

## Gökkuşuğu alabalığında karşılaşılan bazı bakteriyel hastalık etkenlerinin hızlı teşhisi

### Özet

Bu çalışmada, PCR yöntemi ile gökkuşuğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) hastalığa neden olan beş farklı patojenin (*Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophila* ve *Renibacterium salmoninarum*) hızlı teşhis edilebilmesi için beşyüz elli balık doku (solungaç, böbrek, ağız, deri ve yüzgeç) örneğinden direk olarak elde edilen saf DNA'lar kullanılmıştır. Çalışmamızdaki balık hastalık etkenlerini tespit edebilmek için beş farklı hedef gen bölgesi (gryA, p57, ompTS, n-DNA ve YER) kullanılmış ve bunların PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, hastalıklara neden olan etken bakteriler, dokulardan izole edilen DNA'lardaki hedef genlerin PCR methodu kullanılarak tespit edilmesiyle 3-4 saat içerisinde tanımlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** PCR, Balık hastalığı, Gökkuşuğu alabalığı

## Rapid detection of some bacterial diseases in rainbow trout

### Abstract

In this study, we used five hundred fifty different tissue samples (gill, kidney, mouth, skin and fin) to detect five pathogens (*Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophila* ve *Renibacterium salmoninarum*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with using direct PCR methods. Five targeted genes (gryA, p57, ompTS, n-DNA and YER) have been chosen to detect the causative agents of diseases. As a result, five infection agents of rainbow trout were identified and determined within 3-4 hours time by using direct PCR from fish tissues, without any microbiological examination methods.

**Key Words:** PCR, Fish Diseases, Rainbow Trout

### Giriş

Ülkemiz, alabalık yetiştiriciliğinde Avrupa' da ilk sıralarda yer almaktadır (TUİK, 2017). Yetiştiriciliğinin istenilen düzeyde gelişmesi ve ülke ekonomisine katkı sağlanması balıkların uygun koşullarda yetiştirilmesi, hastalıklardan korunması ve gerekli önlemlerin alınması gibi faktörlere bağlıdır. Yetiştiricilikte hastalık etkenlerinin neler olduğunu belirlemek için geçmişte ve halen kullanılan klasik yöntemlerden bazıları mikrobiyolojik tanımlama, biyokimyasal, immünolojik veya histopatolojik test yöntemleridir (Diler, 2000). Bu şekildeki konvansiyonel tanımlama yöntemleri çok zaman harcayan ve yüksek emek gerektiren metotlar olması sebebiyle daha avantajlı alternatif ve modern metotların aranmasını zorunlu kılmıştır. Literatüre bakıldığında araştırmacıların genetik yöntemleri kullanarak bazı türlerde çalışmalar yaptığı görülmektedir. Örn: *Aeromonas* bakterisinin balık dokularında oluşturduğu hemolizden sorumlu olduğu düşünülen aerosin ve hemolisin genleri PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyon) yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Uma vd., 2010). 16S rRNA ve 23S rRNA gibi bazı diğer belirteç genleri kullanılarak hastalık yapan bakteriler tür bazında karakterize edilmiştir (Murcia vd., 2005).

## Araştırma Makalesi

İ. Tülay ÇAĞATAY<sup>1</sup>  
Erkan GÜMÜŞ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Kampüs, Antalya, Türkiye

<sup>2</sup>Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Kampüs, Antalya, Türkiye

Sorumlu yazar  
(Corresponding Author)

İ. Tülay ÇAĞATAY  
[tulaycagatay@akdeniz.edu.tr](mailto:tulaycagatay@akdeniz.edu.tr)

### Makale Bilgisi

Geliş: 18-05-2018

Kabul: 29-11-2018

<https://dx.doi.org/10.31797/vetbio.425026>



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Balcazar vd. (2007) yaptıkları araştırmada ise balık dokularından alınan örneklerde *A.salmonocida* tespiti için RT-PCR ve cDNA teknolojisi kullanarak bakterileri teşhis etmiştir. Yeh vd. (2006)'nın yaptıkları bir araştırmada 16S rDNA geni kullanılarak *F.columnare* bakterisi tespit edilmiştir. Gibello vd. (1999) alabalıkta *aroA* geni ve PCR kullanılarak *Y.ruckeri* varlığını göstermişlerdir. Salmonlarda bakteriyel böbrek hastalığına neden olan *R.salmoninarum* tarafından sentezlenen ekstraselüler protein geni (*msa*) Rhodes vd., 2004) ve *p57* geni kullanılarak genotipleme çalışması gerçekleştirilmiştir (Powell vd., 2005).

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalığı işletmelerinde bakteriyel enfeksiyonlara neden olan *A.salmonicida*, *A.hydrophila*, *Y.ruckeri*, *F.psychrophila* ve *R.salmoninarum*'un mikrobiyolojik yöntemler kullanılmadan, enfekte balık dokularından direk olarak saflaştırılan bakteriyel DNA'larda, hedef genlerin (*gryA*, *p57*, *ompTS*, *n-DNA* ve *YER*) PCR ile belirlenmesine dayalı, türe özgül, doğru ve hızlı tespiti gerçekleştirilmiştir.

## Materyal ve metot

### Örneklerinin toplanması ve kontrol bakteri suşlarının üretimi

Çalışmada kullanılacak balık örnekleri 2012-2014 tarihleri arasında Kemer (Muğla) bölgesinde faaliyet gösteren Alabalık işletmelerinden toplanmıştır. Steril pamuklu örnek çubukları ile farklı enfekte dokulardan alınmış örnekler, 1mL'lik fosfat tamponu (PBS) (145 mM NaCl, 8.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0) içeren eppendorf tüplerine konulup, Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Araştırma Laboratuvarına getirilmiştir ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Kontrol bakteri suşları olarak *A.salmonicida* ATCC33658, *A.hydrophila* ATCC7966, *Y.ruckeri* ATCC29473, *F.psychrophilum* NCIMB1947 ve *R.salmoninarum* ATCC33209 kullanılmıştır. Kontrol suşlarının rutinde üretilebilmeleri için Austin ve Austin (2007)'de belirtilen ortam ve koşullar uygulanmıştır.

### DNA saflaştırılması, primerler ve PCR optimizasyonları

Tüm enfekte dokulardan PBS tamponu içerisinde laboratuvara transfer edilen örneklerin DNA'ların saflaştırılması için Qiagen DNA extraction kiti (Qiagen, USA) kullanılmıştır ve saflaştırma kit manueline göre gerçekleştirilmiştir. PCR analizleri için Tablo 1' de verilen ileri ve geri primer setleri; *ompTS* primeri için Khushiramani vd. (2007), *YER* primeri için Roozbahani vd. (2009), *gyrB* primerleri için Hidalgo vd. (2008) referanslarındaki diziler modifiye edilerek yeniden dizayn edilmiş ve ticari firma aracılığıyla sağlanmıştır. Tüm PCR işlemleri laboratuvarımızda yapılan çalışmalar ile optimize edilmiştir ve reaksiyon tüplerinin içerisine 12.5µl 10xPCR tamponu, 7.5µl 20mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM 12.5µl uygun ileri ve geri primerleri, 10mM 20µl dNTP karışımı, 0.5µl (1U) Taq polimeraz enzimi (Thermo, USA) ile toplamda 50µl hacme distile su ile tamamlanmıştır. Bu karışımlar PCR tüplerine eşit olarak paylaştırılmıştır. Üzerine DNA'ları ilave edilmiş ve termal döngü cihazında (Techne, USA) çoğaltılmıştır. *A.salmonicida* tespitinde *gyrA* geni PCR protokolü; 20 döngü, 95°C, 30sn denatürasyon, 63°C'de 30sn bağlanma, 72°C, 30sn uzama ve 5dk son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. *A.hydrophila*'da *ompTS* geni PCR protokolü ise 30 döngü, 94°C, 1.5dk denatürasyon, 62°C'de 30sn bağlanma, 72°C, 1.5dk uzama ve 7dk son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. *F.psychrophilum* tespitinde *n-DNA* geni PCR protokolü; 35 döngü, 94°C, 1dk denatürasyon, 62°C'de 1dk bağlanma, 72°C, 5.5dk uzama ve 7dk son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. *Y.ruckeri* tespitinde *YER* geni PCR protokolü; 30 döngü, 94°C, 30sn denatürasyon, 62°C'de 30sn bağlanma, 72°C, 30sn uzama ve 5dk son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. *R.salmoninarum* tespitinde *p57* PCR protokolü; 35 döngü, 94°C, 1dk denatürasyon, 62°C'de 1dk bağlanma, 72°C, 2.5dk uzama ve 10dk son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Gen ürünleri %1'lik agaroz jelde (Amplichem, Almanya) yürütülmüş ve 10mg/ml ethidium bromide (Sigma, USA) ile boyanıp UV translüminatör ile (DNR, USA) görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

**Tablo 1.** Primer listesi ve dizileri  
**Table 1.** Primer list and sequences

No	Bakteri Adı	Gen Adı	Primer Adı	Primer Sekansı (5'-3')	Büyüklik (bp)
1	<i>A. hydrophila</i>	ompTS	<i>ompTS-f</i> <i>ompTS-r</i>	5-GCAGTGGTTATGACAAAGACG-3 5-TTAGAAGTTGATTGCAGGGC-3	1008
2	<i>A. salmonicida</i>	gyrA	<i>Asg-1</i> <i>Asg-2</i>	5-TGGCATGGAAACATTCCCTCCT-3 5-GTCGCCTGCTTTTTCCAGCA-3	760
3	<i>Y. ruckeri</i>	YER	<i>YER8-F</i> <i>YER10-R</i>	5-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3 5-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3	575
4	<i>F. psychrophilum</i>	n-DNA	<i>FPI-f</i> <i>FP3-r</i>	5-GTTAGTTGGCATCAACAC-3 5-ACACTGGCAGTCTTGCTA-3	971
5	<i>R. salmoninarum</i>	p57	<i>G-6481-F</i> <i>G-6480-R</i>	5-GCGCGGATCCAAAATAAAAAAATTTTAGCGCTG-3 5-GCGCGGATCCCTGCGCAGGACCATCTTTGT-3	410

## Bulgular

### Klinik bulgular

250 adet enfekte balık örneklerindeki klinik bulgular; vücut üzerinde, iç organlarda ve ağız çevresinde lezyonlar, ülser ve yanık benzeri hemorajiler, ağız içinde kızarıklıklar, solungaçlarda renk solgunluk, nekroz oluşumları, sıvı birikimi şeklinde gözlenmiştir (Şekil 1).

### PCR bulguları

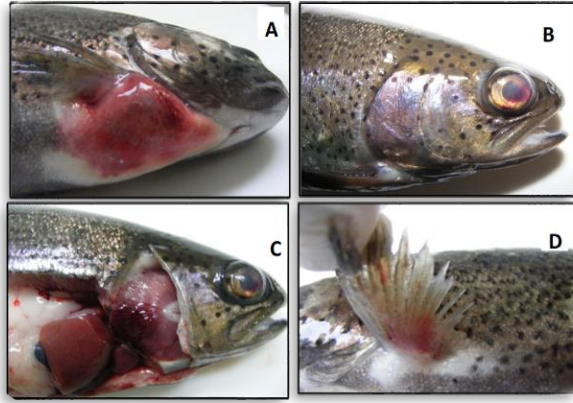
Alabalıkta hastalığa neden olan 5 farklı enfeksiyon etkeni, bu bakterilerde bulunan hedef genlerin PCR ile çoğaltılmasıyla tespit edilmiş ve doğru büyüklükteki gen ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 2). *A. hydrophila* bakterisi için ompTS hedef geni (1008 bp), *A. salmonicida* bakterisi için gryA geni (760 bp), *Y. ruckeri* bakterisini için YER geni (575 bp), *F. psychrophilum* bakterisini teşhis için n-DNA geni (971 bp) ve *R. salmoninarum* bakterisini için ise p57 geni (410 bp) tek tek PCR ile doğrulanmış ve tespit edilmiştir.

## Sonuç ve tartışma

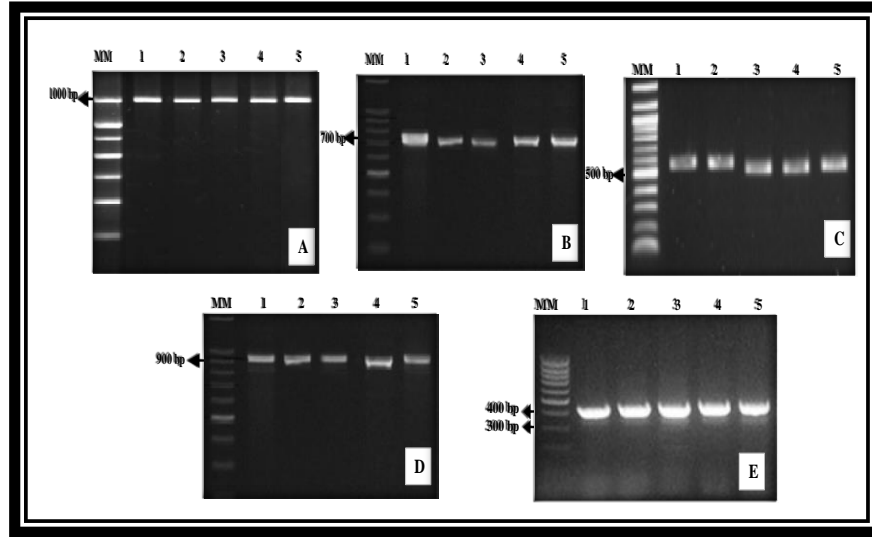
Ülkemizin alabalık yetiştiriciliğinde Avrupa'da ulaştığı seviyeyi koruyabilmesi ve sürekliliğini sağlayabilmesi için yetiştiriciliğin uygun koşullarda gerçekleştirilmesi, balıkların hastalıklardan korunması ve gerekli önlemlerin alınması gibi faktörlere bağlıdır. Gökkuşluğu alabalığı yetiştiriciliğinde hastalığın kısa sürede teşhisi, etkili hastalık kontrolü ve hızla önlemin alınması büyük ekonomik kayıpların önlenmesi açısından oldukça önemli ve gereklidir. Alabalık çiftliklerinde hastalıkları

tespit edebilmek için kullanılan tanısal işleyiş; hasta balığın laboratuvara getirilmesi, etken bakterilerin ayrı besi ortamlarına ekilmeleri, bunların 3 gün ile 3 hafta arasında üretimi, mikroskopik olarak incelenmesi ve/veya biyokimyasal testlerin yapılması şeklindedir (Austin ve Austin, 2007).

Moleküler biyoloji teknolojileri kullanarak etken bakteriyi üretmeden DNA'sındaki nükleik asit dizinin tespitine dayanan PCR yöntemi ile, izole edilip üretilebilen veya üretilemeyen, az sayıda bulunan canlı veya cansız hücreler saptanabilmektedir (Chu vd., 2005). Ayrıca bu yöntemle, tek seferde birden fazla hastalık etkeni aynı anda, çok daha hızlı ve düşük maliyet ile tespit edilebilmektedir (Cerro vd., 2002). Çalışmamızda gökkuşluğu alabalık işletmelerinden toplanan 250 balıktan toplamda 550 farklı enfekte doku (solungaç, böbrek, ağız, yüzgeç ve deri) örneğiden bakteriyel genomik DNA' lar ve 5 kontrol bakterisinin DNA'sı izole edilmiştir.



**Şekil 1.** Enfekte alabalıkta **A.** Deride lezyon ve hemoraji, **B.** Gözde ekzoftalmus ve hemoraji, **C.** Solungaçta hemoraji, **D.** Yüzgeçte hemoraji.  
**Figure 1.** Infected Rainbow Trout **A.** Skin lesions and hemorrhage, **B.** Exophthalmus and hemorrhage in eye, **C.** Hemorrhage in the gills, **D.** hemorrhage in the fin



**Şekil 2.** PCR sonuçları. MM: DNA belirteci **A.**1. *A. hydrophila* ve 2-3-4-5 balıktaki ompTS gen ürünleri. **B.** 1. *A. salmonicidia* ve 2-3-4-5 balıktaki gryA gen ürünleri **C.**1. *Y. ruckeri* ve 2-3-4-5 balıktaki YER gen ürünleri **D.**1. *F. psychrophilum* ve 2-3-4-5 balıktaki n-DNA gen ürünleri. **E.**1. *R. salmonarium* ve 2-3-4-5 balıktaki p57 gen ürünleri.

**Figure 2.** PCR results. MM. Molecular marker. **A.** ompTS gene products 1. *A. hydrophila* and 2-3-4-5 in fish. **B.** gryA gene products 1. *A. salmonicidia* and 2-3-4-5 in fish **C.** YER gene products 1. *Y. ruckeri* and 2-3-4-5 in fish **D.** n-DNA gene products 1. *F. psychrophilum* and 2-3-4-5 in fish. **E.** p57 gene product 1. *R. salmonarium* and 2-3-4-5 in fish.

Çalışılan tüm hedef genlerin tespitinde direk dokudan ve referans suşdan izole edilen iki farklı DNA örneğinde PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir *A. hydrophila* bakterisinin teşhisinde hedef gen ompTS-dış membran geni kullanılmıştır. 1008 bp büyüklüğünde 50 adet hedef gen ürünü *A. hydrophila* pozitif olarak gözlenmiştir. Literatürde *A. hydrophila* bakterisinin teşhisi için farklı enterotoxin genlerinin (act, alt ve ast) ve hemolizin yapımından sorumlu aerolysin geninin varlığına bağlı yapılan PCR çalışmaları mevcuttur (Kingombe vd., 2010; Chu vd., 2005). Çalışmamızda 1008 bp uzunluğundaki hedef gen bulgusu Khushiramani vd. (2007) yaptıkları çalışma sonuçları ile desteklenmektedir. İkinci etken bakteri olan *A. salmonicidia*'yı teşhis edebilmek için

gryA gen bölgesi kullanılmıştır. 760 bp büyüklüğünde 43 adet hedef gen ürünü *A. salmonicidia* pozitif sonuç vermiştir. Literatürde *A. salmonicida* alt türlerinin filogenisi veya tür belirlenmesi için 16S rDNA geni (Murcia vd., 2005), fstA geni (demir reseptör) (Hidalgo vd., 2008) ve vapA geni (Gustafson vd., 1992) gibi farklı genlerle yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızda DNA giraz enzimini kodlayan gryA geni, primer uzunluğu ve 3'-5' primer dizilişi literatürde yer alan diğer gen bölgelerinden çok farklı dizide olduğu bilinen bölgeler seçilmiştir. Bu diziler hem tekli hem de daha sonraki çalışmalarda çoklu PCR için çapraz sonuç vermemesi açısından uygun bulunmuştur. Araştırmamızda üçüncü olarak tanısını koymak istediğimiz etken bakteri *Y. ruckeri*'dir. Bu

bakteriyi teşhis edebilmek için hedef YER geni kullanılmıştır. PCR sonrası doğru büyüklükte çoğaltılan 29 hedef gen ürünleri agaroz jelde görüntülenmiş ve *Y.ruckeri* pozitif olduğu bulunmuştur. Literatüre bakıldığında *Y.ruckeri* ile ilgili 5-enolpurivil-3-fosfat sentetazı kodlayan *aroA* geni (Yugueros vd., 2001) ilgili çalışmalar mevcuttur. Bizim PCR amplicon bulgumuz olan 575 bç Roozbahani vd. (2009) tarafından kullanılan 16SrRNA YER geni amplifikasyonu ile benzerlikler göstermektedir. Bir diğer hastalık etkeni *F.psychrophilum* bakterisinin teşhisini yapabilmek için n-DNA hedef gen olarak kullanılmıştır. PCR yapılmış ve 971 bç büyüklüğünde çoğaltılan n-DNA gen ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir ve bakteriyel etken 73 adet PCR ürünüde pozitif olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızda *F.psychrophila* tanısında kullandığımız 971 bç uzunluğundaki n-DNA gen bölgesiyle, Onuk vd. (2010) yaptığı çalışmada kullanılan FP gen uzunluklarının benzer, fakat primer dizilerinin farklı olduğu görülmüştür. Son olarak *R.salmonarium*'un teşhisi için ise p57 geni kullanılmıştır. 2 farklı DNA örneğinde (direk doku ve pozitif kontrol bakterisi) ayrı ayrı PCR yapılmıştır ve 410 bp büyüklüğünde çoğaltılan 21 adet hedef p57 gen bölgesinin ürünleri agaroz jelde görüntülenmiş bu bakterinin tanımlaması yapılmıştır. Miriam vd. (1997) Atlantik salmonlarda bakteriyel böbrek hastalığının teşhisi için bu çalışmada kullanılan p57 protein antijen genini kullanmışlar, ancak daha küçük bir bölgeyi amplifiye etmişlerdir. Bizim çalışmamızda çoğaltılan bölge 80 bç daha uzun olup tekli PCR için daha uygun olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada konvansiyonel tanı yöntemlerine kıyasla daha avantajlı ve hızlı olan (3-4 saat), türe özgün duyarlılıkta, eş zamanlı yapılabilen, maliyeti düşük ve bakteriyel üretim gerektirmeden direk dokudan izole edilebilen DNA'lar ile PCR yöntemi kullanılarak beş bakteriyel etmenin tanısı gerçekleştirilmiştir. Bu metodoloji kullanılarak ileride geliştirilecek tanı kitleri ile balık popülasyonundaki riskleri takip etmek, yönetebilmek ve çiftliklerde hızlı hastalık tespiti yapılarak kısa zamanda önlemlerin alınmasını sağlamak açısından yararlı olacaktır.

## Kaynaklar

- Austin, B., Austin, D.A. (2007).** Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish. Springer, Praxis Publishing Chichester, UK.
- Balcazar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L. (2007).** Quantitative detection of *A.salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers. *J. Med. Mic.*, 56(3), 323-8.
- Cerro, A., Marquez, I., Gujarro, J.A. (2002).** Simultaneous detection of *A.salmonicida*. *Appl. Envir. Mic.*, 68(10), 5177-5180.
- Chu, W.H., Lu, C.P. (2005).** Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *A.hydrophila*. *J. Fish Dis.* 28(7), 437-441.
- Diler, Ö. Altun, S., Çalkuşu, F., Diler, A. (2000).** Gökkuşluğu alabalığı (*O. mykiss*)'nin yaşadığı ortam ile ilişkili kalitatif ve kantitatif bakteriyel florası üzerine bir araştırma, *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, 24, 251-259.
- Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Cutuli, M.T., Domenech, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzabal, J.F. (1999).** Development of a PCR assay for detection of *Y. ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Appl. Envir. Mic.*, 65(1), 346-350.
- Gustafson, C.E., Thomas, C.J., Trust, T.J. (1992).** Detection of *A.salmonicida* from fish by using PCR amplification of the virulence surface array protein gene. *App. Envir.Mic.*, 58(12), 3816-25.
- Hidalgo, R., Magi, G.E., Balboa, S., Barja, J.L., Romalde, J.L. (2008).** Development of a PCR protocol for the detection of *A.salmonicida* in fish by ampli. of the *fstA* gene. *Vet. Mic.*, 128(3), 386-394.
- Khushiramani, R., Girisha, S.K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2007).** Cloning and expression of an outer membrane protein ompTS of *A.hydrophila* and study of immunogenicity in fish. *Pro. Exp. Pur.*51(2): 303-7.
- Kingombe, C.I.B., D'Aoust, J.Y., Huys, G., Hofmann, L., Rao, M., Kwan, J. (2010).** Multiplex PCR method for detection of three *A. enterotoxin* genes. *Appl. Envir. Mic.*, 76, 425-433.
- Miriam, A., Griffiths, S.G., Lovely, J.E., Lynch, W.H. (1997).** PCR and probe-PCR assays to monitor broodstock Atlantic salmon ovarian fluid and kidney for presence of DNA of the fish pathogen *R.salmoninarum*. *J. Clin. Mic.*, 35(6), 1322-1326.
- Murcia, M.A.J., Soler, L., Saavedra, M.J., Chacón, M.R., Guarro, J., Stackebrandt, E. (2005).** Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *A.salmonicida* from *A. bestiarum*. *In. Mic.*, 8(4), 259-269.
- Onuk, E.E., Ciftci, A., Findik, A., Durmaz, Y. (2010).** Development and evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *F.psychrophilum*, *Y.ruckeri* and *A.salmonicida* in culture fisheries. *J. Vet. Sci.*, 11(3), 235-241.
- Powell, M., Overturf, K., Hogge, C., Johnson, K. (2005).** Detection of *R.salmoninarum* in chinook salmon, *O. tshawytscha*, using q-PCR. *J. Fish Dis.*, 28(10), 615-622.

- Rhodes, L.D., Coady, A.M., Deinhard, R.K. (2004).** Identification of a *msa* gene in *R.salmoninarum* and the associated virulence phenotype. *Appl.Envir.Mic.*, 70(11), 6488-94.
- Roobahani, M.R., Bandehpour, M., Haghghi-Khiabaniyan-Asl, A. Abdollahi, H., Kazemi, B., (2009).** PCR-Based detection of *Y. Ruckeri* Infection in Rainbow Trout Fish. *Asian J. Ani. Vet. Adv.* 4(5):258-62.
- TUİK, 2017.** Türkiye İstatistik Kurumu  
<http://www.tuik.gov.tr>. Alıntı tarihi: 2018
- Uma, A., Rebecca, G., Meena, S., Saravanabava, K. (2010).** PCR Detection of putative aerolysin and hemolysin genes in an *A.hydrophila* isolate from Koi carp (*Cyprinus carpio*). *Tamilnadu J. Vet. Anim. Sci.*, 6(1), 31-33.
- Yeh, H. Y., Shoemaker, C.A., Klesius P.H. (2006).** Sensitive and rapid detection of *F.columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus* by a loop-mediated isothermal amplification method. *J. Appl. Mic.*, 100, 919-925.
- Yugueros, J., Temprano, A., Luengo, J.M., Naharro, G. (2001).** Molecular cloning of *Y.ruckeri* *aroA* gene: a useful taxonomic tool. *J. Fish Dis.*, 24(7), 383-90.