsisemi ile seyreden bakteriyel bir hastalıktır. İlk defa 1950'li yıllarda ABD'nin Idaho eyaletinin Hagerman vadisinde gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) ortaya çıkan bu hastalık günümüzde Avrupa, Güney Amerika, Batı Afrika ve Avustralya kıtalarında değişik coğrafik bölgelerdeki ülkelerde yayılım göstermektedir. *Yersinia ruckeri* ülkemizde ilk kez 1991 yılında Ege bölgesindeki bir gökkuşuğu alabalığı işletmesinden izole edilmiştir. Bu tarihten günümüze kadar hızla diğer alabalık işletmelerinde yayılan yersiniosis, ülkemizde ciddi bir problem haline gelmiştir (Kayis vd., 2009). Yersiniosis, furunkulozis, vibriozis ve bakteriyel hemorajik sepsisemi (*Aeromonas hydrophila* ve *Pseudomonas fluorescens*) gibi hastalıklarla benzer semptomlar meydana getirir (Busch, 1982; Austin, 1987). Ancak klinik vakalarda ağız bölgesinde, deri, yüzgeçler ve anüs civarında erimeler, göz çukurunun çevresinde ve iriste hemorajların görülmesi yersiniosis'in en karakteristik belirtileridir (Busch, 1982).

*Yersinia ruckeri* bütün salmonidlerde hastalık meydana getirmekte ve büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (McDaniel, 1979; Valtonen vd., 1992; Austin ve

Austin, 2007). Salmonid türlerinin dışında, *Y. ruckeri*'nin varlığı kalkan (*Psetta maxima*), sazan (*Cyrinus carpio*), yılan balığı (*Anguilla anguilla*), mersin balığı (*Acipenser baeri*) (English vd., 1993) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) gibi türlerde de rapor edilmiştir (Savaş vd., 2006).

Alt-tipleme fenotip ve genotipik tekniklerle yapılmakta olup bu teknikler türlerin popülasyon yapısının belirlenmesinde, hedef organizmalarla diğer organizmalar arasındaki ilişkinin tespit edilmesinde, hedef organizmanın evaluasyona uğradığı basamakların belirlenmesinde ve moleküler epidemiyolojide kullanılmaktadır (Savaş vd., 2006).

Elektroforetik metotlar, ya genel protein profillerine göre, ya da özel enzimlere ait protein profillerine göre farklı türlerin ayrımında kullanılmaktadır (Kim ve Shelef, 1986). Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) metodu kullanılarak yapılan çalışmalarda bu metodun yüksek rezolüsyon sağlaması, kolay tekrarlanabilirliği ve elektroferogronlarda proteinlerin molekül ağırlıklarına göre hareket etmesi gibi özelliklerinden dolayı üstün olduğu bildirilmiştir (Parisi ve Agulari, 1985). Bu metot bir çok araştırmacı tarafından, hayvan türü tayininde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Höyem ve Thorson, 1970; Coduri ve Rand, 1972; Kato ve Deki, 1977; Hofmann, 1978; Heinert ve Thorson, 1980; Bonnefoi vd., 1986; An vd., 1988; Giovanni, 1988; McCormick, 1988; Hofmann ve Bluchel, 1991). Elektroforez işlemi ile ayrılan maddeler ancak özel boyama yöntemlerinin kullanılmasından sonra tespit edilebilmektedir. Bu amaçla tüm proteinlerin boyanması için kenacid blue, amidoblack, commasie brilliant blue ve gümüş boya gibi boyama yöntemleri kullanılmaktadır (Hofmann, 1978; Heinert ve Thorson, 1980; Hofmann ve Bluchel, 1991).

## **1.2. *Yersinia ruckeri***

Yersiniosis hastalığının etkeni olan *Yersinia ruckeri* ilk olarak 1950 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Rucker tarafından gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir (Rucker, 1966). Gram negatif, hareketli, spor oluşturmeyen, oksidaz negatif, katalaz pozitif ve flagellalı olan bu bakterinin uygun olmayan su kriterleri ve aşırı stok yoğunluğunun bulunduğu yetiştiricilik işletmelerinde, balıklarda ağız ve dil üzerinde kanamalarla karakterize olduğu bildirilmektedir (Lasea, 1995). English vd. (1993), hastalığın balıklardaki kronik seyirinde meydana gelen semptomları, renkte kararma, uyuşukluk, deri

üzerinde kanamalar ve ülserler, karaciğer, pilorik seka, hava kesesi ve iç organlar üzerinde bulunan yağlar üzerinde küçük çapta kanamalar şeklinde ifade etmişlerdir.

### 1.2.1. *Y. ruckeri*'nin Morfolojisi ve Kültür Özellikleri

Hastalığın etkeni olan *Y. ruckeri* Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ve Tryptic Soy Agar (TSA) gibi genel besi yerlerine aseptik ekimler sonucu 20-25°C de 24 saatte çoğalabilir. Bunun yanı sıra hem izolasyonda hem de tanımlamada *Y. ruckeri* için seçici bir besi yeri olan Shotts-Waltman Agar (SWA) yaygın olarak kullanılmaktadır (Waltman ve Shotts, 1984). *Y. ruckeri*'nin tanımlanmasında, rutin biyokimyasal testlerin dışında, moleküler teknikler (Altınok vd., 2001; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Cossarini-Dunier, 1985) ve Analytical Profil Index (API) gibi ticari test kitlerinin kullanımı da yaygınlaşmış durumdadır (Balta vd., 2005).

### 1.2.2. *Y. ruckeri*'nin Biyokimyasal Özellikleri

*Yersinia ruckeri*'nin biyokimyasal özelliklerinde serotipler arasında önemli bir farklılığın olmadığı ve sadece tek bir biyotip gösterdiği bildirilmiştir. Biyokimyasal çalışmalarda inkübasyon sıcaklığının 22-25°C arasında olması gerektiği, optimum sıcaklığın dışında yapılan testlerde hatalı negatif veya pozitif sonuçların elde edilebileceği belirtilmiştir (Sanders ve Fryer, 1988).

*Yersinia ruckeri* izolatları; gram negatif, hareketli, oksidaz negatif, katalaz pozitif, O/F glikoz ortamında fermantatif ve nitritleri nitratlara indirgemesi özellikleri ile enterik bakterilerin karakteristik özelliğine sahiptir. Metil kırmızısı (MR), sitrat kullanımı, ornitin dekarboksilaz testleri pozitif, sitokrom oksidaz, indol üretimi, H<sub>2</sub>S üretimi, üreaz, glikozdan gaz üretimi testlerinin ise negatif reaksiyon verdiği, voges proskauer (VP), hareketlilik, lizin dekarboksilaz, jelatin hidrolizi testlerinin suşlar arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir. *Yersinia ruckeri*, *Yersinia* cinsinin diğer türlerinden jelatin ve dekarboksilazı eritmesi ile farklılıklar göstermektedir. Karbonhidrat fermantasyon testlerinden; dekstrozu, mannitol, mannoz, maltozu, trehalozu, ve galaktozu fermentte ettiği, laktozu, sakarozu, salisin, adonitol, sorbitol, arabinozu ve ramnozu ise fermentte edemediği bildirilmiştir (Holt vd., 1994).



### 1.2.3. *Y. ruckeri*'nin Serolojik Yapısı

Bakterinin izole edildiği ilk yıllarda etken, tek serotip ve suş olarak düşünülmüş, (Rucker, 1966; Ross vd., 1966) sonraki yıllarda ise farklı özellikler göstermesi nedeniyle serotip I, II, III, IV, V, VI şeklinde sınıflandırılmıştır (Busch, 1982; Austin vd., 2003).

Enfekte balıklardan en sık izole edilen ve en yüksek virülense sahip Serotip I suşu (Hagerman suşu) Amerika başta olmak üzere dünyanın pek çok bölgesinde geniş bir coğrafik dağılım göstermektedir (Rucker, 1966; Stevenson ve Airdrie, 1984). Serotip II (Big creek) suşu; ilk olarak pasifik salmonlarında saptanmıştır ve bu suş Serotip I suşundan daha az virulent olup, gökkuşuğu alabalıkları dışında, diğer salmonid grubu balıklar ile *Coregonus artedii* gibi farklı balık türlerinden de izole edilmiştir (Bullock vd., 1981). Bu suşun Amerika dışında Kanada ve bazı Avrupa ülkelerinden de izole edilmiştir (Davies and Frerichs, 1989). Ayrıca Big creek suşunun sorbitolu fermente etme özelliği gösterdiği tespit edilmiştir (Busch,1982). Serotip III (Avustralya suşu) ise Avustralya'da gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen ve avirulent olduğu düşünülen bu suş, Norveç'te de izole edilmiştir (Busch, 1982; Willumsen, 1989).

*Yersinia ruckeri*'nin diğer suşlardan Serotip IV'ün L-arabinos, D-ksiloz, L-rhamnoz'dan asit ürettiği, Serotip V'in ise sorbitolu fermente etmediği ve virülensinin diğer serotiplere göre daha düşük olduğu saptanmıştır (Austin vd., 2003). Serotip VI hakkında ise yeterli bilgi mevcut değildir.

Isıya dayanıklı O antijeni kullanılarak yapılan sınıflandırmada *Yersinia ruckeri* izolatları O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>5</sub>, O<sub>6</sub>, O<sub>7</sub> şeklinde suşlara ayrılmıştır. Serotip III'ün serotip I'in mutanti olması ve serotip IV'ün de *Yersinia ruckeri* olarak tanımlanmaması nedeniyle bu sınıflandırmada O<sub>3</sub> ve O<sub>4</sub> serotipleri kullanılmamıştır. Bu suşlardan O<sub>1</sub> Avrupa'da en fazla izole edilen serotip olduğu, O<sub>2</sub> tipinin Fransa, Büyük Britanya, Norveç ve Batı Almanya gibi farklı Avrupa ülkelerinden izole edildiği ve O<sub>5</sub>, O<sub>6</sub>, O<sub>7</sub> serotiplerinden daha fazla görüldüğü belirtilmiştir. O<sub>5</sub> ve O<sub>7</sub> serotiplerinin büyük Britanya ve Danimarka'dan, O<sub>6</sub> serotipinin ise Finlandiya ve Batı Almanya'dan izole edildiği ve Avrupadaki serotip dağılımının Amerika'da da benzer olduğu, ayrıca O<sub>1</sub>

suşunun Güney Afrika ve Avustralya'dan da izole edildiği bildirilmiştir (Davies and Frerichs, 1989; Davies, 1990).

Etkenin dış membran proteinlerine (ısı ile değişebilen ve peptidoglikan ilişkili proteinler) (DMP-tipi) göre yapılan sınıflandırmada, Fransa, Norveç, Danimarka, Bulgaristan, İtalya, Almanya gibi Avrupa ülkeleri ile Kuzey Amerika, Güney Afrika ve Avustralya olmak üzere dünyanın farklı coğrafik bölgelerinden izole edilen *Yersinia ruckeri* izolatları DMP tip I, II, III, IV, V şeklinde sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmada Avrupa orjinli suşların %75,3'nün DMP-tip III, ancak İngiltere'den elde edilen izolatların %92,6'sının DMP-tip I olduğu, DMP-tip II-IV'ün ise Avrupa'da çok az izole edildiği, DMP-tip V'in ise izolasyonun yapılmadığı bildirilmiştir. DMP-tip I, II, III, IV'ün Kuzey Amerika'da da izole edildiği, Güney Afrika kökenli suşun DMP-tip III olduğu, Avustralya'da izole edilen bütün suşların (tek bir DMP-tip II suşu dışında) DMP-tip I olduğu, ayrıca Amerika'da ilk izole edilen *Y. ruckeri* suşunun ise (Hagerman tipi) DMP-tip III'e ait olduğu ileri sürülmüştür (Davies, 1991).

#### **1.2.4. *Y. ruckeri*'nin Patogenitesi ve Virülensliği**

*Yersinia ruckeri*'nin patojenitesi su sıcaklığı, balık büyüklüğü, ortam şartları, beslenme ve stres koşulları gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Su sıcaklığının 10°C'nin üzerinde olması halinde hastalık oluşmaktadır. Yersiniosis'den meydana gelen kayıplar 15-18°C su sıcaklığında yüksek olurken, 10°C'nin altında mortalite oldukça düşüktür. Aşırı yemleme, stres şartları ve 7,5 cm den küçük balıklarda ölümler artmaktadır (Busch, 1982; Ellis, 1988; Frerichs ve Roberts, 1989; Austin ve Austin, 1993).

Hastalık etkeni önce sağlıklı balıkların bağırsaklarına yerleşmektedir. Stres, portör balıklarda tekrar enfeksiyonu, sağlıklı balıklarda ise enfeksiyon sürecini başlatmaktadır (Busch ve Lingg, 1975; Hunter vd., 1980). Gerek taşıyıcı gerekse bağırsaklarında kolonize olmuş halde *Y. ruckeri* bulunduran balıkların ellenmesi, aşırı kalabalık halde stoklanması, sudaki amonyak ve diğer zararlı maddelerin artması, oksijen düzeyinin azalması gibi istenmeyen durumlarda enfeksiyon akut bir seyir izlemektedir (Busch, 1978). *Yersinia ruckeri*'nin bulaşmasında portör balıklar önemli rol oynamaktadır. Etken bu balıkların dışkılarıyla suya geçmekte ve diğer balıkları enfekte etmektedir. Yersiniosis'i geçiren

balıklar portör olarak kalmaktadır. Bu nedenle hastalığı atlatıp, iyileşmiş balıklarda enfeksiyon belirli aralıklarla nüksedebilmektedir (Austin ve Austin, 1993).

Obligat, patojen bir bakteri olan *Y. ruckeri*'nin konakçı dışında uygun olmayan koşullarda yaşamını devam ettirebilme özelliği patojenite yönünden önemlidir. *Yersinia ruckeri*'nin göl, akarsu ve sedimentte 4 aya kadar yaşayabildiği belirtilmiştir. *Yersinia ruckeri*'nin dış membran proteinlerinin demir bağlayıcı sisteme sahip olduğu ve bu sistemin enfeksiyonun ilk safhasında konakçının kanındaki demiri bağlayarak hemoglobin ve transferrin gibi proteinlerin oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Altun, 2001).

### **1.3. Yersiniosis (Enterik Kızıl Ağız) Hastalığı**

Enterik kızıl ağız hastalığı olarak da bilinen Yersiniosis ilk defa 1950'li yıllarda ABD'deki gökkuşuğu alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde yüksek mortaliteye neden olan, subakut ve akut seyreden, septisemik bir hastalık olarak rapor edilmiştir (Ross vd., 1966). Hastalık dünyanın her bölgesine yayılmış durumdadır (Bullock vd., 1977; Stevenson ve Daly, 1982; Roberts, 1983; Austin ve Austin, 1993).

Türkiye'de *Yersinia ruckeri*'nin neden olduğu Yersiniosis 1991 yılında gökkuşuğu alabalığında saptanmış ve alabalık işletmelerinin de çoğalmasıyla birlikte hastalığın görülmesinde artışlar olmuştur. Halen bu hastalık alabalık işletmelerinde yaygın halde görülmektedir ve ülkemizin en önemli bakteriyel hastalığı haline gelmiştir (Çağırğan ve Yürekli Türk, 1991).

#### **1.3.1. Epizootiyolojisi ve Patogenezis**

Bu enfeksiyon temel olarak genç gökkuşuğu alabalıklarında görülmektedir. Bununla birlikte bütün yabani ve kültür alabalıkları hastalığa duyarlıdır. Hastalığa en duyarlı tür gökkuşuğu alabalığıdır. Mortalite, tedavi edilmeyen sürede %25-75 arasında seyreder. Kahverengi alabalıklar ise daha dirençlidir, mortalite %5-10 arasındadır. Tekrarlayan enfeksiyonlarda mortalite genellikle düşüktür. Enfeksiyonu geçiren balıkların %60-70'i portör olarak kalabilir. Ayrıca sazan, sudak ve yılan balıklarında da enfeksiyon görülür (Busch, 1978; Bullock ve Cipriano, 1990; Austin ve Austin, 1993; Horne ve Barnes, 1999). Enfeksiyonun balıktan balığa yayılması su yoluyla olmaktadır. Etken herhangi bir

semptom oluşturmaksızın balığın ince bağırsak, böbrek, dalak ve karaciğerinde enfeksiyon sonrası 60-65 güne kadar lokalize olabilir. Enfeksiyon akut ya da kronik seyredebilir (Busch ve Lingg, 1975; Busch, 1982). Şiddetli epidemiler su sıcaklığının 15-18°C'ler arasında olduğunda gözlenir. Stres şartlarına bağlı olarak değişmekle birlikte, hastalık su sıcaklığının aniden yükselmeye başladığı bahar aylarında özellikle genç balıklarda genellikle perakut ve akut, su sıcaklığının düştüğü sonbahar aylarında ve bir yaşındaki balıklarda ise kronik seyirlidir (Rucker, 1966; Busch, 1978). Hastalığın ortaya çıkmasında, yoğun stoklama, kirlilik, oksijen yetmezliği gibi balıklarda strese neden olan faktörlerin önemli rolü olduğu bildirilmiştir. Portör balıkların strese bağlı olarak hastalığı yayabildiği, stres içinde olmayan portörlerin ise hastalığı yayamadığı saptanmıştır (Rucker, 1966; Busch ve Lingg, 1975; Busch, 1978; Rodgers, 1991).

Enfeksiyon popülasyonda ilk defa görülüyor ise, 15°C su sıcaklığındaki inkübasyon süresinin 5-7 gün olduğu bildirilmiştir. Eğer daha önceden popülasyonda Yersiniosis görülmüş ve kronik enfeksiyon mevcutsa, stres şartları altında 3-5 gün içinde hastalık yüksek bir mortaliteyle sonuçlanabilir. *Yersinia ruckeri*'nin işletmeye girdikten sonra suda, sedimentte ve çamurda uzun süre canlı kalabilmesi, hastalıkla mücadeleyi zorlaştırmaktadır (Austin ve Austin, 1993).

### 1.3.2. Hastalığın Klinik Bulguları

Yersiniosis hemorajik septisemi bulguları ile seyreder. En çok gözlenen klinik semptomlar; ağız boşluğu, çene etrafı, yüzgeç tabanları ve anüs etrafında görülen subkutan hemorajilerdir. Vücudun yan taraflarında 1-2 mm boyutlarında hemorajik lezyonlar gözlenir. Çene ve damakta erozyonlar oluşabilir ancak bu lezyonlar her vakada görülmeyebilir. Deride pigment kaybı, renkte koyulaşma ve pullarda dökülme önemli bulgular arasındadır. Gözlerde hemoraji ile birlikte genellikle tek taraflı başlayan ancak hastalığın ilerlemesiyle birlikte çift taraflı ekzoftalmus görülür (Bullock ve Snieszko, 1975; Busch, 1978; Bragg ve Henton, 1986; Austin ve Austin, 1993).

Otopside; peritonun kan damarlarında konjesyon, dalak, karaciğer ve böbrek gibi iç organlarda yaygın peteşiyal kanamalar gözlenir. Mide ve bağırsakta sarımsı renkte veya renksiz bir sıvı mevcuttur. Dalak büyümüş ve yumuşamış, gonadlar genellikle kızarmış ve hemorajiktir. Bağırsağın son kısmı hemorajik yangılı, yoğun mukoid materyal ile doludur. Böbreklerde, karaciğerde ve dalakta ödem şekillenir. İç organlardan yapılan ezme

preparatlarda bakteriler mikroskopta yoğun şekilde görülmektedir. Portör balıklar herhangi bir klinik belirti göstermezler. Yapılan hematolojik incelemelerde eritrosit, hematokrit, hemoglobin, total plazma protein miktarında önemli oranda azalmalar görülebilmektedir. Klinik ve patolojik bulgular önem taşımakla birlikte kesin tanı, hastalıklı organlardan etken izolasyonu ve identifikasyonu ile gerçekleştirilir (Rucker, 1966; Busch ve Lingg, 1975; Bullock ve Snieszko, 1975; Bragg ve Henton, 1986; Post, 1987).

### 1.3.3. Hastalığın Teşhisi

Bakteriyolojik hastalıkların teşhisi, mikroorganizmaların morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik, serolojik ve moleküler özelliklerinin incelenmesiyle yapılabilmektedir (Horne ve Barnes, 1999; Arda vd., 2005). Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde genellikle klinik belirtilerin belirlenmesiyle birlikte, bakteriyolojik ve histopatolojik yöntemler uygulanmaktadır. Bakterilerin izolasyon ve identifikasyonunda uygulanan klasik laboratuvar analizlerinin yanı sıra, gerek insan hekimliği gerekse veteriner hekimlikte kullanılan çeşitli serolojik testler de su ürünleri hastalıklarının teşhisinde uygulanmaya başlanmıştır (Tanrıkul vd., 1996; Kubilay ve Diler, 1999).

Yersiniosis gram negatif septisemilerle benzer semptomlar göstermesi nedeniyle, klinik ve otopsi bulgularına bakılarak kesin teşhis yapılamamaktadır. Kesin teşhis; hasta balık popülasyonundan tipik semptom gösteren balıkların organlarından genel besi yerlerine yapılan ekimlerle, 29°C'de 48 saat inkubasyonu takiben şüpheli suşların izolasyonu ve bakterinin fenotipik ve serolojik özelliklerinin tespitiyle yapılmaktadır. Etken hasta balıkların böbrek, karaciğer ve dalak gibi organlarından Tryptic Soy Agar (TSA), Brain Heart Infusion Agar (BHIA) gibi rutin bakteriyolojik ortamlarda aerobik şartlarda izole edilebilmektedir (Ross vd., 1966; Austin ve Austin, 1993).

*Yersinia ruckeri*, Shotts-Waltman besi yerinde 1 mm çapında, yeşil renkli, konveks, kenarları düz koloniler verirler. Kolonilerin etrafında Tween 80'in hidrolizi nedeniyle 5 mm çapa kadar büyüklükte buzlu cam görünümünde bir bölge görüldüğü bildirilmiştir (Waltman ve Shotts, 1984). *Yersinia ruckeri* suşları Riboz Ornitin Dezoksikolat agarda kırmızı zeminde sarı renkli koloniler oluşturmaktadır (Busch, 1982; Stevenson ve Daly, 1982; Arda, 1985; Sanders ve Freyer, 1988; Rodgers, 1991; Horne ve Barnes, 1999). *Yersinia ruckeri*'nin kesin teşhisi ve identifikasyonu biyokimyasal ve floresan antikor tekniği (FAT), indirekt enzimelinked immunosorbent assay (ELISA) ve aglutinasyon

tekniki gibi serolojik metodlara dayandırılmalıdır (Busch, 1982; Arda vd., 2005). Fragment-uzunluk polimorfizm (RFLP) (Garcia vd., 1998) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) (Gibello vd., 1999; Altinok vd., 2001) gibi moleküler teknikler de hastalığın teşhisinde kullanılabilir.

#### **1.3.4. Hastalığın Kontrolü ve Tedavisi**

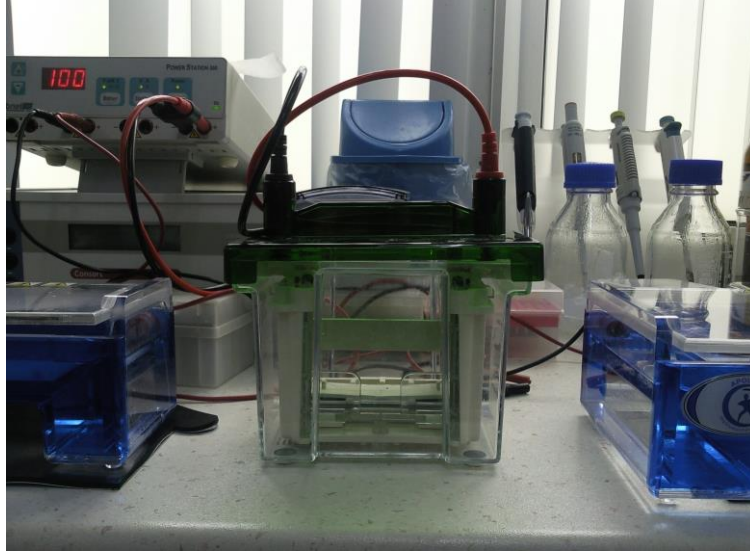
Balık yetiştiriciliği yapılan işletmelerde enfeksiyonların çıkmaması için bütün genel koruma önlemleri alınmalıdır. Olumsuz tüm koşullar düzeltilmeli ve minimal düzeyde tutulmalıdır. Yersiniosis'den korunmada en etkili yol işletmelere hastalıkların girmesini engelleyecek tedbirlerin (uygun yetiştiricilik koşullarının sağlanması, uygun yemleme ve yemlerin kullanılması, enfekte olmuş balıkların karantinaya alınması, patojen etken ile duyarlı konakçı arasındaki ilişkinin kesilmesi) alınmasıdır. Ayrıca hastalıktan önce spesifik bağışıklık oluşmasına olanak veren aşılar uygulanmalıdır. Bunun için 3 g ağırlığın üzerindeki balıklar banyo tarzında 30 saniye süreyle aşılanabilirler. Bu şekilde yaklaşık 6-12 aylık bir koruma sağlanabilir (Ellis, 1988; Arda vd., 2005). Mikroorganizmalar yumurtaların yüzeyinde de bulunabileceğinden bunlar iyot içeren preparatlarla dezenfekte edilmelidir. Gerektiği hallerde balıkların yemlerine koruyucu amaçla antibiyotikler ve vitaminler katılabilir (Arda vd., 2005). Hastalığının tedavisinde; sulfamerazin ve oksitetrasiklin, metilen mavisi ve oksitetrasiklin, bazı sulfanamidler, tiamulin, flumequin, nalidiksik asit, gentamisin, eritromisin, oksolinik asit gibi antimikrobiyal bileşikler kullanılmaktadır. Sulfamerazin içeren ilaçlı yemler 200 mg/kg balık ağırlığına/3 gün süre ile bunu takiben 3 gün daha 50 mg/kg balık ağırlık hesabıyla oksitetrasiklin ilave edilmiş yemler verilmesiyle başarılı sonuçlar alınabileceği bildirilmiştir (Ross vd., 1966; Rodgers, 1991; Austin ve Austin, 1993; Kubilay, 1997; Arda vd., 2005). Sulfanamidlerden; sülfadimetoksin ve ormetoprim karışımının 50 mg/kg balık ağırlığına/günlük doz/5 gün süreyle, sulfadiazin ve trimetoprim kombinasyonu ise 1 mg/kg balık ağırlığına/günlük doz /14 gün süre ile başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Yine sulfamerazin 66 mg/kg balık/günlük doz/5 gün veya sülfametazin 200 mg/kg balık/günlük doz/5 gün süre ile verilebilir. Ayrıca; oksolinik asit, 10 mg/kg balık ağırlığına/günlük doz/10 gün süre ile kullanıldığında hastalığa karşı etkili olduğu ifade edilmiştir (Austin ve Austin, 1993; Arda vd., 2005).

Balık patojenlerine karşı koruma amaçlı aşı çalışmaları ilk olarak 1940'lı yıllarda Duff tarafından ele alınmıştır. Daha sonraları, balıklarda yersiniosis'e karşı fenolle inaktif hale getirilmiş aşığı oral yolla başarıyla kullanmışlardır (Ross ve Klontz, 1965). Günümüzde yersiniosis'e karşı enjeksiyon ve immersiyon yoluyla ticari olarak aşılama yapılabilmektedir (Bullock ve Anderson, 1984; Ellis, 1988).

#### **1.4. SDS-PAGE**

SDS-PAGE, denatüre edici maddeler (örneğin; sodyum dodesil sülfat,  $\beta$ -merkaptoetanol) kullanılarak proteinlerin poliakrilamid jelde ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu teknikte proteinler denatürasyona uğrayarak üç boyutlu yapıdan linear yapıya dönüşerek poliakrilamid jelde ayrılırlar (Aslan vd., 2006).

SDS-PAGE'de destekleyici madde (matriks) olarak poliakrilamid yaygın olarak kullanılmaktadır. Poliakrilamid jellerin moleküler elek özellikleri akrilamid konsantrasyonunun artması ile değişir. Poliakrilamid jellerin por büyüklüğü nükleik asitlerin ayrılmasında kullanılan agaroz jellerinkinden daha küçük olduğu için küçük moleküllerin ayrılmasını daha iyi sağlamaktadır. Bu yüzden poliakrilamid jeller, genellikle nükleik asitlerden daha küçük olan proteinlerin ayrılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi (Şekil 1), proteinlerin molekül ağırlığının belirlenmesinde, saflığının kontrolünde, alt birimlerinin belirlenmesinde, izoenzimlerinin belirlenmesinde, aminoasit dizisinin tespit edilmesinde, türler arası benzerlik ve farklılıkların belirlenmesinde ve genetik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır (Aslan vd., 2006).



Şekil 1. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ve güç kaynağı

### 1.5. Lipopolisakkarit

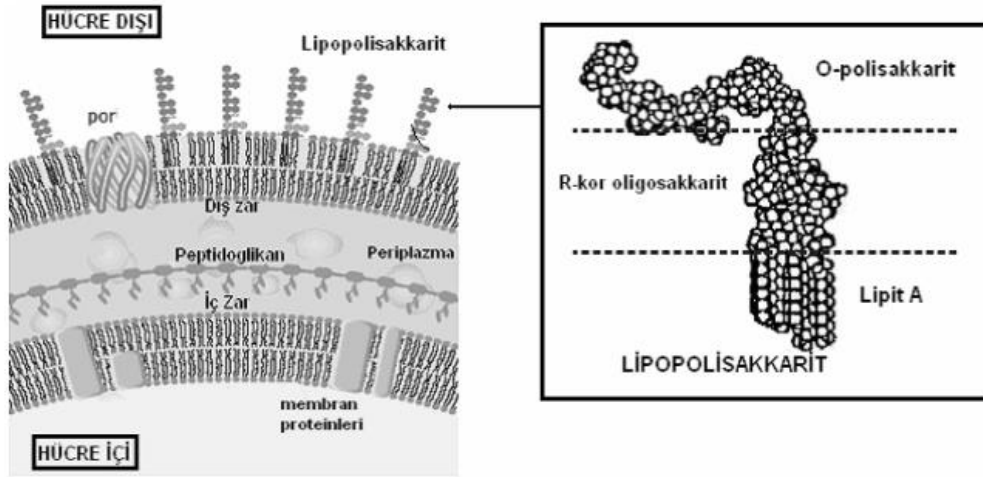
Lipopolisakkaritler (LPS) ya da lipoglikanlar kovalent bağ ile bağlanmış lipid ve bir polisakkarit içeren büyük moleküllerdir (Şekil 2). Gram negatif bakterilerin dış membranında bulunurlar. Hayvanlarda güçlü immun tepki oluşturan endotoksinler olarak etki gösterirler. Lipopolisakkaritler bakterilerin dış zarının ana bileşenidir ve bakteriyi kimyasal saldırılardan korurlar. Ayrıca hücre zarının negatif yüklenmesine yardımcı olarak genel bir stabilizasyon sağlar (Ritting, 2004).

Endotoksinlerin klasik örneği, çeşitli Gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkaritler veya lipo-oligosakkaritlerdir. LPS ve endotoksin terimleri sık olarak birbiri yerine kullanılır, LPS'nin ilk keşfedilen endotoksin olmasından dolayı 1800'lü yıllarda bakterilerin ortamlarına "ekzotoksin" olarak adlandırılan toksinler salgıladıkları anlaşılmıştı. Endotoksin terimi, Gram-negatif bakterilerin kendi parçalarının da toksisiteye yol açabileceği keşfine dayanır. Sonraki araştırmalar bu "endotoksin" etkisinin aslında LPS'den kaynaklandığını göstermiştir. LPS dışında başka endotoksinler de vardır. Örneğin, *Bacillus thuringiensis*'de bulunan delta endotoksin bakterinin içindeki endosporun yanbaşında kristal gibi enklüzyon cisimleri meydana getirir. Bunlar bitkileri yiyen böcek larvaları için zehirlidir ama insanlara zararsızdır, çünkü onun işlem görmesi için gerekli enzim ve reseptörler insanda yoktur (Steward vd., 2006).

Gram-pozitif bakteriler arasında endotoksinli tek bakteri *Listeria monocytogenes*'tir. LPS, lipit A olarak adlandırılan bir lipid bölüm ile bir polisakkarit



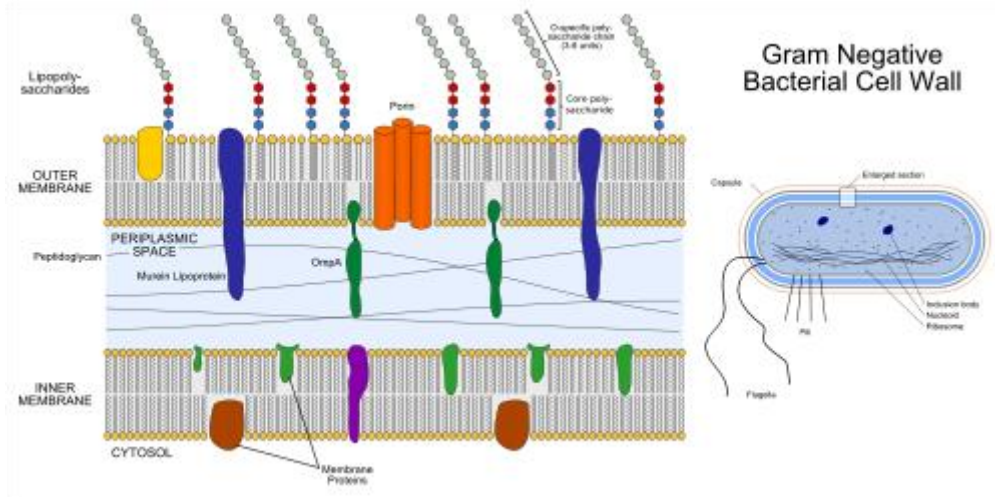
zincirden oluşur, lipit A onun toksik etkisinden sorumludur. Polisakkarit grubu farklı bakteriler arasında büyük çeşitlilik gösterir. Endotoksinlerin moleküler ağırlığı yaklaşık 10 kDa olmasına rağmen bunlar 1000 kDa'a varan büyüklükte öbekler oluşturabilirler. Endotoksine maruz kaldıktan sonra insanda ona karşı antikor oluşturur ama bunlar endotoksinin polisakkarit zincire yönelik olduğu için başka endotoksinler için koruma sağlamazlar (Raetz ve Whitfield, 2002).



Şekil 2. Gram negatif bakterilerde lipopolisakkarit'in hücre duvarında yerleşimi ve yapısı (Jones ve Spring-Mills, 1988).

### 1.6. Gram-Negatif Bakterilerin Hücre Duvar Yapısı

Gram negatif bakterilerin hücre duvarı sıkı ve çapraz bağlı peptidoglikanlardan oluşan ve yüksek iç ozmotik basıncına karşı hücre şeklini koruyabilen karmaşık bir yapıdır. Dıştan içe doğru; dış zar (lipopolisakkarit tabaka), peptidoglikan tabakası, periplazmik aralık ve iç zar şeklinde katmanlaşmıştır. Periplazmik aralık dış zarla hücre zarı arasındaki bölümü kapsar. Peptidoglikan, ardı ardına 20-100 adet N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asidin oluşturduğu zincirlerin üç boyutlu ağı şeklindedir (Babic vd., 2006).



Şekil 3. Gram negatif bakterinin hücre duvar yapısı (Bauman, 2005)

### 1.7. Dış Membran Proteini (DMP)

Hücre zarı ya da hücre membranı, hücrenin dış kısmında bulunan, molekülleri özelliklerine göre hücre içine alan veya dışarı bırakan katmandır. Gram negatif bakterilerde peptidoglikan tabaka Gram pozitif bakterilere göre daha incedir. Yapısı çok benzer fakat L-lizin yerine, mezodiaminopimelik asid bulunur. Peptidoglikan tabakasının üzerine bir lipoprotein tabaka ve bunun da üzerinde bir dış zar bulunur. Dış zar içte fosfolipid, dışta ise lipopolisakkarit katmanından oluşur ve gram negatif bakteri duvarına seçicilik özelliği kazandırır. Dış membranda bulunan porin proteinleri (porlar) dış ortamla iç ortam arasında madde alışverişini sağlar. Bu porlar antibiyotik direncinde de rol alırlar. Örneğin *Pseudomonas*'ların porları, *E.coli*'den 100 kat daha az geçirgen olduğu için antibiyotiklere oldukça dirençlidir. Poru proteinleri ayrıca bakteriyofajlar ve bakteriyosinler için de reseptör görevi yaparlar. Dış membran proteinleri kendilerini kodlayan genlere göre DMP A, B, C, D, F vb. olarak isimlendirilirler (Van der ley vd., 1991).

### 1.8. Biyokimyasal Teşhis Yöntemleri

Tüm dünyada kullanılan en yaygın yöntem olan bu teşhis yöntemi yeni ölmüş ya da ölmekte olan balıklardan alınan örneklerin katı besi yeri üzerinde saf kültürlerinin elde edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. İleri aşamalarda bu bakteri kültürlerine biyokimyasal testlerin uygulanması ile bakterinin teşhisi sağlanabilmektedir (Bernardet vd., 1990).

Mikroorganizmaların çeşitli karbon kaynaklarını (şekerler, alkoller, aminoasitler, deterjanlar) enerji kaynağı olarak kullanmaları ve bu durum sonucu oluşan farklılıkların tanı amacıyla kullanılması esasına dayalı bir metottur. Bu amaçla 1980'li yıllarda birçok biyokimyasal testi bir arada barındıran test panel sistemleri geliştirilmiştir. Analytical Profil Index (API), bu sistemler içerisinde en yaygın, hızlı ve etkin olarak kullanılan sistemler arasında görülmektedir (Amandi vd., 1982). Ancak bu sistemlerin daha çok insan patojenleri için geliştirilmiş olması uygulamada bazı yanlışlara sebep olmaktadır.

Fenotipik teşhis yöntemi olarak da ifade edilen bu tanı yönteminde bakterilerin koloni morfolojisi, gram boyama, hareket gibi özelliklerinin yanı sıra, katalaz, oksidaz, indol, üre, metil red, voges proskauer, eskülin, sitrat, arjinin, ornitin, lizin, mannitol, glikoz, sukroz, mannoz gibi testler kullanılmaktadır. Balık patojeni olan birçok bakteri bu yöntemle teşhis edilebilmektedir. Bazı balık patojeni bakteriler için selektif olan besi yerleri geliştirilmiştir (Austin ve Austin, 2007).

### 1.9. Önceki Çalışmalar

Kültür balıkçılığının gelişimi ve yaygınlaşmasıyla birlikte bulaşıcı balık hastalıkları da artmıştır. Bu hastalıklardan kaynaklanan kayıpları azaltmak için patojenlerinin teşhisi, tedavisi ve moleküler metotlarla tiplendirilmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda artmıştır. Bakterilerin teşhisinde kullanılan en yaygın yöntemlerin başında biyokimyasal testler gelmektedir. Klasik biyokimyasal testlerin yanında API kitleri de kullanılmaktadır. Ancak özellikle gram negatif sitokrom oksidaz negatif enterobakteriler için kullanılan API 20E kiti inkübasyon sıcaklığından kaynaklanan yanlış sonuçlar vermektedir. Yersiniosis son yıllarda gerek bölgemizde gerekse tüm ülkedeki balık işletmelerinde görülmektedir. Bölgemizde hastalık tatlı su alabalık işletmelerinde, deniz kafeslerinde yetiştiriciliği yapılan levrek ve alabalıklardan izole edilmiştir. Bu hastalık yaz aylarında ve ani su sıcaklığı değişikliklerinde ortaya çıkmakta ve özellikle yavru ve genç balıklarda yüksek ölüm yapmaktadır. Erken teşhis durumunda hastalık kontrol altına alınabilmektedir. Ayrıca hastalığa karşı koruyucu aşılama da yapılabilmektedir (Türe, 2011).

Ülkemizde ilk kez 1991 yılında Denizli Bölgesindeki bir alabalık işletmesinden izole edilen *Yersinia ruckeri* varlığının günümüzde bölgedeki durumunu ortaya koymayı amaçlayan bir çalışmada 76 çiftlikten toplam 152 numune alınmış, 13 adet çiftlikte *Yersinia ruckeri* tespit edilmiştir. En fazla numune Şubat ayında toplanmış, 35 çiftlikten 70

numune alınmış ve 3 çiftlikte hastalık teşhis edilmiştir. Buna karşılık Mayıs ayında 11 çiftlikten 22 numune alınmış, 5 çiftlikte hastalık teşhisi yapılmıştır. Haziran ve Temmuz aylarında ise 16 çiftlikten alınan 32 numunenin hiçbirinde hastalık teşhisi yapılamamıştır. Oransal olarak en fazla hastalık teşhisi mevsimsel su sıcaklıklarının değişim gösterdiği Mayıs ayında yapılmıştır. Çalışma sonucunda hastalığın bölgede ekonomik anlamda büyük zararlar meydana getirmediği görülmüş ancak yersiniozis dışında da başka bakteriyel enfeksiyonların varlığı görülmüştür (Timur ve Timur, 1991).

2010 yılında yapılan bir çalışmada ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinde bulunan gökkuşağı işletmelerinden izole edilmiş olan 19 adet *Yersinia ruckeri* suşunun 2 adet referans suşla (serotip 1 ve serotip 2) karşılaştırmalı olarak fenotipik ve serotipik özellikleri incelenmiştir. *Yersinia ruckeri* suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde geleneksel mikrobiyolojik ve API 20E testleri kullanılmıştır. Geleneksel mikrobiyolojik ve API 20E testlerinde bakterinin oldukça homojen (API 20E testinde suşlar arasında jelatin hidrolizi, voges proskauer reaksiyonu, sitrat kullanımı testleri yönünden farklılıklar olmakla birlikte) bir yapı gösterdiği belirlenmiştir. Shotts-Watman Medium (SWM) ve Riboz Ornitin Dezoksikolat (ROD) selektif besiyerlerinde *Y. ruckeri* suşlarının spesifik koloniler oluşturduğu saptanmıştır. Serotip 1 ve serotip 2 immuns serumlar kullanılarak yapılan mikroaglutinasyon testinde ise ülkemizden izole edilmiş olan 19 suştan 18'inin serotip 1, geri kalan 1 suşun ise serotip 2 özellikte olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, ülkemizde serotip 1 suşunun yaygın olduğunu göstermiştir (Altun vd., 2010).

Diğer bir araştırmada 40 adet *Yersinia ruckeri* suşunun (38 tanesi ülkemizden, 2 tanesi Danimarkadan izole edilmiş olan) fenotipik ve antijenik özellikleri incelenmiştir (Altun, 2001). *Yersinia ruckeri* suşlarının fenotipik özellikleri geleneksel mikrobiyolojik ve API 20E testleri kullanılarak incelenmiştir. Geleneksel mikrobiyolojik ve API 20E testlerinde *Y. ruckeri* suşlarının oldukça homojen (API 20E testinde suşlar arasında jelatin hidrolizi, VP reaksiyonu, sitrat kullanımı testleri yönünden farklılıklar olmakla birlikte) bir yapı gösterdiği görülmüştür. *Yersinia ruckeri* suşlarının antijenik özelliklerinin belirlenmesinde SDS-PAGE ve immunoblotting testlerinden yararlanılmıştır. SDS-PAGE analiz sonucunda *Yersinia ruckeri* suşlarının hücre protein profillerinin oldukça benzer oldukları (%95,9 - %100) ancak serotip 2 izolatlarının 33 kDA molekül ağırlığında farklı bir major bant içerdikleri saptanmıştır. İmmunoblotting analiz sonucunda ise *Y. ruckeri* suşlarının antijenik yönden farklı olmadıkları, 35-42 kDA'lık aralıkta bant oluşturdukları görülmüştür (Altun, 2001).

Çeşitli hayvan türlerine ait etlerin ve bu etlere yapılan katkı seviyelerinin belirlenmesi amacıyla, bazı et proteinlerinin ayırımında SDS-PAGE tekniği kullanılabilir. Et türlerinin ayırımında spesifik protein bantları kullanılmıştır. Araştırmada çiğ sığır, domuz, koyun ve at etleri ayrı ayrı ve ağırlıklarına göre muhtelif seviyelerde ikili karışımlar şeklinde hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerdeki tür çeşidi ve bunların yüzde nispetleri SDS-PAGE tekniği ile protein profilleri yine molekül özellikleri bilinen standart protein markırları ile karşılaştırılarak, teşhis ve tespitler gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE tekniğinin, et karışımlarındaki türlerin ve bunların karışımlardaki oranlarının % 5-10'a kadar tespitinde başarı ile kullanılabilceği ortaya konmuştur (Ekici ve Akyüz, 2003).

*Yersinia ruckeri*'nin 135 izolatının dış membran profilleri, dokuz farklı Avrupa ülkesinden (100 izolat), kuzey Amerika'dan (23 izolat), Avustralya'dan (6 izolat), güney Afrika'dan (2 izolat) ve 4 referans suşu olmak üzere 135 suşu SDS-PAGE'te incelenmiştir. İzolasyon sonrası dış membran proteinlerinin stabil ve OMP profillerinde hiçbir varyasyonun olmadığı görülmüştür. 39.5 kDa peptidoglikan ilişkili protein dışında büyüme döngüsünün çeşitli evrelerinde herhangi bir varyasyon görülmemiştir. Bu çalışma dış membran protein analizinin *Y. ruckeri* için yapılan epidemiyolojik çalışmalarda yararlı olduğu gösterilmiştir (Davies, 1991).

### **1.10. Çalışmanın Önemi ve Amacı**

Ülkemizde su ürünleri sektörü hızla gelişmekte olup, havuzlarda, baraj gölleri ve denizlerdeki ağ kafeslerde giderek artan sayıda işletme faaliyete geçmektedir. Yersiniosis, alabalık işletmelerinde özellikle yavru döneminde önemli kayıplara neden olan ve septisemi ile seyreden bakteriyel bir hastalıktır. Son zamanlarda hızla alabalık işletmelerinde yayılan yersiniosis, ülkemizde ciddi bir problem haline gelmiştir. Ayrıca, Yersiniosis hastalığının bütün salmonidlerde hastalık meydana getirdiği ve büyük ekonomik kayıplara sebep olduğu bilinmektedir.

Proteinlerin analizi için en fazla kullanılan yöntemlerden birisi SDS-PAGE olup, proteinlerin karakterizasyonunda ve karşılaştırılmalarında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde, proteinlerin saflığının kontrolünde, türler arası benzerlik ve farklılıkların belirlenmesinde, genetik hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır.

Bu araştırmada *Yersinia ruckeri* bakterisinin farklı ülke ve bölgelerden izole edilen 40 suşu'nun lipopolisakkarit ve dış membran proteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde analizi yapılarak türler arası benzerlik ve farklılıklar belirlenmiştir.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Bakteri Örnekleri

Bu çalışmada LPS ve DMP profillerinin incelenmesi amacı ile 40 adet *Y. ruckeri* izolatu kullanılmıştır. Bu suşlar farklı yıllarda ülkemizdeki çeşitli bölgelerden ve yurtdışından gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir. Bu izolatların toplandığı yıllar ve isimler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Yersinia ruckeri* suşlarının izole edildiği yer, yıl ve temin eden kişiler.

<b>Referans No (suş)</b>	<b>Ülke ve Yıl</b>	<b>Koleksiyon</b>
<b><u>Referans suşlar</u></b>		
NCIMB 1315	1965	NCIMB
ATCC 29473	1975	ATCC
<b><u>Serotip suşlar</u></b>		
3018 (serotip 1)	İtalya , 2003	A. Manfrin
3019 (serotip 2)	İtalya , 2003	A. Manfrin
3020 (serotip 3)	İtalya , 2003	A. Manfrin
<b><u>Diğer ülkelerden izole edilen suşlar</u></b>		
691/97	İtalya , 1998	A. Manfrin
GA97016	ABD, 1997	K. Hayden
ALG 94-88	ABD, 1994	K. Hayden
LV-01	ABD, 2008	K. Hayden
ALG 94-883	ABD, 1994	K. Hayden
MSA 3016	ABD, 2006	K. Hayden
MO 688	ABD, 1997	K. Hayden
GA 9707	ABD, 1997	K. Hayden
GA 97126	ABD, 1997	K. Hayden
GA 99045	ABD, 1999	K. Hayden
GA 9804	ABD, 1998	K. Hayden
<b><u>Türkiye'den izole edilen suşlar</u></b>		
ANT10	Antalya, 2005	Laboratuvar
ANT117	Antalya, 2003	Laboratuvar
DEN12	Denizli, 2005	Laboratuvar
EL14	Elazığ, 2001	E. Seker
ISYr1	Isparta, 2006	Laboratuvar
IYr2	İstanbul, 2008	N. Turk
KA012	Kayseri, 2008	Laboratuvar

KM27	Kahraman Maraş,2002	Laboratuvar
L14	Zonguldak, 2006	Laboratuvar
M22	Muğla, 1999	H. Cagirgan
M45	Muğla, 2000	H. Cagirgan
M72	Muğla, 2002	H. Cagirgan
M84	Muğla, 2005	H. Cagirgan
ME128	Mersin, 2007	S. Ozer
ME17	Mersin, 2007	S. Ozer
RARDE-07-1	Rize, 2007	Laboratuvar
SAYr14	Sakarya, 2004	Laboratuvar
TMP 08-9	Trabzon, 2007	Laboratuvar
TCO-07-10	Trabzon, 2007	Laboratuvar
TSE-07-5	Trabzon, 2007	Laboratuvar
TA-07-12	Trabzon, 2007	Laboratuvar
TT-07-2	Trabzon, 2007	Laboratuvar
Yr118	Antalya, 2007	Laboratuvar
Yrnif	İzmir, 2000	N. Turk

## 2.1. Lipopolisakkarit İzolasyonu

*Yersinia ruckeri* izolatları -80 °C’de stok kültür ortamından çıkartıldıktan sonra steril öze yardımıyla TSA’ya ekildi. 29°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra LPS izolasyonu işlemine geçildi. *Y.ruckeri* ekimi TSA çoğaldıktan sonra koloniler fosfat tamponlu PBS içerisine konularak bakteri yoğunluğu ortalama 1,0 OD olacak şekilde spektrofotometrede (Shimadzu UV 2550, Japonya) 525 nm dalga boyunda ayarlandı. Yoğunluğu ayarlanan bakteri 1,5 ml’lik tüplere pipet yardımıyla alındı ve 3000 g’de 4 dakika santrifüj edildi, çöktürüldü. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra pelletler 200 µl Laemmlerli buffer (%2 SDS, %10 gliserol, %5 β-mercaptoethanol, %0,01 bromophenol blue, 60 mM Tris-HCl; pH 6,8) ile karıştırıldı ve 10 dakika 90°C’de kaynatıldı. Sonra soğutulan örnekler üzerine 1,5 µl Proteinaz K (25 mg/ml) eklendi ve 60°C’de 90 dakika inkübe edildi. SDS-PAGE için %4’lük yükleme ve %12’lik yürütme jeli hazırlandı. Hazırlanan örnekler SDS-PAGE’e yüklendi ve 150 V 35 mA akımda 70 dk. yürütüldü (Romalde vd., 1993).



### **2.3. Dış Membran Protein İzolasyonu**

Bir gün önceden bakteri ekimi yapıldı ve bakteri PBS (137 mM sodyum klorür, 2,7 mM potasyum klorür, 10 mM disodyum fosfat ve 1,8 mM potasyum fosfat, pH 7.4) içerisinde yoğunluğu 525 nm dalga boyunda 1,0 OD olacak şekilde ayarlandı. Örnekler prob sonikatör (Sonics Vibra-Cell, VC 505, USA) yardımıyla bir dakika buz içerisinde sonikasyona tabi tutulduktan sonra santrifüj edildi. Bakteri süspansiyonu 1,5 ml'lik tüplere alındı. 3000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı döküldü. Tüpteki çöken kısmın üzerine Laemmlı buffer konuldu ve 10 dakika kaynatıldı. Kaynatmadan sonra soğutulan örnekler üzerine 1,5 µl Proteinaz K (25 mg/ml) eklendi ve son olarak 60°C'de 60 dakika inkübe edildi. Hazırlanan örnekler SDS-PAGE'e yüklendi ve 150 V 35 mA akımda 70 dakika yürütme tamponunda (25 mM Tris Base, 192 mM Glycine, %0,1 SDS) yürütüldü (Davies, 1990).

### **2.4. SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Çözelti ve Jellerin Hazırlanması**

#### **2.4.1. Amonyum Persülfat (%10 APS)**

100 mg amonyum persülfat tartılarak üzerine 1ml saf su konuldu. Her gün taze olarak hazırlandı.

#### **2.4.2. Akrilamid/Bis (%30 T, %2,67 C)**

14,6 g akrilamid tartılarak 50 ml saf su ile tamamlandı. 0,4 g N'N'-metilen-bis-akrilamid tartılarak 50 ml saf su ile tamamlandı. Bu ikisi karıştırılarak üzerine 150 ml saf su konularak 250 ml'ye tamamlandı. 4 °C'de karanlıkta saklandı. Bu çözelti oda sıcaklığında koyu renkli şişede 2-3 ay muhafaza edilebilir.

#### **2.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat (%10 SDS w/v)**

1 g SDS tartılarak üzerine 9 ml saf su konuldu ve 10 ml'ye tamamlandı.

#### 2.4.4. Fix/stop Solüsyonu

25 ml glacial asetik asid üzerine 225 ml saf su konularak 250 ml'ye tamamlandı.

#### 2.4.5. Gümüş Boyama Solüsyonu

1 g silver nitrat, 1,5 ml %37 formaldehit, 1000 ml saf su ile tamamlandı.

#### 2.4.6. Developer Solüsyonu

1,5 ml %37 formaldehit, 200 µL 10 mg/mL sodyum tiyosülfat, 30 g sodyum karbonat, 1000 ml saf su ile tamamlandı.

#### 2.4.7. Gümüş Boyama Aşamaları

LPS ve DMP izolasyonu yapılan *Y. ruckeri* suşlarının SDS-PAGE'de yürütme işleminden sonra, jeldeki bantların görünümü için gümüş boyama tekniği kullanıldı. Bu yöntem Tablo 2'de gösterilen aşamalar takip edilerek yapılmıştır.

Tablo 2. Gümüş boyama yöntemi

Aşama	Solüsyon	Süre
A	fix/stop solüsyonu	30 dakika
B	saf su	2 dakika
C	B'yi 2 kere tekrarla	2x2 dakika
D	staining solüsyonu	30 dakika
E	saf su	10 saniye
F	geliştirici su (4-10 C)	45-60 dakika (Bantlar görünene kadar)
G	fix/stop solüsyonu*	10 dakika
H	saf su	2 dakika

#### 2.4.8. Resolving Jel (Alt Jel)

Alt jel %4'lük hazırlandı. 6,1 ml DDI H<sub>2</sub>O, 1,3 ml %30 Acrylamide/Bis, 2,5 ml Jel bufer, 0,1 ml %10 (w/v) SDS. 50 µl %10 APS ve 5 µl TEMED konuldu. Bu jel yüklemeyen bir saat önce hazırlandı.

#### 2.4.9. Stacking Jel (Üst Jel)

Üst jel %12'lik hazırlandı. 3,4 ml DDI H<sub>2</sub>O, 4,0 ml %30 Acrylamide/Bis, 2,5 ml Jel bufer, 0,1 ml %10 (w/v) SDS. 50 µl %10 APS ve 10 µl TEMED konuldu. Bu jel yüklemeyen yarım saat önce hazırlandı. Jel cam plaklar arasına konulduktan sonra üzerine hava ile temasının kesilmesi ve daha çabuk polimerizasyonu için ethanol konuldu.

#### 2.4.10. İzolatların Biyokimyasal Karakterlerinin Belirlenmesi

*Yersinia ruckeri* izolatlarının biyokimyasal karakterlerinin belirlenmesi amacıyla bu izolatlara *Y. ruckeri*'nin tanımlanması için tüm izolatlara ornitin dekarboksilaz (O), arjinin dihidrolaz (ARG), lizin dekarboksilaz (Lys), sitrat (CiT), üreaz (U), triptofan deaminaz (TDA), voges proskauer (VP), jelatin (GEL), eskulin hidrolizi (ESC), motility (MOT), glikoz fermentasyonu (GLU), mannitol (MAN), sorbitol (SOR), amygdalin (AMY), inositol (INO), ramnoz (RHM), sukroz (SUC), melibioz (MEL), laktoz (LAK), ksiloz (XYL), metil red (MR) ve arabinoz (ARA) biyokimyasal testleri yapılmıştır. Ayrıca Tüm izolatların kanlı agar da hemolizi oluşumu testi yapıldı (Benson, 1985).

#### 2.4.11. LPS ve DMP Profillerinin Analizi

Bantların analizi Bionumerics Gelcompar II software'i (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak yapılmıştır. Farklı izolatların bantları arasındaki benzerlik, %2,5 tolerans ve %1 optimizasyon yapılarak Dice benzerlik katsayısı ile hesaplanmıştır. Kümeleme analizi ile dendrogram [unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA)] oluşturulmuştur.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Biyokimyasal Test Sonuçları

*Y. ruckeri*'nin tanımlanması için yapılan klasik testlerle ilgili sonuçlar incelendiğinde *Y. ruckeri* izolatlarının fenotipik özelliklerinin büyük ölçüde benzer olduğu görülmüştür. Tüm izolatların kanlı agar besiyerine ekimi yapıldığında alfa hemolizi oluşturduğu gözlenmiştir. Tüm izolatlarda sitokram oksidaz negatif ve katalaz pozitif, H<sub>2</sub>S, inositol, ramnoz, sukroz, amygdalin, melibioz ve laktoz negatiftir. IYr2, ISYr1, ME17 ve EL14 dışındaki tüm izolatlarda bakterilerin oksijeni fermente ettiği (O/F testi pozitif) saptanmıştır. Sorbitol testi yönünden kullanılan referans suşlardan NCIMB1315, 3020 ve 3018'in sorbitolu fermente ederek pozitif sonuç verdiği, 3019 adlı suşun negatif sonuç verdiği görülmüştür. Sorbitolu fermente etme özelliklerine göre biyotip 1 ve biyotip 2 olarak izolatlar iki grupta toplanmıştır. Altı *Y. ruckeri* izolatı Biyotip 1 olarak belirlenirken diğer 34 izolat ise sorbitolu fermente etmediğinden Biyotip 2 olarak bulunmuştur. Hareketlilik yeteneklerine göre ise kırk izolatın pozitif sonuç verdiği görülmüştür. *Y. ruckeri* suşlarının onsekizinin Tween 20 ve Tween 80'i hidrolize edemediği görülmüştür (Tablo 3).

Tablo 3. *Yersinia ruckeri* İzolatlarının Biyokimyasal Karakterizasyon Test Sonuçları.

Suşlar	Yer	Biyokimyasal Testler																			
		O	ARG	LYS	CIT	U	TDA	VP	GEL	GLU	MAN	SOR	SUC	ARA	GAS	MOT	MR	XY	ESC	TW20	TW80
NCIMB1315		+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
3020	İtalya	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
3018	İtalya	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
3019	İtalya	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Biyotip 1 (sorbitol fermentasyonu)																					
L14	Zonguldak	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
GA97016	ABD	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
TA-07-12	Trabzon	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
GA 97126	ABD	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
MSA 3016	ABD	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
TT-07-2	Trabzon	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Biyotip 2 (sorbitol fermentasyonu)																					
TŞE075	Trabzon	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
ALG 94-88	ABD	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
LV-01	ABD	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
ALG 94-883	ABD	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
ATCC 29479	ABD	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
MO 688	ABD	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
GA 9707	ABD	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
GA 99045	ABD	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
GA 9804	ABD	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-

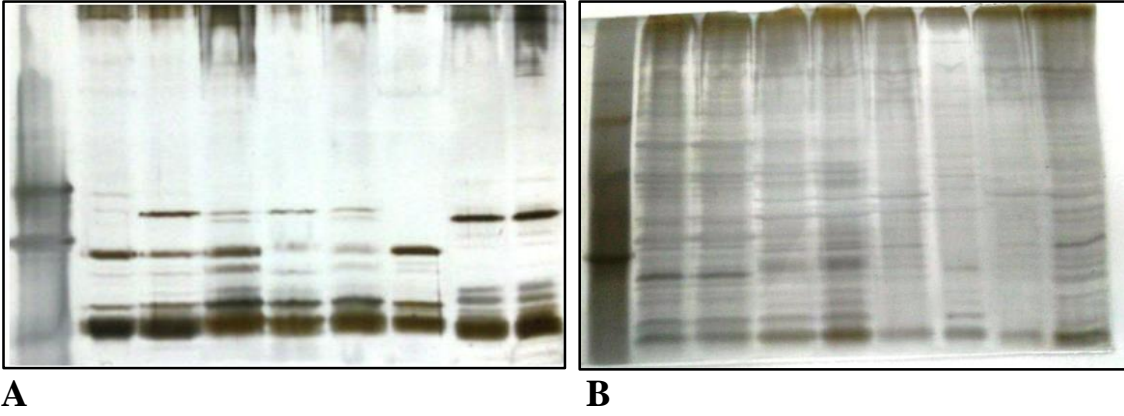
Tablo 3'ün devamı

Suşlar	Yer	Biyokimyasal Testler																			
		O	ARG	LYS	CIT	U	TDA	VP	GEL	GLU	MAN	SOR	SUC	ARA	GAS	MOT	MR	XY	ESC	TW20	TW80
RARDE071	Rize	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
TCO0710	Trabzon	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
TA0712	Trabzon	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Kfe691/97	İtalya	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
M22	Muğla	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
M45	Muğla	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
M72	Muğla	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
M84	Muğla	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
KM27	Maraş	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Yr118	Antalya	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
SAYr14	Sakarya	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
ANT117	Antalya	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
IYr2	İstanbul	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Yrnif	İzmir	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
ANT10	Antalya	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
DEN12	Denizli	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
KA012	Kayseri	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	
ISYr1	Isparta	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ME17	Mersin	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
EL14	Elazığ	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
ME128	Mersin	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-

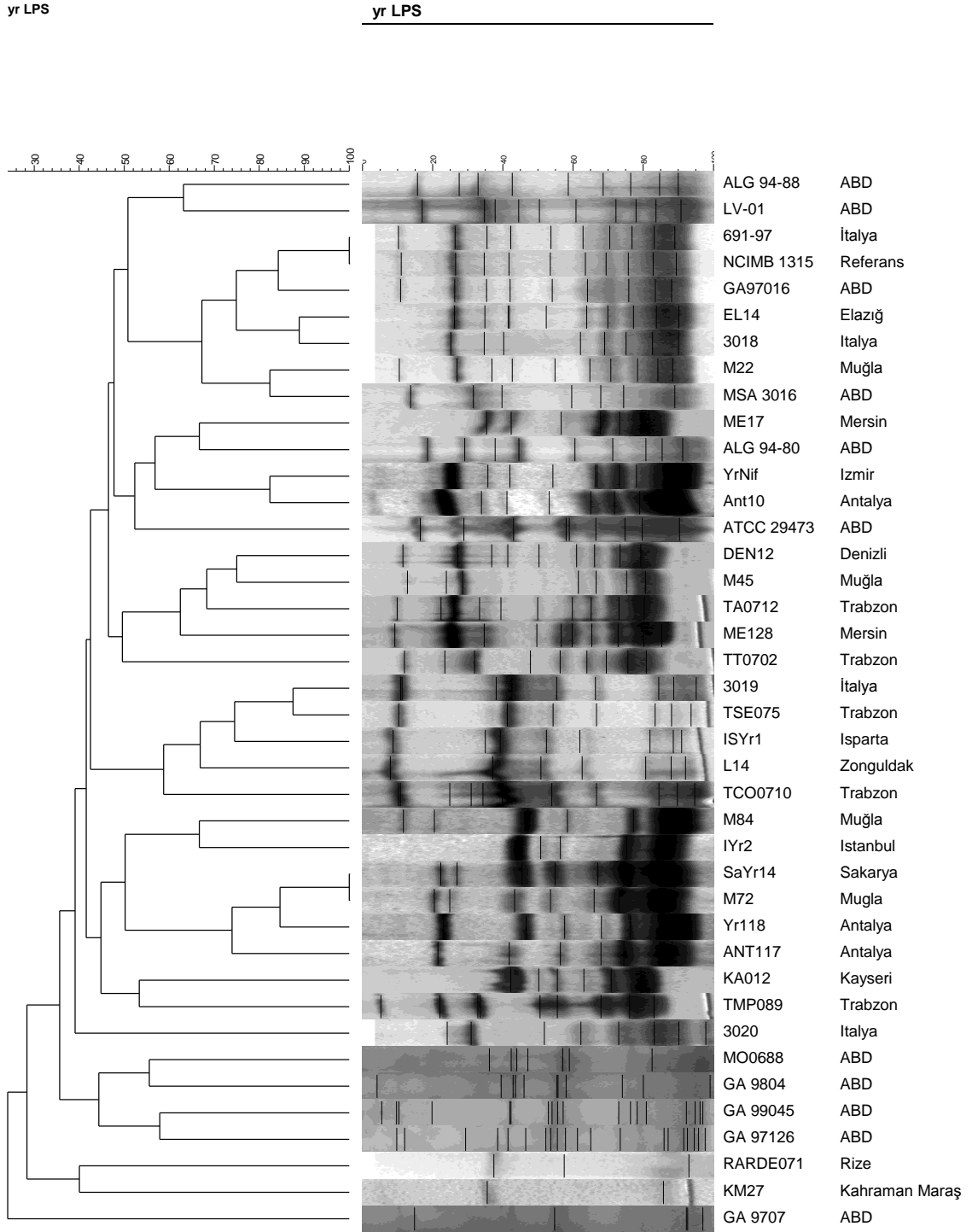
### 3.2. SDS-PAGE Analiz Sonuçları

Ülkemizdeki farklı bölgelerden ve dünyanın farklı ülkelerinden izole edilen ve *Y. ruckeri* olduğu biyokimyasal testler ve API 20E kiti ile tanımlanan 40 izolatın LPS ve DMP izolasyonu yapıldıktan sonra SDS-PAGE tekniği kullanılarak suşlar arasındaki benzerlikler karakterize edilmiştir (Şekil 4). *Y. ruckeri* suşlarının LPS ve DMP profilleri, gümüş boyama yapıldıktan sonra görüntülenmiş ve fragmanların molekül ağırlıklarına göre ayrımı yapılarak suşlar arası farklılıklar ve benzerlikler belirlenmiştir.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 M 1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4. SDS-PAGE ham görüntüleri örnek sekiz suş (A: Lipopolisakkarit, B: Dış zar proteini, M: Marker)

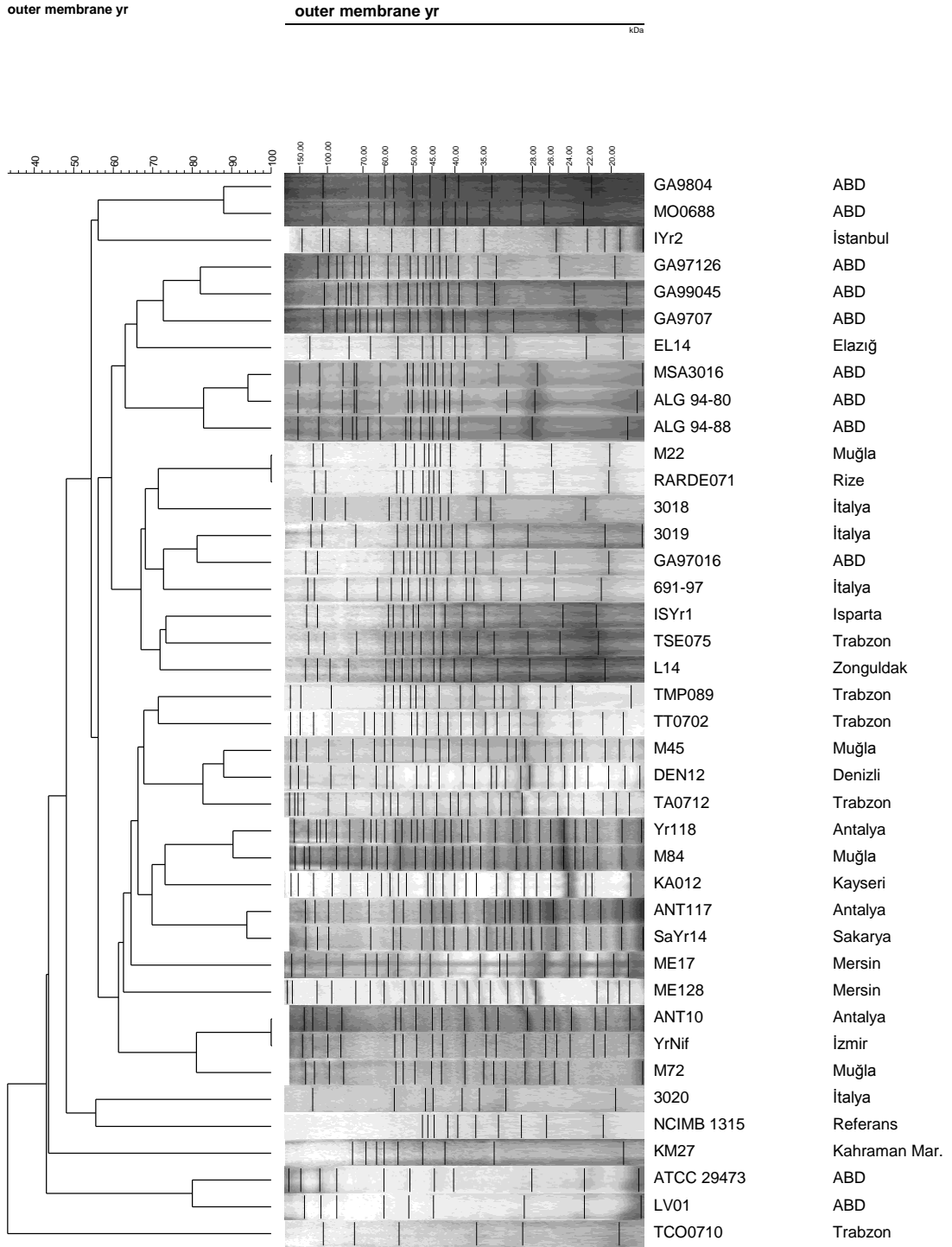


Şekil 5. Lipopolisakkarit dendogramı



Kırk adet *Y. ruckeri* suşunun LPS profillerinin SDS-PAGE'de analizi sonucu 3 ile 20 arasında farklı fragmentler oluşarak 14 adet farklı küme belirlenmiştir (L1-L14). Bu sonuçlara göre izolatlar arası benzerlik oranları çok yüksek değildir ( $\leq$  %60). Amerikadan izole edilen Alg94-88 suşu ile LV-01 suşu %62 benzerlik oranı ile L1 kümesini oluştururken, 691-97 (İtalya), NCIMB 1315 referans suş, GA97016 (Amerika) EL14 (Elazığ), 3018 (İtalya), M22 (Muğla) ve MSA3016 (Amerika) suşlarında L2 kümesini %66 benzerlikle oluşturmuşlardır. L1 ve L2 kümeleride birbirleriyle %50 benzerlik göstermektedirler. L3 kümesini Mersin (ME17), Amerika (Alg9480), İzmir (Yrnif) ve Antalya (Ant10) suşları oluşturmakta ve bu suşlar ATCC 29473 referans suşu ile %52 ilişkilidir. Denizli (Den12) Muğla (M45), Trabzon (TT0712, TT0702) ve Mersin (ME128) suşlarında L4 kümesini oluşturmaktadırlar. Trabzon (TSE075, TCO0710), Isparta (ISYr1) ve Elazığ (L14) suşları da İtalya (3019) suşu ile ilişkili olup, L5 kümesini oluşturmuştur. L6 kümesini ise M84 ve Iyr2 suşları %66 benzerlikle oluşturmuştur. L7 ise SaYr14, M72, Yr118 ve Ant117 suşları tarafından oluşturulurken, L5 ve L6 kümeleri de birbirlerine %50 benzemektedirler. L8 kümesi de %54 benzerlikte Kayseri (Ka012) ve Trabzon (TMP089) suşlarından oluşmaktadır. 3020 İtalya suşu da tek başına L9 kümesini oluşturmuştur ve diğer suşlarla %40 benzerdir. L10 ve L11 kümelerini Amerikan suşları oluştururken L12 kümesini Rize (RARDE071) ve Kahraman Maraş (KM27) suşları oluşturmuştur. GA9707 (Amerika) izolatu ise diğer tüm izolatlardan uzak olup tek başına L14 kümesini oluşturmuştur (Şekil 5).

Kırk adet *Y. ruckeri* suşunun DMP profillerinin SDS-PAGE'de analizi sonucu 6 ile 29 arasında farklı fragmentler oluşarak 14 adet farklı küme belirlenmiştir (D1-D14). Bu sonuçlara göre suşlar arasında benzerlik oranlarının düşük olduğu tespit edilmiştir ( $\leq$  %80). D1 kümesi benzerlik oranları %90 olan GA9804 (ABD) ile MO0688 (ABD) suşlarından oluşmaktadır ve IYr2 (İstanbul) suşu bu iki suş ile %55 benzerdir. D2 kümesi benzerlik oranı %82 olan GA99045 (ABD) ile GA97126 (ABD) suşunu içermektedir ve GA9707 (ABD) suşu ile bu izolatlar arasında %75 benzerlik vardır. EL14 (Elazığ) suşununda bu izolatlarla arasında %65 oranında bir benzerlik tespit edilmiştir. D3 kümesi 10 ABD suşundan 3 tanesini içermektedir. ALG94-80 (ABD) ile



Şekil 6. Dış membran proteinlerinin dendrogramı

MSA3016 (ABD) suşları arasında %95 benzerlik bulunmaktadır ve bu iki suşun ALG94-88 (ABD) suşu ile %80 benzerliği tespit edilmiştir. D4 kümesi, benzerlik oranları %100 olan RARDE071 (Rize) ile M22 (Muğla) suşlarından oluşmaktadır ve bu suşlar 3018 (İtalya) suşu ile de %75 benzerlik bulunmuştur. D5 kümesi GA97016 (ABD) suşu ve 3019 (İtalya) suşu arasında %80 benzerlik görülmüştür ve 691-97 (İtalya) ile bu iki suş arasında %75 benzerlik tespit edilmiştir. Dört İtalya suşunun ikisi bu kümede bulunmaktadır. D6 kümesi, benzerlik oranı %70 olan TSE075 (Trabzon) ve ISYr1 (Isparta) suşlarından oluşmaktadır. L14 (Zonguldak) suşuda bu iki suş ile %65 oranında benzerdir. D7 kümesi benzerlik oranı %70 olan TT0702 (Trabzon) ve TMP089 (Trabzon) suşlarından oluşmaktadır. D8 kümesi benzerlik oranı %85 olan DEN12 (Denizli) ve M45 (Muğla) ve bu iki suşa %80 oranında benzeyen TA0712 (Trabzon) suşundan oluşmaktadır. D9 kümesi ise benzerlik oranı %90 olan M84 (Muğla) ve Yr118 (Antalya) suşlarından ve bunlara %70 oranında benzeyen KA012 (Kayseri) suşundan oluşmaktadır. D10 kümesi ise SaYr14 (Sakarya) ve ANT117 (Antalya) suşu ile birbirine %90 oranında benzerdir. D11 kümesi, benzerlik oranı %100 olan YrNif (İzmir) ve ANT10 (Antalya) suşundan oluşmaktadır ve bu iki suş ile M72 (Muğla) birbirlerine %80 oranında benzerdirler. D12 kümesi referans suşlardan NCIMB1315 ile 3020 (İtalya) suşlarından oluşmaktadır. D13 kümesi benzerlik oranları %85 olan LV01 (ABD) ile ATCC29473 (ABD) suşlarından oluşmaktadır. Bu iki *Y. ruckeri* suşunun benzer oluşunu göstermektedir. D14 kümesi iki tane Mersin, referans, Kahramanmaraş ve bir Trabzon suşundan oluşmaktadır. Bu suşların diğer suşlar ile benzerlik oranları oldukça düşüktür (Şekil 6).

## 4. TARTIŞMA

### 4.1. Biyokimyasal Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yersiniozis, alabalık işletmelerinde özellikle yavru döneminde ülkemizde ve dünyada önemli kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle birçok araştırmacı bu hastalığın epidemiyolojisi hakkında araştırmalar yapmışlardır. Ülkemizde yurt içi ve yurt dışından izole edilen *Y. ruckeri* izolatları arasında epidemiyolojik ilişki bakımından yeterince araştırma yapılmamıştır. Bu nedenle hastalığın kaynağının ne olduğu, nereden ve nasıl yayıldığı araştırılan konulardır. Bakterilerin serotip farklılıkları sorbitolü fermente etme yeteneği ile ilgilidir (Bullock ve Cipriano, 1990; Diler, 2004). Bu çalışmada kullanılan 40 izolatin üremesi 29°C’de sağlanmıştır. Bakterilerin sorbitolü fermente etme özelliklerine göre suşlar biyotip 1 ve biyotip 2 olarak sınıflandırılmıştır.

*Yersinia ruckeri* suşlarıyla yapılan çalışmalarda; suşlar arasında serolojik farklılıklar olmasına rağmen, fenotipik özelliklerinin çok benzer olduğu belirtilmiştir. *Y. ruckeri*’nin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde, klasik mikrobiyolojik testler ve API 20E hızlı teşhis kiti kullanılmaktadır (Austin ve Austin, 1999; Horne ve Barnes, 1999; Davies ve Frerichs, 1989). Bu araştırmada geleneksel biyokimyasal testleri kullanarak elde edilen sonuçlar açısından suşlar arasında çok büyük farklılıklar görülmemiştir. Bu yönüyle izole edilen *Y. ruckeri* suşları homojen bir yapı göstermiştir. Elde edilen biyokimyasal sonuçlar, ülkemizde daha önce *Y. ruckeri* ile yapılan çalışmalarla benzeşmektedir (Çağırgan ve Yüreklitürk, 1991; Savaşer ve Diler, 1997; Candan ve Yazıcı, 2000).

Yapılan araştırmalarda, bazı *Y. ruckeri* suşlarının tween 80’i hidrolize edemediği bildirilmiştir (Bullock vd., 1978; Davies ve Frerichs, 1989; Austin ve Austin, 1999). Davies ve Frerichs (1989), hareketsiz *Y. ruckeri* suşlarının tween 80’i hidrolize edemediği, Bush (1982) ise, hareketlilik ile tween 80 hidrolizi arasında bir ilişkinin olmadığını bildirmiştir. Çağırgan (1991), çalıştığı 20 adet *Y. ruckeri* suşunun hepsinin hareketli olduğunu, ancak bu suşlardan bir kısmının tween 80’i hidrolize etmediğini saptamıştır. Bu çalışmada ise, 40 adet *Y. ruckeri* suşunun hepsinin hareketli olduğu ve 40 suşdan 18’inin Tween 80’i ve Tween 20’yi hidrolize edemediği tespit edilmiştir. Tween 80’i hidrolize etmeyen 18 suşun hareketli olması Davies ve Frerichs’dan ayrılırken, Bush (1982) ve Çağırgan (1991) ile benzerlik göstermiştir.

*Yersinia ruckeri*'nin biyokimyasal özellikler bakımından homojen karakterde olup bazı suşlarda metil red, voges proskauer, lizin dekarboksilaz, arjinin dihidrolaz ve laktoz fermentasyon testlerinde farklılıklar görülebildiği bildirilmektedir (Ross vd., 1966; Stevenson vd., 1993; Wobeser, 1973). Bu çalışmada da kullanılan izolatlardan VP testinin 40 suşdan 10 tanesinin negatif sonuç verdiği, Lys testinin 40 suşdan 26'sının pozitif sonuç verdiği, ARG testinin 40 suşdan 8 tanesinin pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. *Yersinia ruckeri* 22°C'de inkübe edildiğinde katalaz, metil red, sitrat kullanımı, ornitin dekarboksilaz testlerinin pozitif, sitokrom oksidaz, indol üretimi, H<sub>2</sub>S üretimi, üreaz, glikozdan gaz üretimi testlerinin negatif olduğu bildirilmektedir (Bercovier, 1984). Geleneksel yöntemlerin dışında API 20E testinin de kullanılabilceği bildirilmiştir (Santos vd., 1993). Fakat API 20E testinde arjinin dihidrolaz, sitrat kullanımı, voges proskauer, jelatin ve sorbitol testlerinin hatalı pozitif veya negatif sonuç verebileceği ve etkenin *Hafnia alvei* ile karışabileceği belirtilmektedir (Davies, 1991; Rintamaki, 1986; Santos vd., 1993; Stevenson ve Daly, 1982).

*Yersinia ruckeri* suşlarının teşhisinde, klinik gözlemler, geleneksel testler ve API 20E hızlı teşhis kitinden yararlanılmıştır. Geleneksel mikrobiyolojik testleri kullanarak elde edilen sonuçlar açısından *Y. ruckeri* suşlarının fenotipik özelliklerinin büyük ölçüde benzer olduğu görülmüştür. API 20E sonuçlarına göre *Y. ruckeri* suşları arasında lizin dekarboksilaz ve jelatin hidrolizi testlerinde; geleneksel testler açısından bakıldığında Voges Proskauer testlerinde farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte lizin dekarboksilaz testinde suşların %32'sinin negatif olduğu tespit edilmiştir. *Y. ruckeri* suşları arasında lizin dekarboksilaz testi açısından farklılıklar olabileceğini ve suşların %88'inin pozitif olduğunu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar, *Y. ruckeri* suşları arasında jelatin hidrolizi testi sonucunda suşların %52'sinin pozitif olduğunu bildirilmiştir (Horne ve Barnes, 1999). Ayrıca *Y. ruckeri* Serotip 2'de VP testinin pozitif olduğunu bildirilmiştir (Romalde vd., 2003). Bu çalışmada ise *Y. ruckeri* suşlarının VP testinin pozitif sonuç verdiği her suşun serotip 2 özellikte olmadığı tespit edilmiştir.

*Yersinia ruckeri* serotipleri arasında sorbitolü fermente etme yeteneğinin değişebileceği, serotip 2 suşlarının sorbitolü fermente etme yeteneğiyle diğer serotiplerden ayrılabilceği belirtilmiştir (Schill vd., 1984; Horne ve Barnes., 1999). Buna göre biyotip 1'de çıkan pozitif sonuçlar, altı izolatın serotip 2 özellikte olduğunu ve biyotip 2'de çıkan negatif sonuçlar, otuz izolatın serotip 1 özellikte olmalarından kaynaklanmaktadır.

## 4.2. SDS-PAGE Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Proteinlerin analizi için en fazla kullanılan yöntemlerden birisi SDS-PAGE olup proteinlerin karakterizasyonunda ve karşılaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir (Altıntaş, 1991; Altıntaş ve Yolasığmaz, 1997). İzole edilen birçok suşun birbirleriyle karşılaştırılması, suşlar arasında ayrımı geliştirmek ve suşların teşhisinin doğruluğunu ispatlamak zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Sınıflandırmaya yönelik ilk çalışmalar genelde morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyon temel alınarak yapılmıştır. Özellikle fenotipik özellikler suşların ayrımı için yeterli olmadığından değişik metodlar geliştirilmiştir (Bağcı vd., 1991). Mikrobiyal sistematiğe protein jel elektroforezi, özellikle aynı türler veya alt türlere ait suşların hücresel proteinlerin karşılaştırılması ve ayrımı için hassas bir teknik olarak yıllardır kullanılmaktadır (Bruce ve Jordens, 1991; Çökmüş ve Yousten, 1994; Kampfer, 1995; Nick vd., 1999).

Bu çalışmada *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesi amacıyla SDS-PAGE metodu optimize edilerek kullanılmıştır. Bu çalışmada benzerlik oranı düşük bulunan *Y. ruckeri* suşları LPS analizinde ve DMP analizinde 14 kümede toplanmıştır. Bu da suşlar arasında önemli heterojenitenin olduğunu göstermektedir. Benzerlik oranları düşük bu izolatların çoğunun birbirine uzak alanlardan elde edilmesi ve bakteri suşlarının mutasyon ve benzeri bazı olaylar sonucu genetik yapılarında değişiklik olabileceğini akla getirebilir. LPS profillerinin değerlendirmesinde, 10 tane ABD suşunun genel olarak L1, L2, L4, L5 ve L13 kümesinde bulunduğu tespit edilmiştir. L13 kümesinde 4 tane ABD suşu bulunmaktadır. Bu kümedeki suşların diğerlerinden önemli derecede ayrılması bakterilerin aynı orjinli olmaları şeklinde yorumlanabilir. ABD suşlarının farklı kümelerde bulunması ve benzerlik oranlarının çok yüksek olmaması ülkemizde izole edilen *Y. ruckeri* suşları ile ABD suşları arasında benzerlik oranının düşük olduğunu göstermekte ve bu genetik farklılığın mutasyon sonucu oluşabileceği söylenebilir. Dört İtalya suşu üç farklı kümede toplanmıştır (L2, L3, L8). Buldukları kümelerdeki izolatlar ile benzerlik oranları oldukça yüksektir ve bu kümelerdeki izolatların ülkemizin farklı bölgelerinden izole edilmiş olması, İtalya suşlarının yine yurt dışından ülkemize gelip ve yurt içinde kontrolsüz bir şekilde balık transferi ile yayıldığını göstermektedir. Dört Muğla suşunun ise dört farklı kümede toplandığı belirlenmiştir (L4, L7, L9, L11). Muğla suşlarından sadece bir tanesinin ABD suşu ile aynı kümede olup ve benzerlik oranlarında yüksek olması, bu iki suşun LPS profillerinin aynı olabileceğini göstermektedir. Buldukları diğer kümedeki

suşların izole edildikleri bölgelerin birbirine yakın olması, benzerlik oranlarının bazıları ile yüksek olması yine bilişsiz bir şekilde yapılan balık hareketlerini akla getirmektedir. Beş Trabzon suşunun her biri farklı kümelerde toplanmıştır. L8 kümesinde bulunan suşun İtalya suşu ile benzerlik oranı çok yüksektir. Diğer kümedeki suşlar ülkemiz bölgelerinden izole edilmiştir. L7 kümesinde bulunan Trabzon suşunun, Muğla ve Denizli suşları ile benzer olması ve bu iki suşun aynı orjinli olması, Trabzon suşunun Ege bölgesinden Karadeniz bölgesine geldiğini gösterebilir. Üç tane Antalya suşu iki farklı grupta toplanmıştır. Bu suşlardan orjinlerinin Ege bölgesi olanlar ile benzerlik oranları yüksek bulunmuştur. Ege bölgesinden Akdeniz bölgesine yayılmış olabileceği ve izole edildiği yıllar arasında yakınlık bulunması, bu bakterilerin zamanla mutasyon gibi nedenlerle genetik yapılarının değişebileceği düşünülebilir. Denizli suşunun Muğla suşu ile aynı kümede bulunması ve orjinlerinin aynı bölge olması bu bölgedeki çiftlikler arası balık transferlerinin yapıldığını akla getirebilir. İzmir suşunun bir Antalya suşu ile aynı kümede olup benzerlik oranlarında yüksek olması yine benzer ihtimalleri akıllara getirmektedir. Bir tane olan Sakarya suşunun bir Muğla suşu ile %100 benzer olması ve buldukları bölgelerin hemde izole edildikleri yılların birbirine yakın olması bu bölgeler arası balık hareketlerinin yapılmış olabileceğini akla getirmektedir. Kahramanmaraş, Kayseri, İstanbul, Rize, Zonguldak gibi suşların diğer suşlar ile benzerlik oranları oldukça düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar ülkemizde bölgeler arası balık hareketlerinin ne kadar bilinçsiz yapıldığını ve geniş yayılım gösterdiğini kanıtlar düzeyindedir. DMP profillerinin değerlendirilmesinde, ABD suşlarının çoğu dört küme içerisinde toplanmıştır. Benzerlik oranları oldukça yüksektir (D1, D2, D3, D4). D1 kümesinde bulunan GA9804 (ABD) ve MO0688 (ABD) suşunun izole edildiği yılların farklı olmasına rağmen orjinlerinin aynı olması ve OMP profilleri yönündende benzerlik oranlarının yüksek olması aralarındaki akrabalık derecesini artırmaktadır. ABD suşlarının orjinlerinin aynı olduğu şekilde yorumlanabilir. Bu suşlar arasında benzerlik oranının yüksek olması, suşların bölge arası transferi ile mümkün olmuş olabilir. İtalya suşları iki farklı kümede toplanmıştır. Aynı küme içerisinde Rize, Muğla ve ABD suşlarındanda bir tane bulunmaktadır. İtalya suşlarının birinin Rize suşu ile aynı kümede olması ve benzerlik oranlarının çok yüksek olması bu iki suşun orjinlerinin aynı olduğu yönünde düşünülebilir. Antalya suşları üç farklı kümede toplandığı görülmüştür (D9, D10, D11). Aynı kümelerde birer tane Muğla, Sakarya, İzmir ve Kayseri suşlarıda bulunmaktadır. Antalya suşlarının diğer suşlar ile benzerlik oranları oldukça yüksektir. Bu suşların orjinlerinin birbirine yakın bölgeler

olması, bilinçsiz ve kontrolsüz yapılan balık hareketleri sonucu bu bölgeler içerisinde yayılım gösterdiği düşünülebilir. Trabzon suşları genel olarak iki kümede toplanmıştır (D6, D7). İki Trabzon suşunun aynı kümede bulunması, benzerlik oranlarının yüksek olması ve aynı bölgede bulunması bu iki suşun birbirine yakın olduğunu göstermektedir. Kümelerden bir tanesinde Isparta ve Zonguldak suşunun bulunması, bu suşların Akdeniz bölgesinden Karadeniz bölgesine yayılım gösterdiğini akıllara getirmektedir. Farklı bir küme içerisine Denizli, Muğla ve bir Trabzon suşu toplanmıştır. Bu üç suşun benzerlik oranları birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Bu sonuçlar Ege bölgesinde balık hareketlerinin bilinçsiz yapıldığı bölgede dar alanda balık ve yavru alışverişinin sıklıkla yapıldığı gerçeğini akıllara getirmektedir. Kahramanmaraş, bir adet Mersin, Referans suş, İstanbul, Kayseri suşlarının diğer suşlar ile benzerlik oranlarının çok düşük bulunduğu görülmüştür.

Genel olarak incelediğimizde ABD suşlarının aynı kümelerde bulunduğu ve bu kümelerde bulunan diğer suşların aynı ya da birbirine yakın bölgelerden izole edilmiş olmasının, *Y. ruckeri*'nin suşlarının yurtdışı orjinli olup daha sonra ülkemize geldiğini göstermektedir. 3018 (İtalya) suşunun aynı zamanda serotip 1 suş olmasından dolayı, Rize ve Muğla suşlarının hem DMP benzerlik oranlarının yüksek derecede benzer olması hemde biyokimyasal test sonuçlarının birbirine yakın olması serotip 1 olduklarını desteklemektedir. Bu izolatların Karadeniz ve Akdeniz bölgesi arasında çiftliklerden balık transferi ile mümkün olması düşünülebilir. Diğer kümelerdeki suşların orjinlerinin de yakın bölgeler olması *Y. ruckeri*'nin ülkemizde yayıldığını göstermektedir.



## 5. SONUÇLAR

Gram negatif, hareketli, çubuk şeklinde enterik bir bakteri olan *Y. ruckeri*'nin teşhisi; genellikle fenotipik (morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal) özellikleri incelenerek yapılmaktadır. Beş kıtaya yayılmış olan *Y. ruckeri* suşlarıyla yapılan çalışmalarda; suşlar arasında serolojik farklılıklar olmasına rağmen, fenotipik özelliklerinin benzer olduğu belirtilmiştir. *Y. ruckeri*'nin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde, klasik mikrobiyolojik testler ve API 20E hızlı teşhis kiti kullanılmaktadır. *Y. ruckeri* suşlarının genotipik özelliklerinin belirlenmesinde moleküler teşhis yöntemleri de kullanılmaktadır. Son yıllarda moleküler bakteriyolojide ve birçok laboratuvar ortamında in vitro koşullarda genetik profillemeye yapılması amacıyla SDS-PAGE yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır.

*Yersinia ruckeri*'nin genotiplendirilmesi amacı ile çeşitli ülke ve Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden izole edilen *Y. ruckeri*'nin 40 suşu tez çalışmasında kullanılmıştır. *Y. ruckeri* suşlarının genotipik profillerinin belirlenmesi amacıyla, gram negatif bakterinin hücre duvar yapısında bulunan LPS ve DMP analizleri SDS-PAGE'de incelenerek genotiplendirilmesi yapılmıştır. *Y. ruckeri*'nin 40 suşu incelenerek bu suşlar arasında akrabalık ilişkisi ve suşlar arası çeşitlilik belirlenmiştir. Laboratuvar koşullarında yapılan biyokimyasal testlerde *Y. ruckeri* suşlarının fenotipik özelliklerinin büyük ölçüde benzer olduğu ancak sorbitolde farklılık görüldüğü tespit edilmiştir. Sorbitol testi yönünden biyotip 1 grubu pozitif ve biyotip 2 grubu negatif sonuç vermiştir.

Ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinden ve dünyadaki farklı bölgelerindeki gökkuşağı alabalıklarından toplanan 40 adet *Y. ruckeri* suşunun 2 adet referans suş (NCIMB1315 ve ATCC29473) ve 3 adet serotip suş (3018 serotip 1, 3019 serotip 2, 3020 serotip 3) ile karşılaştırmalı olarak LPS ve DMP profilendirilmesi SDS-PAGE yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Benzerlik oranları düşük bulunan *Y. ruckeri* suşlarının LPS profillerinin incelenmesinde 14 kümede toplanmıştır. Yapılan DMP profilleri de 14 kümede toplanmıştır. Bu da suşlar arasında önemli taksonomik heterojenitenin olduğu belirlenmiştir.

## 6. ÖNERİLER

Ülkemizde ilk defa 1991 yılında Denizli yöresinde bir çiflite izole edilen *Y. ruckeri*, ülkemizde ve dünyada geniş bir yayılım göstermektedir. *Y. ruckeri*, yersiniosis hastalığına neden olmaktadır. Hastalığın yayılım gösterdiği ülke sayısı ilk izole edilışinden itibaren giderek yayılım göstermiştir. Yetiştiricilik anlamında ülkemizdeki çiftliklerimizde, özellikle yavru dönemde, stok yoğunluğunun fazla olduğu dönemlerde ve diğer farklı nedenler dolayısı ile önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Yersiniosis etmeni olan *Y. ruckeri*'nin doğru teşhis ve tedavi edilmesi ve yayılımının bilinmesine yönelik bu çalışma önemli sonuçları ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar temelinde su ürünleri sektöründeki bilinçli üreticilere, konu ile ilgilenecek araştırmacılara ve sektörle ilgili yasal düzenlemelere katkı sağlayabilecek öneriler şöyle sıralanabilir;

1. Bu çalışmada biyokimyasal ve moleküler metotlar kullanılarak *Yersinia ruckeri*'nin genetik çeşitliliği ve yayılımı konusunda bilgi verilmiştir. Üretim aşamasında sıklıkla karşılaşılan diğer balık patojenleri içinde benzer çalışmalar yapılmalı ve korunma stratejileri belirlenmelidir.

2. SDS-PAGE profillerine göre virüent gen belirlenmeli ve ileride patojenite çalışmaları yapılmalı uygun izolat belirlenerek koruyucu aşı denemeleri yapılmalıdır.

3. *Yersinia ruckeri* ve benzeri hastalık etmenlerinin yayılmasında en önemli etken olan balık hareketleri mümkünse T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ya da üniversiteler kontrolünde olmalıdır. Büyük çapta üretim yapan işletmeler sertifikalandırılmalı ve diğer üreticiler yavru ve yumurta alımı konusunda bilgilendirilmelidir.

## 7. KAYNAKLAR

- Altinok, I., Grizzle, J.M. ve Liu, Z., 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction, Diseases of Aquatic Organisms, 44, 29-34.
- Altinok, I. ve Kurt, I., 2003. Molecular Diagnosis of Fish Diseases: A Review. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 3, 131-138.
- Altinok, I., Kayis, S. ve Capkın, E., 2006. *Pseudomonas putida* Infection in Rainbow Trout, Aquaculture, 261, 850-855.
- Altıntaş, N., 1991. SDS Poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin seperasyonu. Türkiye Parazitol. Derg., 15, 119 - 129.
- Altıntaş, N. ve Yolasıǧmaz, A., 1997. Proteinlerin analizi ve SDS PAGE. Özcel, M.A., Altıntaş, N., Ed. Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın., 15, 321-341.
- Altun, S. ve Diler, Ö., 1996. *Yersinia ruckeri* ile Enfekte Edilmiş Gökkuşaağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Hematolojik İncelemeler, Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta, 23, 301-309.
- Altun, S., 2001. *Yersinia ruckeri* Suşlarının Bazı Antijenik Ve Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 105s.
- Altun, S., Kubilay, A. ve Diler, Ö., 2010. *Yersinia ruckeri* Suşlarının Fenotipik ve Serolojik Özelliklerinin İncelenmesi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16, 223-229.
- Amandi, A., Hiu, S.F., Rohovec, J.S. ve Fryer, J.L., 1982. Isolation and Characterization of *Edwardsiella tarda* from Fall Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), Appl. Environ. Microbiol., 43, 1380-1384.
- An, H, Marshall, M.R, Otwell, W.S ve Wei, C.I., 1988. Electrophoretic Identification of Raw and Cooked Shrimp Using Various Protein Extraction Systems. J. Food Sci. 53, 313-318.
- Arda, M., 1985. Genel Bakteriyoloji. Ankara.Üniversitesi. Veteriner Fakültesi Yayınları No: 402, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 531s.
- Arda, M., Seçer, S. ve Sarıeyyüpoğlu, M., 2005. Balık Hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara, 230s.

- Aslan, A., 2006. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi İle Proteinlerin Analizi, Yüksek Lisans Semineri, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Elazığ.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1987. "Bacterial Fish Pathogenes Disease in Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Ltd. Chicherter, 364 p.
- Austin, B. and Austin D.A., 1993. Bacterial Fish Pathogens Disease in farmed and wild fish. Second Edition. Ellis Norwood Ltd. Kingland, 208-227.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1999. Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish. 3rd (Revised) ed., 457, Praxis Publishing, Chichester, UK.
- Austin, B. and Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 4. Edition Springer Publishing, New York.
- Babic, M., Hujer, A. M. and Bonomo, R. A., 2006. What's new in antibiotic restance? Focus on lactomases. Dry Resist Updot, 9, 142-56.
- Bağcı, H., Shareef, S.R. ve Özdamar, K., 1991. Bacillus thuringiensis varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması, Doğa Tr of Biology 5, 70-81.
- Balta, F., Çağırğan, H. ve Kayıs, Ş., 2005. Kültürü Yapılan Gökkusagı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) İzole edilen *Yersinia ruckeri*'nin İdenfikasyonunda API 20E Testinin Kullanılabilirliği, Türk Sucul Yaşam Dergisi, 4, 434-237.
- Baron, S. Salton, M.R.J. ve Kim, K.S., 1996. "Structure". In Baron S *et al.*. *Baron's Medical Microbiology* (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch.
- Benson, H.J., 1985. Microbiological Applications: A Laboratory Manual in. General Microbiology, 4th Ed. W. C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.
- Bercovier, H. and Mollaret, H.H., 1984. Genus XIV. *Yersinia* Van Loghem 1944 15. AL. In: Krieg, N.R. (ed.), Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, 489-506, 1 Baltimore, William Wilkins.
- Bernardet, J.F., Campbell, A.C. and Buswell, J.A., 1990. *Flexibacter maritimus* is The Agent of 'Black Patch Necrosis' in Dover Sole in Scotland, Diseases of Aquatic Organisms, 8, 233-237.
- Bonnefoi, M. Bernard, G. ve Labie, C., 1986. Gel Electrophoresis: A Qualitative Method for Detection of Duck and Goose Liver in Canned Foie Gras. J.Food Sci. 51, 5, 1362-1363.
- Bragg, R.R and Henton, M.M., 1986. Isolation of *Yersinia ruckeri* From Rainbow Trout in South Africa, Bulletion Europen Associated Fish Pathology, 6, 1, 5-6.

- Bruce, K.D. and Jordens, J.Z., 1991. Characterization of noncapsulate *Haemophilus influenzae* by whole-cell polypeptide profiles, restriction endonuclease analysis, and RNA gene restriction patterns. J. Clin. Microbiol., 29,2, 291-296.
- Buller NB., 2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals. CABI Publishing, U.K.
- Bullock, G.L. ve Snieszko, S., 1975. Enteric Redmouth Disease of Salmonids, Fish Disease Leaflet, 42, 1-7.
- Bullock, G.L., Stuckey, H.M. and Shotts, E.B., 1977, Early Records of North American and Australian Outbreaks of Enteric Redmouth Bacterium, Fish Health News, 6, 96-7.
- Bullock, G. L. and Anderson, D. P., 1984. Immunisation against *Yersinia ruckeri*, cause of enteric red mouth disease. In: (ed. De Kinkelin, P.) Symposium of Fish Vaccination. OIE, Paris, 1-5p.
- Bullock, G.L. and Cipriano, R.C., 1990. Enteric Redmouth Disease in Salmonids. United States Department of the Interior Fish and Wild Life Service, Fish Disease Leaflet, 67, 4.
- Busch, R.A. and Lingg, A.J., 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric edmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 32, 2429–2432.
- Busch, R.A., 1978. Enteric Redmouth Disease (Hagerman starin), Marine Fisher. Rev., 40, 42-51.
- Busch, R. A., 1982. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: Antigenes of fish pathogens. Development and production of vaccines and serodiagnostics. Symposium International de Tallories. (ed. D. P. Anderson, et al.), Fondation Marcel Merieux, Lyon, 202 – 223.
- Busch, R.A., 1982. “Enteric Redmouth Disease”, Symposium International de Talloires 10-12 May., 1982, Les Antigenes Des Micro-organismes Pathogens de Poissons. Collection Fondation Marcel Merieux, 201-224.
- Christian, Raetz ce Chris Whitfield, 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins Annu. Rev Biochem. 71,635-700.
- Coduri, R. J. ve Rand A G., 1972. Vertical Plate Gel Electrophoresis for the Differentiation of Meat Species. J. Assoc. off. Anal. Chem, 461-466.
- Cossarini, D., 1985. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to Titrate Rainbow Trout Serum Antibodies Against to Pathogens, *Yersinia ruckeri* and *Egtved virus*, Aquaculture, 49, 197-208.
- Çağrgan, H. ve Yürekli Türk O., 1991, First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout farm in Turkey. In: The Fifth Conference of EAFP, Disease of Fish and Shellfish, August, Budapeşte, Book of Abstracts, 131.

- Çökmüş, C. and Yousten, A.A., 1994, Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by SDS-PAGE. J Invertebr Pathol 64, 267-268.
- Davies, R. L. and Frerichs, G. N., 1989. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas, Journal of Fish Diseases, 12, 357 – 365.
- Davies, R.L., 1991. Colonel Analysis of *Yersinia ruckeri* Based on Biotypes, Serotypes and Outer Membrane Protein Types. Journal of Fish Disease, 14,221-228.
- Ekici, K. ve Akyüz, N., 2003. Farklı Hayvan Türlerine Ait Çiğ Etlerin SDS-PAGE Yöntemiyle Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Van. 14,2,78-82
- Ellis, A.E., 1988. Vaccination against enteric redmouth (ERM). In: Ellis, A.E. (ed) Fish vaccination, Academic Press, London, 85-92.
- Frerichs G.N. and Roberts R.J., 1989, The bacteriology of Teleosts. In: Fish pathology (ROBERTS, R.J. ed.) Second Edition. Bailliere Tindall, London, 289-320pp.
- Garcia, J.A., Dominguez, L., Larsen, J.L. and Pedersen, K., 1998. Ribotyping and plasmid profiling of *Yersinia ruckeri*, Journal of Applied Microbiology, 85, 949–955.
- Giovanni PB., 1988. Differentiation Between Helix and Achatina Snail Meat by Gel Electrophoresis. J.Food Sci. 53,2,652-653.
- Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Cutuli, M.T., Domenech, A., Dominguez, L. and Fernandez-Garayzabal, J.F., 1999, Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout, Applied and Environmental Microbiology, 65, 346–350.
- Heinert T. ve Thorson B., 1980. Tircortspezifische Eiwei-Sdifferentzierung Protein und Enzymmuster Bei Reh (*Capreolus capreolus*) und Hirsch. (*Cervus elephus*). Fleischwirtsch. 60,1682-1688.
- Hofmann K., 1978. Charakterisierung Der Proteine in Muskeln Und Inneren Organen Von Rind Und Schwein Mithilfe Der SDS-Polyacrylamidgel- Electrophorese. Kongre, Bd. III,L. 2:3, Kulmbach.
- Hofmann, K. ve Bluchel, E., 1991. Blut und Muskelforbsloff Trennung und Bestimmung Unter Anwendung Der SDS-Electrophores. Fleischwirtsch. 71,11,1290-1293.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sueath, P. H. A., Satley, J. T. and Williams S. T., 1994. Bargey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Williams and Witkins, A, Waverly Company, 787.

- Horne MT., 1999. Barnes AC: Enteric redmouth disease. In, Woo, PTK, Bruno DW (Eds): Fish Diseases and Disorders, Viral, Bacterial and Fungal Infections. 455-477, CABI Publishing.
- Höyem, T. ve Thorson, B., 1970. Myoglobin Electrophoretic Patterns in Identification of Meat From Different Animal Species. J.Agr. Food Chem.18,737- 742.
- Hunter, V.A., Knittel. M.D. and Fryer, J.L., 1980. Stres Induced Transmission of *Yersinia ruckeri* Infection From Carriers to Recipient Steelhead Trout *Salmo gairdneri* Richardson, Journal of Fish Diseases., 3, 467-472.
- Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R., 1993. Bacterial Diseases of Fish, Halsted Pres, New York.
- Jones, A.L. ve Spring-Mills E., 1988. The Liver and Gallbladder, Cell and Tissue Biology A Textbook of Histologyde, 6.Ed. Ed. Weiss L. München, Urban&Schwarzenberg Inc, 696.
- Kayış, Ş., 2009. Trabzon ve Rize İller’inde Bulunan Bazı Alabalık İşletmelerinde Görülen Bakteriyel Hastalıkların Tespiti ve Bazı Etkenlerin Çoklu PCR ile Teşhisi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon, 73.
- Kampfer, P., 1995. An efficient method for preparation of extracts from gram-positive bacteria for comparison of cellular protein patterns, Journal of Microbiological Methods, 21, 55-60.
- Kato, T. ve Deki, M., 1977. Identification of Meat Species by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Kanzei chuo Bunsek. 17,17-21.
- Kırkan, S., Göksoy, E.Ö., Kaya, O. ve Tekbıyık, S., 2006. In-vitro Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic Bacteria in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), Turk. J. Vet. Anim. Sci., 30, 377-341.
- Kim, H. ve Shelef, L.A., 1986. Characterization and Identification of Raw Beef, Pork, Chicken, And Turkey Meats by Electrophoretic Patterns of Their Sarcoplasmic Proteins. J. Food sci. 51,3,731-735.
- Kubilay, A., 1997. Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Patojen Bakteri *Yersinia ruckeri*’ye Karşı Antikor Üretimi ve Tespiti Üzerinde Bir Arastırma, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 118s.
- Kubilay, A. ve Diler, Ö., 1999. Gökkuşuğu Alabalıklarından İzole Edilen *Yersinia ruckeri* Suşlarının Serotiplerinin Lam Aglutinasyon Testi ile Tespiti, Süleyman Demirel Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 6, 40-47.
- Lasee, B.A., 1995. Introduction to Fish Health Management, U.S. Fish and Wildlife Service La Crosse Fish Health Center 555, Lester Avenue Onalaska, Wisconsin, 54650.
- McCormick, R.J, Reeck, G.R. ve Kroph, D.H., 1988. Separation and Identification of Porcin Sarcoplasmic Proteins by Reversed Phase High Performance Liquid

Chromotography and Palyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Agr. Food Chem. 36: 1193-1198.

- McDaniel, D., 1979. Fish Health Section Bluebook: Procedures for The Detection and Identification of Certain Fish Pathogens. Fish Health section, American Fisheries Society, Betheseda, Maryland, 118.
- Mefut, A., Emre, Y., Diler, Ö., Altun, S. ve İnce, İ., 2007. Akdeniz Bölgesindeki Bazı Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde Bakteriye Balık Patojenlerinin Tespiti ve Kontrolü. Ulusal Su Günleri, Antalya, 9-18s.
- Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B.D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M. and Lindstrom, K., 1999. *Sinorhizobium arboriz* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from Leguminous trees in Sudan and Kenya, Int. Syst. Bacteriol., 49, 1359-1368.
- Parisi, E. and Agulari, D. 1985. Methods Differentiating Meats of Different Species of Animals. "Biochemical Identification of Meat Species" R.L.S. Patterson (Ed). Elsevier Applied Science Publishers Ltd., p. 40-49, England.
- Post, G. 1987. Enteric redmouth disease (Yersiniosis). In: Textbook of Fish Health (ed. by G. Post), THF Publications, Neptune City, NJ, 47–51 pp.
- Prichard, R. and Tait, A., 2001. The Role of Molecular Biology in Veterinary Parasitology, Veterinary Parasitology, 98, 169-194.
- Rintamaki, P., Voltanen, E.T. ve Frerichs, G.N., 1986. Occurrence of *Yersinia ruckeri* Infection in Farmed Whitefish, *Coregonus peled* Gmelin and *C. muksun* Pallas, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Northern Finland. Journal of Fish Diseases, 9,137-140.
- Rittig, MG et al. 2004. "Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes"Journal of Leukocyte Biology 5,4,196–200.
- Roberts, M.S., 1983. A Report of an Epizootic in Hatchery Reared Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson at an English Trout Farm, Caused by *Yersinia ruckeri*, Journal of Fish Diseases, 6, 551-552.
- Rodgers, C.J., 1991. The Usage of Vaccination and Antimicrobial Agents for Control of *Yersinia ruckeri*, Journal of Fish Diseases 14, 291-301.
- Rodgers, C.J., 1992. Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies, Journal of Fish Diseases, 15, 243–254.
- Romalde, J., Planas, E., Sotelo, J.M. ve Toranzo, A.E., 2003. First description of *Yersinia ruckeri* serotype O2 in Spain. Bulletin Of the European Association of Fish Pathologist, 23, 135-138.



- Ross, A.J., Rucker, R.R. ve Ewing, W.N., 1966. Description of a bacterium associated with remouth disease of rainbow trout, Canadian Journal of Microbiology, 12, 763-770.
- Rucker, R.R., 1966. Redmouth Disease of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*), Bull. off. Int. Epizoot., 65, 825-830.
- Sağlam, Y.S., Işık, N., Arslan, A. ve Erer, H., 2006. Erzurum Bölgesindeki Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* W. 1792) *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia ruckeri* İzolasyonu ve Patolojik İncelemeler. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 1,1-2, 6-10.
- Sanders, E. and Fryer, J.L., 1988. Bacteria of Fish. In: Methods in Aquatic Bacteriology, (AUSTIN, B vd.,) John Wiley & Sons, Cichester, New York, Brisbane, Toronto,Singapore, 115-170p.
- Santos, Y., Romalde, J.L., Bandin, I., Magarinos, B., Nunez, S. ve Barja, Toranzo, A.E., 1993. Usefulness of the API-20E System for the Identification of Bacterial Fish Pathogens. Aquaculture, 116,111-120.
- Savas, H., Yıldırım, Y., Kurtoglu, İ.Z., Başçınar, N., Alkan, A., Gürel, M., Ergün, H., Firidin, S. ve Zengin, B., 2006. Ordu İli Perşembe İlçesinde Faaliyet Gösteren Yüzer Kafes İşletmelerinin Çevresel Etki ve Su Ürünleri Sağlığı Yönünden İzlenmesi Projesi, Sonuç Raporu, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trabzon.
- Stevenson, R.M.W. and Daly, J.G., 1982, Biochemical and Serological Characteristic of Ontario Isolates of *Yersinia ruckeri*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 39, 870-876.
- Stevenson, R., Flett, D. ve Raymond, B.T.. 1993. Enteric Redmouth (ERM) and Other Enterobacterial Infections of Fish pp.80-99 (Inglis, V., Roberts, R.J., Bromogo, N.R. Eds.) Bacterial Diseases of Fish, Blackwell Science Ltd., London.
- Stewart, I, Schluter, P.J. ve Shaw, G.R., 2006. “Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health-a riviwe”. *Environ Health* 5,7.
- Yonar, M.E., 2008. *Yersinia ruckeri* ile Enfekte Edilen Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nın Tedavisinde Proposilin Kullanılması, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Tanrıkul, T.T., Çağırğan, H. ve Tokşen, E., 1996. Bakteriyel Balık Hastalıkları. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi, 34,105-127.
- Timur, G. ve Timur, M., 1991, An outbreak of enteric redmouth disease in farmed rainbowtrout (*Onchorynchus mykiss*) in Turkey, Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 11, 182-183.

- Türe, M, 2011. *Lactococcus garvieae*'nin Feotipik Ve Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Trabzon.
- Valtonen, E.T., Rintamaki, P. and Koskivaara, M., 1992. Occurrence and Pathogenicity of *Yersinia ruckeri* at Fish Farms in Northern and Central Finland, Journal of Fish Diseases, 15, 163-171.
- Van der Ley, P., Heckels, J.E., Virji, M., Hoogerhout, P.ve Poolman, J.T., (September 1991). "Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria spp". *Infection and immunity* 59,9,2963–71.
- Waltman, W. D. and Shotts, E. B., 1984., A medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 41, 804-808.
- Wobeser, G.. 1973. An Outbreak of Redmouth Disease in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. J. Fish Res. Bd. Canada, 30,571-575.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Rize’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Rize’de tamamladı. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği bölümünde lisans öğrenimine başladı ve 2010 yılında bu fakülteden mezun oldu.

2010 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitime başladı. Orta derecede İngilizce bilmektedir.