

## *Yersinia ruckeri* İzolatlarının Genotiplendirilmesinde PCR Tabanlı DNA Fingerprinting Tekniklerinin Karşılaştırmalı Analizi

Seda KÖSTERELİ<sup>1</sup>, Ertan Emek ONUK<sup>1</sup>\*\*

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

\*Sorumlu Yazar: [eeonuk@omu.edu.tr](mailto:eeonuk@omu.edu.tr)

**Araştırma Makalesi**

Geliş 27 Aralık 2018; Kabul 05 Şubat 2019; Basım 15 Eylül 2019.

**Alıntılama:** Köstereli, S., & Onuk, E. E. (2019). *Yersinia ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde PCR tabanlı DNA fingerprinting tekniklerinin karşılaştırmalı analizi. *Acta Aequatica Turcica*, 15(3), 262-271. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.503853>

### Özet

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'nin farklı coğrafi bölgelerinden elde edilmiş olan *Yersinia ruckeri* izolatlarının tiplendirilmesinde farklı PCR tabanlı DNA fingerprinting metodlarını değerlendirmektir. Gökkuşluğu alabalıklarından izole edilmiş 18 *Y. ruckeri* izolatı ERIC2 primerinin kullanıldığı enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR metodu, P5, P6 ve M13 primerlerinin kullanıldığı randomly amplified polymorphic (RAPD) DNA-PCR metodu ve (GTG)5 primerinin kullanıldığı (GTG)5-PCR metodu ile karakterize edildi. Test edilen tüm primerlerin doğru bir analiz için kullanılabilir amplifikasyon ürünü oluşturduğu belirlendi. Kluster ve ayırım gücü analizi sonuçlarına göre, *Y. ruckeri*'nin moleküler tiplendirmesi için en uygun primerin ERIC2 primeri olduğu, bunu P5, P6, M13 ve (GTG)5 primerinin takip ettiği belirlendi. ERIC-PCR DNA fingerprinting metodunun *Y. ruckeri*'nin epidemiyolojik sürveyansının belirlenmesinde güçlü bir genotipik araç olarak düşünülebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** ERIC-PCR, (GTG)5-PCR, moleküler tiplendirme, RAPD-PCR, *Y. ruckeri*

### Comparative Analysis of PCR-Based DNA Fingerprinting Techniques in the Genotyping of *Yersinia ruckeri* Isolates

#### Abstract

The aim of the present study was to evaluate different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing *Yersinia ruckeri* isolates from the different geographic region of Turkey. Eighteen *Y. ruckeri* isolates obtained from rainbow trout were characterized by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR with ERIC2 primer, randomly amplified polymorphic (RAPD) DNA-PCR with P5, P6 and M13 primer and (GTG)5-PCR with (GTG)5 primer. It was determined that all the primers tested generated an appropriate pattern of amplified products suitable for accurate analysis. Based on the results of cluster analysis and discriminant function analysis, ERIC2 primer was found to be the most suitable primer for molecular typing of *Y. ruckeri*, followed by P5, P6, M13, and (GTG)5 primer. In conclusion, the ERIC-PCR DNA fingerprinting method can be considered as a powerful genotypic tool for epidemiological surveillance of *Y. ruckeri*.

**Keywords:** ERIC-PCR, (GTG)5-PCR, molecular typing, RAPD-PCR, *Y. ruckeri*

### GİRİŞ

*Yersinia ruckeri* salmonid cinsi balık yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara yol açan yersinyozis veya “enterik kırmızı ağız” (Enteric Red Mouth) olarak bilinen hastalığının etiyolojik ajanıdır (Tobback vd., 2007). Hastalık ilk defa 1950'li yıllarda Amerika'nın Idaho eyaletinin Hagerman vadisindeki gökkuşluğu alabalığı çiftliklerinde yüksek mortalite ile seyreden septisemik bir hastalık olarak rapor edilmiş ve 1966 yılında Ross vd. tarafından tam olarak tanımlanmıştır (Horne ve Barnes, 1999). Hastalık etkeni Ewing vd. (1978), tarafından ilk izolasyonu yapan Rucker'e ithafen *Y. ruckeri* olarak isimlendirilmiştir. Hastalık başlıca salmonid cinsi balıklarda görülmesine rağmen diğer balık türlerini de etkilemektedir (Horne ve Barnes, 1999). Günümüzde oldukça yaygın bir dağılıma sahip olan hastalık Kuzey Amerika, Avustralya, Güney Afrika ve Avrupa'da görülmüştür (Tobback vd., 2007). Türkiye'de ise *Y. ruckeri* ilk defa İzmir'de gökkuşluğu alabalık yetiştiriciliği yapılan bir işletmeden 1990 yılında izole edilmiştir (Çağırman ve Yürekli Türk, 1991).

Bakteriler arasındaki klonal ilişkinin ortaya konulmasıyla epidemik izolatlar, sporadik veya endemik olanlardan ayrılmakta, salgınla ilişkili suşlar belirlenmekte; salgının kapsamı, kaynak ve rezervuarı hakkında bilgiler edinilebilmektedir (Durmaz, 2008). Teorik olarak fenotipik ve genotipik olarak iki ayrı tiplendirme sistemi bulunmaktadır. Fenotipik tiplendirmede kullanılan çeşitli besi yerlerindeki koloni morfolojisi, biyokimyasal testler, seroloji, toksin duyarlılığı, patojenite ve antibiyotik duyarlılığı gibi özellikler yakından ilişkili suşlar arasında ayırım yapmak için yeterince çeşitlilik sağlamamaktadırlar. Son zamanlarda, genetik yapısına göre bakteriyel suşların ayırt edilmesi olarak bilinen genotiplendirme, yüksek ayırım gücü nedeniyle bakteriyel suşların tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir suşun belirli bir genotiplendirme yöntemiyle elde edilen genetik profili, parmak izi kadar benzersiz olabilmektedir. Bu nedenle, genotiplendirme aynı zamanda DNA parmak izi olarak adlandırılmaktadır (Li vd., 2009).

Mevcut bakteriyel tiplendirme metotları; DNA bant modeli, DNA dizi analizi ve DNA hibridizasyon temelli metotlar olmak üzere üç ana kategori altında sınıflandırılabilir. DNA bant modeline dayanan genotiplendirme metotların esasını genomik DNA'nın amplifikasyonu veya restriksiyon enzimleri ile DNA'nın kesilmesiyle üretilen DNA bantlarının (fragmanları) boyutlarındaki farklılıklara göre incelenen suşların ayırt edilmesi oluşturur. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ve restriction fragment length polymorphism (RFLP) analizi restriksiyon enzimleri ile kesim esasına dayanan tiplendirme yöntemleridir. Arbitrarily primed PCR (AP-PCR), repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR), multiple-locus variable number tandem repeat analizi ise DNA'nın amplifikasyonuna dayalı tiplendirme yöntemleri içerisinde yer almaktadır (Li vd., 2009).

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

Bakteriyel genomlar içerisinde doğal olarak bulunan bir dizi tekrarlayan DNA sekansı bulunmaktadır. Bu sekanslar genom üzerinde çok sayıda kopya halinde dağılmış bir şekilde yerleşmiştir. Bu dağılık tekrarlayan DNA elementlerinin fonksiyonları hala bilinmemekle birlikte, bunların varlığı bakterilerin DNA parmak izlerinin ortaya konulması için kullanışlı parametrelerdir (Li vd., 2009). Bu metotlarda kullanılan primerler tekrarlanan DNA dizilimlerinin komplementeridir ve bu primerler kullanılarak, tekrarlar arasında kalan DNA parçalarının amplifikasyonu yapılmaktadır. Tekrarlayan elementlerinin sayı ve yerleşimindeki farklılıklar, bakteriyel türe özgü bant profilini oluşturmaktadır. Tekrarlanan dizilimlerin dört grubu tanımlanmıştır. Bunlar: REP dizilimler, ERIC dizilimler, BOX dizilimler ve politrinükleotid (GTG)<sub>5</sub> dizilimlerdir. Bu tekrarlayan dizilimlere dayalı beş ayrı (REP-PCR, ERIC1 PCR, ERIC2 PCR, BOX-PCR ve (GTG)<sub>5</sub>-PCR) rep-PCR uygulaması vardır ve bu yöntemler değişik bakteri gruplarının tiplendirilmesinde kullanılmaktadır (Durmaz, 2008). Bu tekrarlayan dizilimler içerisinde REP ve ERIC sekansları tiplendirmede en yaygın kullanılan dizilimlerdir. BOX elementlerinin REP ve ERIC dizilimleri ile sekans ilişkisi bulunmamaktadır (Olive ve Bean, 1999).

Bu çalışma ile PCR tabanlı farklı DNA fingerprinting metotlarının Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan *Y. ruckeri* izolatları arasındaki genetik ilişkilerin belirlenmesindeki etkinlikleri karşılaştırılmalı olarak ortaya konulmuştur.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Bakteriyel izolatlar ve kültür şartları

Çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinden izole edilmiş olan 18 adet Gökkuşacağı alabalığı kökenli *Y. ruckeri* saha izolatu kullanıldı (Tablo 1). Çalışmadan önce gliserinli buyyon (%15) içerisinde -20 °C'de saklanan izolatlar Trypticase soy broth'a (Merck, Almanya) pasajlanarak 25 °C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan *Y.ruckeri* saha izolatları, izolasyon yerleri ve tarihi

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

### İzolatların DNA ekstraksiyonu

İzolatların DNA ekstraksiyonları prensibi spin kolon ile filtrasyon esasına dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Invitrogen, Kanada) kullanılarak yapıldı. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları Nanodrop (Thermo) ile 260 nm'de ölçüldü. İzolatlar ait DNA konsantrasyonları genotiplendirme çalışmalarında kullanılmak üzere 15 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Sonrasında DNA'lar PCR çalışmalarında hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

### İzolatlar arası genetik ilişkinin belirlenmesi

İzolatlar arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde 3 farklı PCR tabanlı DNA fingerprinting tekniği kullanıldı. Bu metotlarda kullanılan primerlerin *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla öncelikle rastgele 7 izolat seçildi ve aşağıda bildirilen primerler ile reproducibile (üretken) bant verip vermedikleri belirlendi. Bu aşamada seçilen primer ve/veya primerler diğer izolatların genotiplendirilmesinde kullanıldı. Her bir genotiplendirme metodunda PCR karışımının oluşturulmasında içeriğinde 0,05 U/µl Taq DNA polymerase, reaction buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM her bir dNTP (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) bulunan 2×PCR master mix (Thermo) kullanıldı. Böylece herbir teknik için tüm değişkenler sabitlendi. Her bir fingerprinting tekniği için 60 ng template DNA, 8 pmol primer (2 µl), 12,5 µl 2×PCR master mix ve distile sudan oluşan toplam 25 µl PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Sonraki amplifikasyon aşamaları ise araştırmacılar tarafından bildirilen koşullar veya modifikasyonları kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası elde edilen ürünler etidium bromid (2µg/ml) içeren %1,5'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

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

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

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

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

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

**ERIC-PCR:** Bu metoda ERIC-2 (AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G) primeri kullanıldı (Versalovic vd., 1991). ERIC2 primerinin kullanıldığı ERIC-PCR'da oluşturulan PCR karışımı 95°C'de 7 dk ön denatürasyon ve sonrasında 94°C'de 1 dk denatürasyon, 52°C'de 1 dk primer bağlanma, 65°C'de 8 dk uzama olmak üzere 30 siklus ve 65°C'de 16 dk son uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu.

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

## BULGULAR

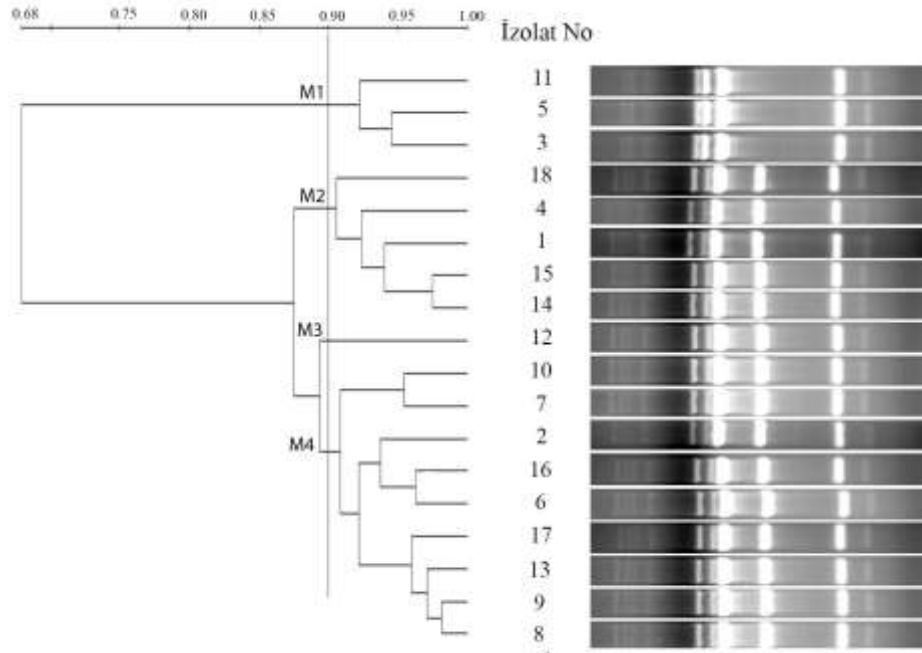
### İzolatlar arası genetik ilişkinin belirlenmesi

*Y. ruckeri* izolatları arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde PCR tabanlı DNA fingerprinting metotlarında kullanılan primerlerin rastgele seçilen 7 izolatının kullanıldığı ön denemede üretken bant paterni verdiği saptandı. Sonraki aşamada ise denemeler bütün izolatlar kullanılarak tekrar edildi. Testlerinin tekrarlanabilirliği % 100 olarak belirlendi.

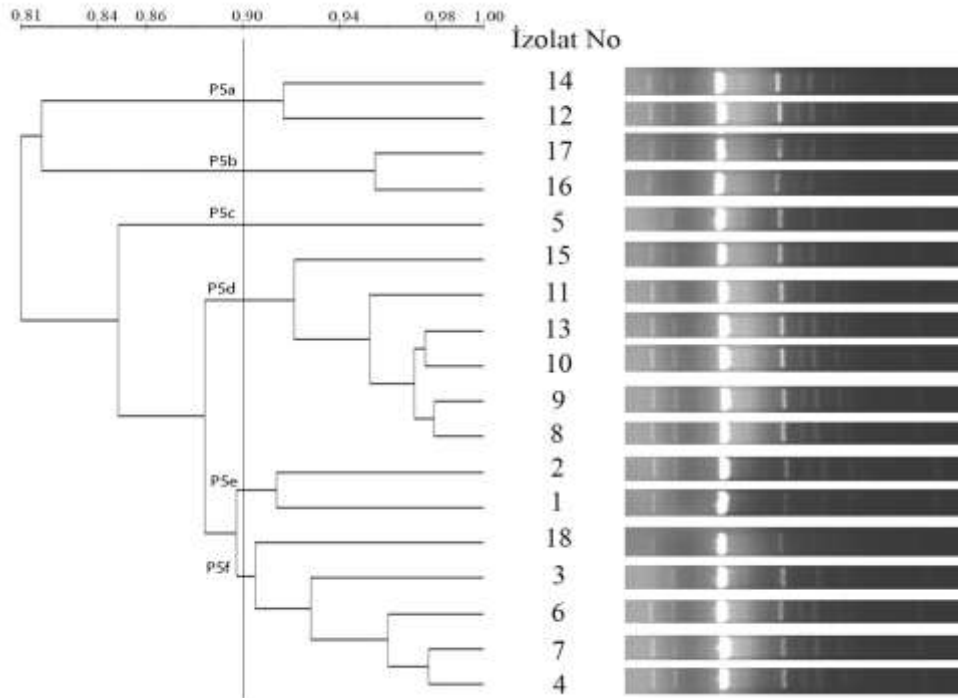
**RAPD-PCR:** *Y. ruckeri* izolatlarının M13 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre bir tekli (unique) tip ve 3 küme içerisinde olmak üzere toplam 4 farklı genotip (M1, M2, M3 ve M4) içerisinde gruplandığı belirlendi. Bu genotiplerin sırasıyla 3, 5, 1 ve 9 izolat içerdiği, M4 no'lu genotipin baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 1). Testin ayırım gücü (Discriminatory Power) 0,6797 olarak hesaplandı.

*Y. ruckeri* izolatlarının P5 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre bir tekli (unique) tip ve 5 küme içerisinde olmak üzere 6 genotip (P5a, P5b, P5c, P5d, P5e ve P5f) içerisinde gruplandığı belirlendi. P5d no'lu genotipin içerdiği 6 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 2). Testin ayırım gücü 0,817 olarak hesaplandı.

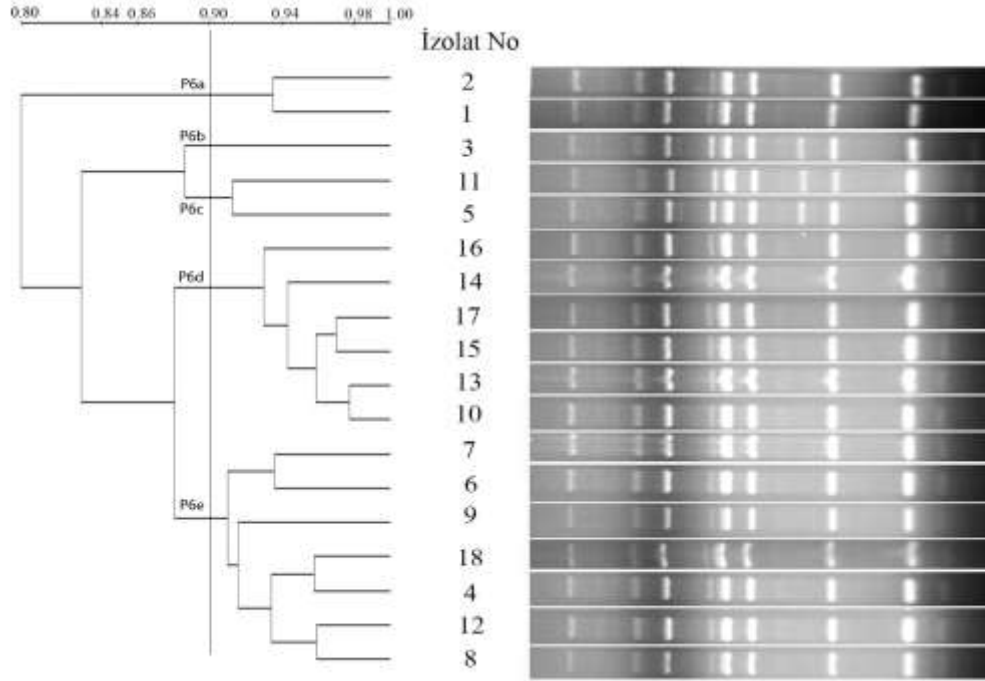
*Y. ruckeri* izolatlarının P6 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre bir tekli (unique) tip ve 4 küme içerisinde olmak üzere toplam 5 genotip (P6a, P6b, P6c, P6d ve P6e) içerisinde gruplandığı belirlendi. P6e no'lu genotipin içerdiği 7 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 3). Testin ayırım gücü 0,7516 olarak hesaplandı.



Şekil 1. *Y. ruckeri* izolatlarının M13 primeri ile sergiledikleri RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

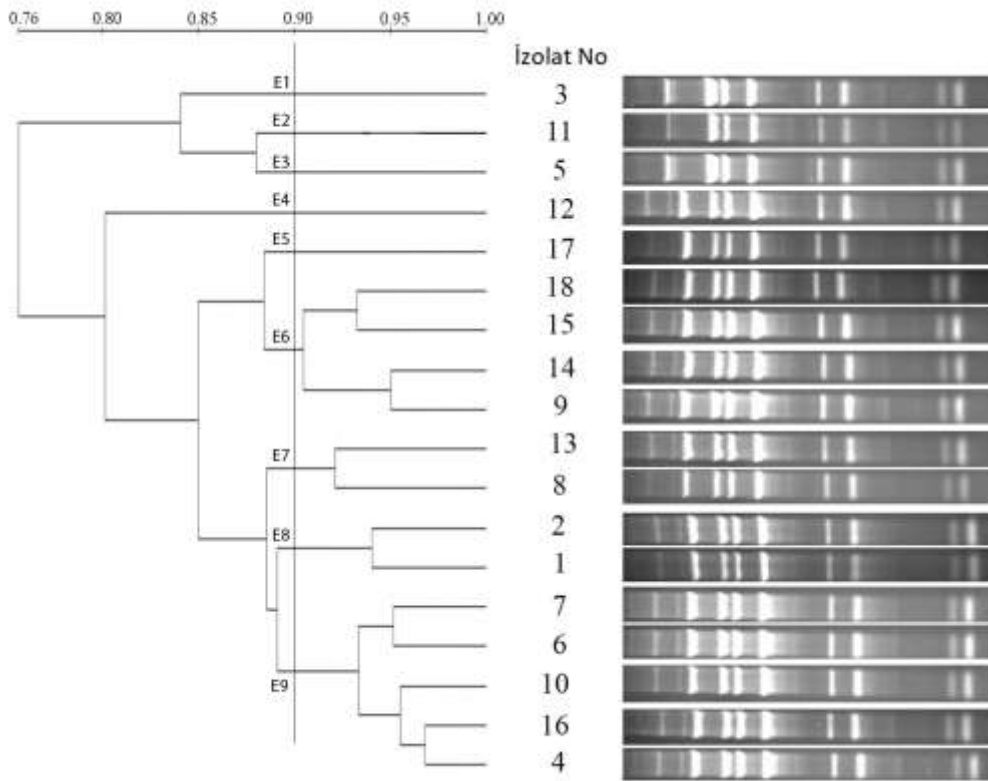


Şekil 2. *Y. ruckeri* izolatlarının P5 primeri ile sergiledikleri RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.



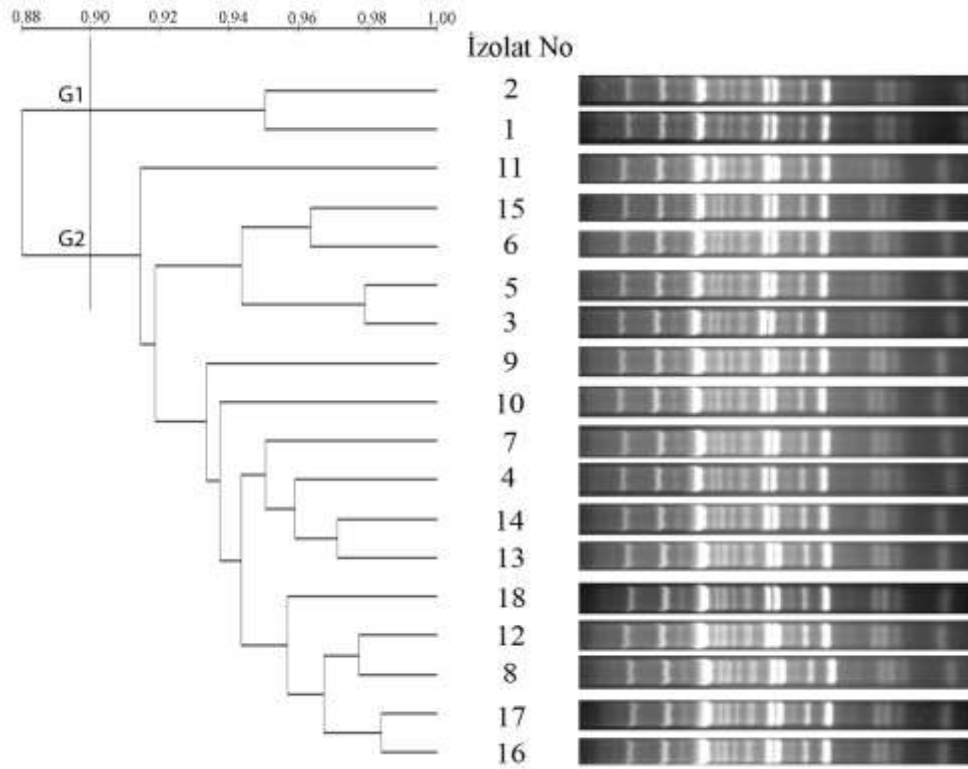
Şekil 3. *Y. ruckeri* izolatlarının P6 primeri ile sergiledikleri RAPD bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

**ERIC-PCR:** *Y. ruckeri* izolatlarının ERIC2 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre beş tekli (unique) tip ve 4 küme içerisinde olmak üzere toplam 9 genotip (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 ve E9) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. E9 no'lu genotipin içerdiği 5 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 4). Testin ayırım gücü 0,8824 olarak hesaplandı.



Şekil 4. *Y. ruckeri* izolatlarının ERIC2 primeri ile sergiledikleri ERIC-PCR bant profilleri ve genotiplerinin filogenetik ağaçta gösterilmesi.

**(GTG)5-PCR:** *Y. ruckeri* izolatlarının (GTG)5 primeri ile % 90 benzerlik katsayısına göre 2 genotip (G1 ve G2) içerisinde gruplandırıldığı belirlendi. G2 no'lu genotipin içerdiği 16 izolat ile baskın genotip olduğu saptandı (Şekil 5). Testin ayırım gücü 0,2092 olarak hesaplandı.



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

## TARTIŞMA ve SONUÇ

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

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

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

Türkiye’de *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde araştırmacıların genellikle, ERIC-PCR metodunu ve ERIC2 primerini kullandıkları görülmektedir. Onuk vd. (2011), 97 *Y. ruckeri* izolatını ERIC2 primeri ile genotiplendirmişler ve % 75 benzerlik katsayısına göre izolatları 6 genotip içerisinde sınıflandırmışlardır. İzolatların % 59,8’inin baskın genotip içerisinde dağıldığını saptamışlardır. Araştırmacılar genel olarak Türkiye’nin farklı bölgelerden elde edilen izolatların bütün genotipler içerisine dağıldığını ortaya koymuş ve bu durumun balık transferinin yaygın olarak yapıldığının göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Altun vd. (2013), 15 *Y. ruckeri* saha izolatı ve 2 referans suşu inceledikleri çalışmalarında ERIC2 primeri ile % 70 benzerlik katsayısına göre izolatları 2 ayrı küme içerisinde gruplandırmış, kümelerden birincisinin 2 genotip, ikincisinin ise 3 genotip içerdiğini saptamışlardır. Predominant genotipin 5 izolat (% 29,4) içerdiği belirlenmiştir. Ek olarak izolatların coğrafik orjinlerine göre herhangi bir genogrup içerisinde gruplanmadığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada da benzer şekilde genotipler arasında coğrafik orjinlere göre herhangi bir sınıflandırma yapılamamıştır. Duman vd. (2017), ise Türkiye kökenli 136 *Y. ruckeri* izolatı ERIC2 primeri ile % 72 benzerlik katsayısına göre 4 genogruba ayırmışlar ve izolatların izolasyon yıllarına göre farklı genogrurlara dahil olduklarını ortaya koymuşlardır. Ege bölgesinden 2013 yılında izole edilen izolatların diğer izolatlara % 54 oranında benzerlik gösterdiğini, 124 adet izolatın % 90 oranında benzerlik gösterdiklerini, yine 2013 ve 2014 yılında elde edilen izolatların büyük oranda heterojen yapıda olduklarını, 2015 yılında elde edilen izolatların ise daha homojen bir yapıya sahip olduklarını ortaya koymuşlardır.

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

RAPD-PCR’da P5 ve P6 primerleri kullanarak *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak farklı balık patojenlerinde bu primerler kullanılarak izolatlar arası genetik ilişkiler ortaya konulmuştur. Bu çalışmalardan bir tanesinde P5 ve P6 primerleri ile *Tenacibaculum maritimum* izolatları genotiplendirilmiştir. Çalışmada P5 primeri ile bazı izolatlarda amplifikasyon ürünü elde edilememiştir. Dolayısıyla bu bakterilerin tiplendirilmesinde P5 primeri kullanılamayacağı ortaya konulmuştur. P6 primeri ile ise izolatların konakçı spesifitesine göre kümelerle ayrıldığı belirlenmiştir (Avendano-Herrera vd., 2004). Diğer bir çalışmada ise P5 ve P6 primerlerinin *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* izolatlarının tiplendirilmesinde kullanılabilir olduğu belirlenmiş ve her iki primer ile yapılan gruplandırmada gruplar arasında yaklaşık aynı benzerlik katsayısı elde edilmiştir (Mancuso vd., 2007). Foschino vd. (2008), *Lactococcus garvieae* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede M13 ve P5 primerlerini kullanmışlardır. M13 primerinin en iyi ayırım gücüne sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan P5 ve P6 primerlerinin her ikisi ile de izolatların yeterli düzeyde amplifikasyon ürünü verdiği, dolayısıyla her iki primerin *Y. ruckeri* izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanılabilir olduğu ortaya konulmuştur. P5 primerinin ayırım gücünün (0,817), P6 primerinden yüksek olduğu belirlenmiştir.

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



Farklı tiplendirme metotlarının karşılaştırılması olarak değerlendirildiği çalışmada Huang vd. (2013), Almanya kökenli 83 *Y. ruckeri* izolatını karakterize etmişlerdir. Bu amaçla izolatların genotiplendirilmesinde (GTG)5-PCR, BOX-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR ve PFGE metodunu kullanmışlardır. İzolatlar REP-PCR ile iki, ERIC-PCR ile beş, (GTG)5-PCR ile dört ve BOX-PCR ile üç farklı küme içerisinde gruplandırılmıştır. PFGE metodu ile ise 17 farklı pulsetip elde edilmiştir. Çalışmada REP-PCR'ın 0.048 ile en düşük ayırım gücüne sahip olduğu yani test popülasyonundan rastgele seçilen iki izolatının farklı bir REP-PCR paterni gösterme olasılığının % 4,8 olduğu belirlenmiştir. REP-PCR metodunu sırasıyla BOX-PCR (0,071), (GTG)5-PCR (0,095) ve ERIC-PCR'ın (0,140) takip ettiği belirlenmiştir (Huang vd., 2013). Bu çalışmada ise farklı olarak değerlendirilen tiplendirme metotları arasında en düşük ayırım gücüne (GTG)5-PCR'ın sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç *Y. ruckeri* izolatlarının tiplendirilmesinde (GTG)5-PCR'ın kullanılabilirliğinin düşük olduğunu göstermiştir.

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

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

**Teşekkür:** Bu çalışma, yüksek lisans tezinden özetlenmiş ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.18.012 proje numarası ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Altun, S., Onuk, E.E., Çiftçi, A., Duman, M., & Büyükekiz, A.G. (2013). Determination of phenotypic, serotypic and genetic diversity and antibiotyping of *Yersinia ruckeri* isolated from rainbow trout. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 225-232.
- Avendano-Herrera, R., Rodriguez, J., Magarinos, B., Romalde, J.L., & Toranzo, A.E. (2004). Intraspecific diversity of the marine fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* as determined by randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 871-877.
- Bastardo, A., Bohle, H., Ravelo, C., Toranzo, A.E., & Romalde, J.L. (2011a). Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. *Diseases Aquatic Organism*, 93, 207-214.
- Bastardo, A., Ravelo, C., & Romalde, J.L. (2012). Multilocus sequence typing reveals high genetic diversity and epidemic population structure for the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1888-1897.
- Bastardo, A., Sierralta, V., Leon, J., Ravelo, C., & Romalde, J.L. (2011b). Phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in Peru. *Aquaculture*, 317, 229-232.
- Çağırğan, H., & Yürekli, O. (1991). First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout in Turkey. Fifth International Conference, Disease of Fish and Shellfish Book of Abstracts, 131.
- Davies, R.L., & 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.
- Duman, M., Altun, S., Cengiz, M., Saticioglu, I.B., Buyukekiz, A.G., & Sahinturk, P. (2017). Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 125, 31-44.
- Durmaz, R. (2008). Bakteri tiplendirme çalışmaları için gerekli?, XXXIII. Türk mikrobiyoloji kongresi, İstanbul, Kongre Kitabı, s, 27-30.
- Ewing, W.H., Ross, A.J., Brenner, D.J., & Fanning, G.R. (1978). *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Red Mouth (RM) Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28, 37-44.

- Fidanboyulu, A. (2010). Gram negatif bakterilerin moleküler tiplendirilmesinde bazı pcr tabanlı yöntemlerin karşılaştırılması. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Foschino, R., Nucera, D., Volponi, G., Picozzi, C., Ortoffi, M., & Bottero, M.T. (2008). Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 652-62.
- Grundmann, H.J., Towner, K.J., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Mahmer, M., Seifert, H., & Vanechoutte, M. (1997). Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 3071-7.
- Horne, M.T., & Barnes, A.C. (1999). Enteric Red Mouth Diseases (*Yersinia ruckeri*) In: Fish Diseases and Disorders Volume 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections. Ed.: P.T.K. Woo, D.W. Bruno, CAB International, New York, USA. p, 455-479.
- Huang, Y., Runge, M., Michael, G.B., Schwarz, S., Jung, A., & Steinhagen, D. (2013). Biochemical and molecular heterogeneity among isolates of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in north west Germany. *BMC Veterinary Research*, 9, 215
- Köksal, F. (1999). Moleküler tiplendirme yöntemlerinin hastane infeksiyonlarıda kullanımı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 3, 189-95.
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*, 46, 103
- Li, W., Raoult, D., & Fournier, P.E. (2009). Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 892-916.
- Mancuso, M., Avendano-Herrera, R., Zaccone, R., Toranzo, A.E., & Magarinos, B. (2007). Evaluation of different DNA-based fingerprinting methods for typing *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*. *Biological Research*, 39, 71-82.
- Olive, D.M., & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1661-1669.
- Onuk, E.E., Çiftçi, A., Findık, A., Çiftçi, G., Altun, S., Balta, F., Özer, S., & Çoban, A.Y. (2011). Phenotypic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* isolates from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in Turkey. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 124(7-8), 320-328.
- Özer, S., Bulduklu, P., Dönmez, E., Koyuncu, E., Serin, M.S., Aslan, G., Tezcan, S., Aydın, E., & Emekdas, G. (2008). Phenotypic and genetic homogeneity of *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Mersin Province, Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 28(3), 97-104.
- Öztürk, R.Ç., & Altınok, İ. (2014). Bacterial and viral fish diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14, 275-297.
- Romalde, J.L., Magarinos, B., Barja, J.L., & Toranzo, A.E. (1993). Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri*: proposal for a new intraspecies classification. *Systematic and Applied Microbiology*, 16, 411-419.
- Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., & Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 30, 257-268.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823-6831.