

***Yersinia ruckeri* Suşlarının Fenotipik ve Serolojik Özelliklerinin İncelenmesi**

Soner ALTUN *  Ayşegül KUBİLAY ** Öznur DİLER **

* Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-16059 Görükle, Bursa - TÜRKİYE

** Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, TR-32500 Eğirdir, Isparta - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-1386

Özet

Araştırmada, ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinde bulunan gökkuşuğu alabalığı 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 20 E testleri kullanılmıştır. Geleneksel mikrobiyolojik ve API 20 E testlerinde bakterinin oldukça homojen (API 20 E testinde suşlar arasında jelatin hidrolizi, voges proskauer reaksiyonu, sitrat kullanımı testleri yönünden farklılıklar olmakla birlikte) bir yapı gösterdiği belirlenmiştir. Shotts-Waltman medium (SWM) ve Riboz Ornitin Dezoksikolat (ROD) selektif besiyerlerinde *Y. ruckeri* suşlarının spesifik koloniler oluşturduğu saptanmıştır. Serotip 1 ve serotip 2 immünserumlar 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 özellikteki *Yersinia ruckeri* suşlarının yaygın olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Oncorhynchus mykiss*, *Yersinia ruckeri*, API 20 E, Mikroaglutinasyon

Investigation of Phenotypical and Serological Properties of *Yersinia ruckeri* Strains

Summary

In the present study, phenotypical and serological properties of 19 *Yersinia ruckeri* isolates that were isolated from different fish cultivating plants located at different geographical area of Turkey as well as two references serotypes (serotype 1 and serotype 2) have been compared. Basic microbiological techniques and API 20 E tests that have been employed for phenotypical characterization provided evidence that isolates have relatively similar structure (although gelatine hydrolysis, Voges-Proscauer and citrate utilisation tests as performed by API 20 E exhibited some differences). Specific colonies of *Y. ruckeri* were observed on the plates of Shotts-Waltman medium (SWM) and Ribose Ornithine Deoxycholate (ROD) medium. Microagglutination tests that were performed by using Serotype 1 and Serotype 2 revealed that 18 out of 19 isolates were grouped as Serotype 1 while only one isolate was serotype 2. Results of the present study have shown that *Yersinia ruckeri* Serotype 1 are the most commonly found serotype in our country.


Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, *Yersinia ruckeri*, API 20 E, Microagglutination

GİRİŞ

Gram negatif enterik bir bakteri olan *Yersinia ruckeri*, özellikle *Salmonidae* familyasına ait balıklarda akut veya kronik seyir gösteren yersiniozise (enterik kızıl ağız hastalığına) neden olur. Bu mikroorganizma bugüne kadar salmonid balıkların entansif yetiştiriciliğinin yapıldığı 5 farklı kitadaki birçok ülkeden (Avustralya, Bulgaristan,

Kanada, Şili, Danimarka, Finlandiya Fransa, Almanya, Yunanistan, İran, İtalya, Yeni Zelanda, Norveç, Güney Afrika, Portekiz, İspanya, İsveç, İsviçre, Türkiye, Hırvatistan İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri ve Venezuela) bildirilmiş olup, hastalığın yayılım gösterdiği ülke sayısı günden güne artış göstermektedir¹⁻⁴. Yersiniozis, alabalık ve

 **İletişim (Correspondence)**

 +90 224 2941264

 soneraltun2003@yahoo.com

diğer salmonidlerin septisemik karakterli bir hastalığıdır. Fakat gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) hastalığından en fazla etkilenen türdür. *Y. ruckeri*'nin Ülkemizde ilk defa, 1991 yılında Denizli ve İzmir'deki işletmelerden izole edildiği bildirilmiştir ^{5,6}.

Y. ruckeri suşları arasında serolojik farklılıklar bulunmasına rağmen, biyokimyasal özellikleri açısından serotiplerin çok benzer olduğu belirtilmektedir ^{1,7}. Ancak *Y. ruckeri* ile yapılan biyokimyasal çalışmalarda inkübasyon sıcaklığının 22-25°C arasında olması gerektiği, optimum sıcaklığın dışında yapılan testlerde hatalı negatif veya pozitif sonuçların elde edilebileceği bildirilmiştir ^{1,8,9}.

Y. ruckeri serotipleri arasında sorbitolü fermente etme yeteneğinin değişebileceği, serotip 2 suşlarının sorbitolü fermente etme yeteneğiyle diğer serotiplerden ayrılabilmesi belirtilmiştir ¹⁰⁻¹².

Y. ruckeri suşları farklı serotip özellikler göstermektedir. *Y. ruckeri*'nin en yaygın ve en virulent tipi serotip 1 (Hagerman suşu) olarak bildirilmiştir ^{7,13}. Daha sonra salmonlardan, virulensi serotip 1'den daha düşük olan serotip 2 izole edilmiştir ^{14,15}. Avustralya'da 1973 yılında izole edilen *Y. ruckeri* suşunun ise serotip 3 (Avustralya suşu) olduğu belirtilmiştir ¹⁶. Bu üç serotip dışında daha sonraki yıllarda IV, V, VI adı verilen serotiplerde de bildirilmiştir ^{11,17}. Daha sonraki araştırmalarda suşlar arasındaki serolojik ilişki ve antijenik determinantlarına (LPS ve membran proteinleri) göre *Y. ruckeri*'nin 4 serotipik (O₁, O₂, O₃, ve O₄) gruba ayrıldığı saptanmıştır ¹⁸.

Y. ruckeri suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde, geleneksel testler, ve API 20 E test kitleri kullanılmaktadır ^{1,8}. *Y. ruckeri* izolatları üzerine API 20 E hızlı teşhis kitleriyle yapılan çalışmalarda elde edilen verilere göre araştırmacılar; *Y. ruckeri*'nin bazı suşlarının identifikasyon sırasında *Hafnia alvei* ile karıştırılabileceğini bildirmişlerdir ^{4,9,19}.

Bu çalışmada, ülkemizin farklı bölgelerinden izole edilmiş olan *Y. ruckeri* suşlarının identifikasyonlarında geleneksel mikrobiyolojik yöntemler, selektif besiyerleri, API 20 E hızlı teşhis kitleri kullanılarak; API 20 E hızlı teşhis kitlerinin kullanımı sırasında karşılaşılabilecek identifikasyon hatalarının belirlenmesi ve mikroaglutinasyon testiyle belirtilen bakteri suşlarının serolojik özelliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Y. ruckeri Suşları

Araştırmada 21 adet *Y. ruckeri* suşu kullanılmış olup, bu suşlardan iki tanesini ATCC 29473 (serotip 1) ve

1850621-1116B Danimarka (serotip 2) referans suşlar oluştururken, diğerlerini ülkemizin farklı coğrafik bölgelerinden izole edilmiş izolatlar oluşturmaktadır. Bu suşların kökenleri ve kaynağı **Tablo 1**'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Yersinia ruckeri* suşları

Table 1. *Yersinia ruckeri* strains

Suş No	Köken	Kaynak
1	Isparta	Gökkuşığı Alabalığı
2	Bilecik	Gökkuşığı Alabalığı
3	ATCC 29473	Gökkuşığı Alabalığı
4	1850621-1116B Danimarka	Gökkuşığı Alabalığı
5	Denizli	Gökkuşığı Alabalığı
6	Kırklareli	Gökkuşığı Alabalığı
7	Bolu	Gökkuşığı Alabalığı
8	Tekirdağ	Gökkuşığı Alabalığı
9	Çanakkale	Gökkuşığı Alabalığı
10	Elazığ	Gökkuşığı Alabalığı
11	Aydın	Gökkuşığı Alabalığı
12	Bursa	Gökkuşığı Alabalığı
13	Yalova	Gökkuşığı Alabalığı
14	Trabzon	Gökkuşığı Alabalığı
15	Rize	Gökkuşığı Alabalığı
16	Kütahya	Gökkuşığı Alabalığı
17	Kayseri	Gökkuşığı Alabalığı
18	Urfa	Gökkuşığı Alabalığı
19	Ordu	Gökkuşığı Alabalığı
20	Manisa	Gökkuşığı Alabalığı
21	Denizli	Gökkuşığı Alabalığı

Hiperimmün (Serotip 1 ve Serotip 2) ve Negatif Serumlar

Araştırmada kullanılan *Yersinia ruckeri* suşlarının serotiplendirilmesinde kullanılan hiperimmün serumlar (pozitif kontrol serum) Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Anabilim Dalından temin edilmiştir. Negatif kontrol serumlar ise sağlıklı gökkuşığı alabalıklarından elde edilmiştir.

Y. ruckeri Suşlarının Fenotipik Özellikleri

Y. ruckeri suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde geleneksel mikrobiyolojik testler, API 20 E hızlı teşhis kitleri ve selektif besiyerleri (Shotts - Waltman medium, Riboz Ornitin Dezoksikolat medium) kullanılmıştır ^{1,8}.

Etkenin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Y. ruckeri suşları stok kültürden TSA besi yerine alınarak 22°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda incelenen bakteri suşlarının 1-2 mm çapında, yuvarlak, kenarları düz görünümde, beyazdan krem renge kadar değişen renklerde, yarı şeffaf koloniler verdiği görülmüştür. Bu kolonilerin saflıkları, Shotts - Waltman medium (SWM, %1 tripton, %1 yeast ekstrakt, %0.125 fenilalanin, %0.12 ferrik amonyum sitrat, %0.0003 brom timol mavisi, % 0.1 bile salts, %1.5 agar pH 7.0 121°C'de otoklavlandıktan sonra membran filtre ile steril edilmiş

%0.35 mannitol ve 10 µg/ml kolitsin sülfat ilave edilmiştir) ve Riboz Ornitin Dezoksikolat (ROD, %0.3 yeast ekstrakt, %0.1 sodium deoksikolat,%0.5 sodyum klorid, %0.68 sodyum tiyosülfat, %0.08 ferrik amonyum sitrat, %0.75 maltoz, %0.375 riboz, %0.375 ornithin hidroklorid %0,1 sodyum dodeksil sülfat, %0.008 fenol red, %1.25 agar, pH 7.4 ortam 121°C'de otoklavlandıktan sonra membran filtre ile steril edilmiş 0.5 g/ml sukroz ilave edilmiştir) besiyerinde gösterdikleri koloni özellikleri yönüyle incelemeler yapılarak kontrol edilmiştir ^{1,20,21}.

Klasik Mikrobiyolojik Testlerin Kullanımı

Araştırmamızda; Gram boyama, oksidasyon-fermentasyon (O/F), Simmons sitrat, jelatin hidrolizi, sitokram oksidaz, katalaz, %1, %3, %7 NaCl'de büyüme, 37°C'de büyüme, 22°C, 37°C'de hareket, indol, metil kırmızısı, voges-proskauer reaksiyonu (VP), sorbitol, ksiloz, maltoz, inositol, glukoz'dan asit/gaz üretimi SWM ve ROD besiyerlerindeki koloni morfolojileri yönünden mikrobiyolojik çalışmalar yapılmıştır ^{1,8,20,21}.

API 20 E Testi

API 20 E hızlı teşhis testinin kullanımı üretici firmanın (Biomérieux, 20 100) yönergesi doğrultusunda yapılmış ve değerlendirilmiştir ^{1,8,22,23}.

Antijen Hazırlanması

Kültür edilen *Y. ruckeri* suşları PBS (bu solüsyon 8 g NaCl, 1.21 g K₂HPO₄, 0.34 g KH₂PO₄, 1.000 ml deiyonize su içinde eritilip, otoklavda sterilize edilerek hazırlanmıştır) içinde 100°C'de 30 dak. süreyle otoklavda bekletilmiştir. Kültürler 5.000 devir/dak. 15 dak. santrifüje edilerek, çökelti kısmı ayrılmış ve PBS ile sulandırılmıştır. Bu süspansiyonun (antijenin) yoğunluğu spektrofotometrede (Shimadzu UV 160 A) 525 nm dalga boyunda 0.65 Optik Dansite'ye ayarlanarak belirlenmiştir. Antijen, somatik O antijeni olarak mikropleyt aglutinasyon testinde kullanılmıştır ^{18,24}.

Mikroaglutinasyon

Y. ruckeri suşlarının serotiplendirilmesi sırasında mikroaglutinasyon testi kullanılmıştır ²⁵⁻²⁸.

BULGULAR

Y. ruckeri Suşlarının Fenotipik Özellikleri

Y. ruckeri suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde, klasik testler ve API 20 E test kitleri kullanılmış olup, elde edilen sonuçlar **Tablo 2** ve **3**'te verilmiştir.

Tablo 2. *Yersinia ruckeri* Suşlarında API 20 E Testi Kullanılarak Belirlenen Fenotipik Özellikler

Table 2. Phenotypic characteristics in *Yersinia ruckeri* strains with API 20 E Test

Fenotipik Özellikler	<i>Yersinia ruckeri</i> Suşları																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ONGP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitrat Üretimi	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
H ₂ S Üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureaz Üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol Üretimi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Jelatin Hid.	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Glukoz*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İnositol*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol*	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnoz*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sakkaroz*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibioz*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amygdalin*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinoz*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO ₂ Üretimi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
McC'de Ür.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1. ONPG: * - Galaktosidaz, **2. ADH:** Arginindihidrolaz, **3. LDC:** Lizindekarboksilaz, **4. ODC:** Ornitindekarboksilaz, **5. TDA:** Triptofandeaminaz, **6. VP:** Vogesproskauer, **7. McC'de Ür.:** MacConkey Agarda Üreme, * : Karbonhidratlardan Asit Üretimi

Tablo 3. Yersinia ruckeri suşlarında klasik mikrobiyolojik testler kullanılarak belirlenen fenotipik özellikler**Table 3.** Phenotypic characteristics in Yersinia ruckeri strains with using conventional microbiological tests

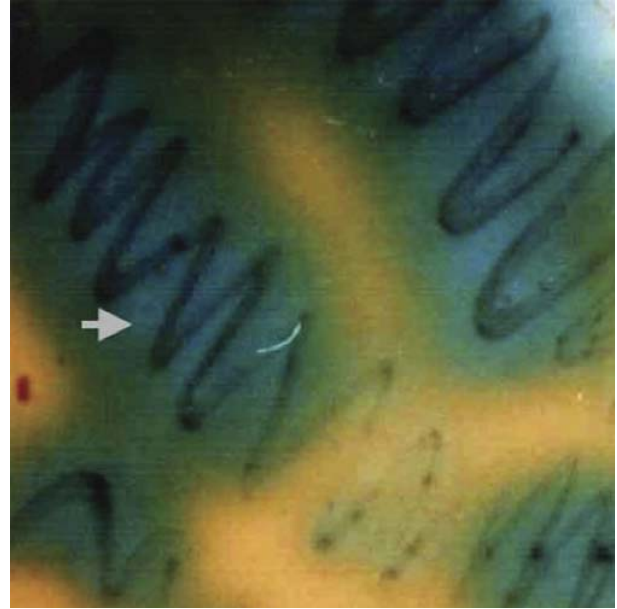
Fenotipik Özellikler	Yersinia ruckeri Suşları																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Gr Boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jelatin Hid.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
%3 NaCl*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%7 NaCl*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30°C Büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C Büyüme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22°C Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C Hareket	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SWM**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ROD***	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil Red	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol *	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnoz *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnositol*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukoz* (A/G)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Ksiloz*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*; % 1, 3, 7 NaCl'de Büyüme, ** ; Shotts-Waltman Ortamında Tween 80'nin Hidrolizi sonucunda buzlu cam görünümünde yeşil renkli koloni oluşturma, *** ; ROD besiyerinde kırmızı zemin üzerinde ribozun fermantasyonuna bağlı olarak sarı renkli koloni oluşturma

API 20 E ve klasik testlerle ilgili sonuçlar incelendiğinde, *Y. ruckeri* suşlarının fenotipik özelliklerinin büyük ölçüde benzer olduğu ancak yalnızca sorbitol, sitrat, jelatin ve voges proskauer testleri açısından bazı farklılıklar görüldüğü tespit edilmiştir. Sitrat, jelatin ve voges proskauer testlerinde suşlar arasındaki farklılıkların API 20 E hızlı teşhis kitlerinde görülüp, geleneksel mikrobiyolojik testlerde görülmemesi, API 20 E hızlı teşhis kitiyle *Y. ruckeri*'nin teşhisi sırasında *H. alvei* ile karışabilme riskine karşı dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir.

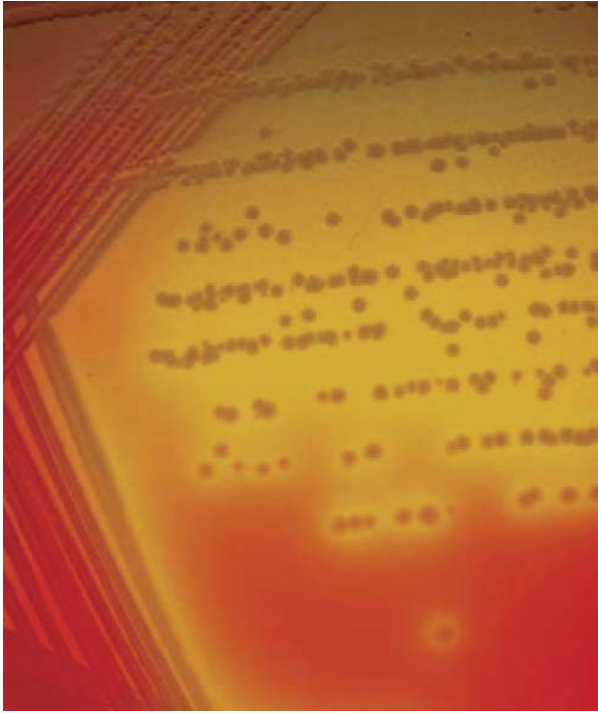
Sorbitol testi yönünden 4 ve 5 nolu izolatin pozitif sonuç vermesi (hem API 20 E hem de geleneksel testlerde) bu suşun serotip 2 özellikte olmalarından kaynaklanmaktadır.

SWM besiyerinde *Y. ruckeri*'nin, yeşil renkli koloniler oluşturarak bu kolonilerin etrafında kalsiyum tuzlarının presipitasyonu ve Tween 80'nin hidrolizine bağlı olarak buzlu cam görünümünde bir zon meydana getirdiği tespit edilmiştir (*Şekil 1*). *Y. ruckeri*'nin, ROD besiyerinde ise ribozun fermantasyonu ve sodyum dezoksikolat tuzlarının presipitasyonu sonucunda sarı renkli koloniler verdiği görülmüştür (*Şekil 2*).



Şekil 1. SWM besiyerinde *Y. ruckeri*'nin yeşil renkteki kolonilerinin çevresinde buzlu cam görünümündeki hidroliz zonu

Fig 1. Green colonies and surrounded by a zone of hydrolysis of *Y. ruckeri* in SWM medium



Şekil 2. ROD besiyerinde *Y. ruckeri*'nin sarı renkli kolonileri
Fig 2. Yellow colonies of *Y. ruckeri* in ROD medium

Aglutinasyon Testleri

Y. ruckeri suşlarıyla (21 adet) yapılan mikroplyet aglutinasyon testleri sonucunda; 19 suşun serotip 1, 4 ve 5 numaralı izolatların ise serotip 2 özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Serotip 1 ve serotip 2 immunsorumlarına karşı, ülkemizden izole edilmiş olan serotip 1 ve serotip 2 karakter gösteren suşlarda olduğu gibi iki referans suşa ait antijenik yapıların birbirleriyle kros reaksiyon vermedikleri görülmüştür. Ayrıca gerek serotip 1 suşlarının gerekse serotip 2 suşlarının hepsinde, immün serumlarla (serotip 1 ve 2) pozitif sonuç veren antijen dilusyonu 1:256 olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol serumlarının kullanıldığı pleyt bölmelerinde ise aglütinasyon görülmemiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Gram negatif, hareketli, çubuk şeklinde enterik bir bakteri olan *Y. ruckeri*'nin teşhisi; genellikle fenotipik (morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal) özellikleri incelemek yapılmaktadır ^{1,7,8,16}.

Beş kıtaya yayılmış olan *Y. ruckeri* suşlarıyla yapılan çalışmalarda; suşlar arasında serolojik farklılıklar olmasına rağmen, fenotipik özelliklerinin çok benzer olduğu belirtilmiştir. *Y. ruckeri*'nin fenotipik özelliklerinin belir-

lenmesinde, klasik mikrobiyolojik testler ve API 20 E hızlı teşhis kiti kullanılmaktadır ^{1,8,12,29}. Bu çalışmada geleneksel mikrobiyolojik testleri kullanarak elde ettiğimiz sonuçlar açısından suşlar arasında bir farklılık görülmemiştir. Bu yönüyle ülkemiz *Y. ruckeri* suşları oldukça homojen bir yapı göstermiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, ülkemizden izole edilen *Y. ruckeri* suşlarıyla çalışmış araştırmacıların sonuçlarıyla benzeşmektedir ^{5,19,30}.

Yapılan araştırmalarda, bazı *Y. ruckeri* suşlarının tween 80'i hidrolize edemediği bildirilmiştir ^{1,5,7,16,29}. Davies ve Frerichs ²⁹; hareketsiz *Y. ruckeri* suşlarının tween 80'i hidrolize edemediği, Bush ⁷ ise, hareketlilik ile tween 80 hidrolizi arasında bir ilişkinin olmadığını bildirmiştir. Çağırğan ⁵, çalıştığı 20 adet *Y. ruckeri* suşunun hepsinin hareketli olduğunu, ancak bu suşlardan bir kısmının tween 80'i hidrolize etmediğini saptamıştır. Bu çalışmada ise, 21 adet *Y. ruckeri* suşunun hepsinin hareketli olduğu ve 21 numaralı suş dışındaki diğer suşların tween 80'i hidrolize edebildiği tespit edilmiştir. Tween 80'i hidrolize etmeyen 21 nolu suşun hareketli olması Davies ve Frerichs'dan ayrılırken ²⁹, Bush ⁷ ve Çağırğan ⁵ ile benzerlik göstermiştir.

Bakteriyel hastalık etkenlerinin fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde ve teşhisinin yapılmasında en çok kullanılan yöntemlerden birisi de API 20 E test kitleridir. *Y. ruckeri* suşlarının fenotipik özelliklerinin API 20 E test kitiyle belirlendiği araştırmalarda; *Y. ruckeri* suşlarının 20, 22 ve 25°C'lerde inkübe edilme sürelerine (24, 48, 72 saat) bağlı olarak elde edilen sonuçların, arjinin dihidrolaz üretimi, jelatin hidrolizi, voges proskauer reaksiyonu ve sorbitol fermentasyonu açısından farklılık gösterebileceği bildirilmiştir ^{19,29,31,32}. Yine bir çok araştırmacı, API 20 E ile teşhiste özellikle *Hafnia alvei* ile karıştırılma riskinin olduğunu belirtmişlerdir ^{1,4,8,9,19,29,31,32}. Yaptığımız çalışmada 22°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda *Y. ruckeri* suşları arasında arjinin dihidrolaz üretimi yönünden farklılık görülmezken, voges proskauer reaksiyonu, sorbitol fermentasyonu, sitrat kullanımı ve jelatin hidrolizi testlerinde bazı farklılıklar tespit edilmiştir. Sorbitol fermentasyonundaki farklılıklar, geleneksel mikrobiyolojik testlerde belirlenen sonuçlara paralel olarak yalnızca serotip 2 suşlarında görülmüştür. Ancak sitrat kullanımı negatif (1, 10, 11, 16 ve 17 nolu izolatlar), voges proskauer reaksiyonu pozitif (2, 6, 8, 14 ve 19 nolu izolatlar) ve jelatin hidrolizi negatif (4, 5, 9, 13 ve 20 nolu izolatlar) olarak sonuç veren suşlar, geleneksel mikrobiyolojik testlerden farklılık göstermiştir. Candan ve Yazıcı ¹⁹ *Y. ruckeri*'nin API 20 E testiyle teşhis edilmesinde en uygun sıcaklık ve zamanı belirlemek amacıyla 15 *Y. ruckeri* suşuyla çalıştıkları araştırmada 22°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda, jelatin hidrolizi negatif (2 izolat), voges proskauer reaksiyonu pozitif (9 izolat), sitrat

kullanımı negatif (2 izolat) sonuçlar veren suşlar tespit etmişlerdir. API 20 E testiyle ilgili araştırma sonuçlarımızda, geleneksel mikrobiyolojik testlerden farklı olarak sitrat kullanımı, voges proskauer reaksiyonu ve jelatin hidrolizi testlerinde farklılıklar görülmesi, bu konuda çalışan diğer araştırmacıların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir ^{4,9,19,33-36}.

Bir çok araştırmacı tarafından API 20E ile yapılan identifikasyonlarda *Y. ruckeri* ile *Hafnia alvei*'nin karışabildiği bildirilmesine karşın, *Y. ruckeri* suşlarının 37°C'de ürettiğinde hareketsiz, β - galaktosidaz, Jelatin hidrolizi, pozitif, Ramnoz, Arabinoz negatif sonuç verirken *H. alvei* bakterisinin ise 37°C'de üretildiğinde hareketli, β - galaktosidaz, Jelatin hidrolizi negatif, Ramnoz, Arabinoz pozitif sonuç verdiği görülmektedir ^{1,31,37}. Ayrıca *Y. ruckeri* SWM ve ROD selektif besiyerlerinde oluşturdukları özel koloni morfolojileri ile diğer bakterilerden kolayca ayırt edilebilmektedir.

Y. ruckeri'nin serotipik şeması, yersiniozisin ilk ortaya çıkışından bu yana yeni antiserumların çıkarılması ^{11,16,17,38} veya yeni antijenik şemaların oluşturulmasıyla ^{18,22,39-41} sürekli değişime uğramıştır. Bütün bu çalışmalar *Yersinia ruckeri*'nin serolojisi ve antijenik özelliklerinin karışık bir yapı gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak ülkemizin 7 farklı coğrafik bölgesindeki gökkuşağı alabalık işletmelerinden izole edilmiş olan *Y. ruckeri* suşlarının fenotipik ve serolojik özelliklerinin incelenmiş olduğu bu çalışmada; *Y. ruckeri* suşlarının fenotipik ve serolojik özelliklerinin çok benzer bir karakter gösterdiği ortaya konulmuştur. *Y. ruckeri* suşlarının API 20 E hızlı teşhis kitiyle teşhisi sırasında Jelatin hidrolizi, VP ve Sitrat kullanımı testlerinde oluşabilecek hatalı sonuçların önüne geçmek için klasik metotlarla mukayeseli çalışmanın yararlı olacağı görülmüştür. SWM ve ROD besiyerleri *Y. ruckeri* suşlarının identifikasyonu ve kolonilerin saflıklarının kontrolünde başarılı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Referans serotipler kullanılarak (serotip 1 ve serotip 2) *Y. ruckeri* suşlarının mikroaglutinasyon testiyle serotiplendirilmesi yapılmış ve serotipler arasında antijenik yapıların birbirleriyle kros reaksiyon vermedikleri saptanmıştır. Ülkemizde de Avrupa ülkelerinde olduğu gibi serotip 1 suşunun yaygın olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın, ülkemizin 7 farklı coğrafik bölgesini kapsayan işletmelerden izole edilmiş olan *Y. ruckeri* suşlarıyla çalışılmış olması nedeniyle, elde edilen araştırma sonuçları bundan sonraki zamanlarda *Y. ruckeri* bakterisiyle yapılacak çalışmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Austin B, Austin DA: Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish. 3rd (Revised) ed., p. 457, Praxis

Publishing, Chichester, UK, 1999.

2. Plumb JA: Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Culture Fishes Iowa State University Press, Ames, 328, Iowa, 1999.

3. Altun S: *Yersinia ruckeri* suşlarının bazı antijenik ve fenotipik özelliklerinin incelenmesi. *Doktora Tezi*. Süleyman Demirel Univ Fen Bil Enst, Isparta, 2001.

4. Tobbac E: Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Doctor in Veterinary Sciences (PhD). Faculty of Veterinary Medicine, 155, Ghent University, 2009.

5. Çağırğan H, Yürekli Türk O: First isolations of *Yersinia ruckeri* in Turkey. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 4, 1-10, 1991.

6. Timur G, Timur M: An outbreak of Enteric Redmouth Diseases in farmed Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 11 (5): 181-182, 1991.

7. Busch, RA: "Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*)" In, Anderson DP, Dorson M, Dubpurget P (Eds): Antigen of Fish Pathogens. pp. 201-223, Marcel Merieox, Lyon, 1982.

8. Buller NB: Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals. CABI Publishing, U.K., 2004.

9. Popovic NT, Coz-Rakovac R, Strunjak-Perovic I: Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: A review. *Vet Med*, 52 (2): 49-53, 2007.

10. Schill WB, Phleph SR, Pyle SW: Multilocus electrophoretic assessment of the genetic structure and diversity of *Yersinia ruckeri*. *Appl Environ Microbiol*, 48, 975-979, 1984.

11. Stevenson RMW, Airdrie DW: Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. *J Fish Dis*, 7, 247-254, 1984.

12. Horne MT, Barnes AC: Enteric redmouth disease. In, Woo, PTK, Bruno DW (Eds): Fish Diseases and Disorders, Vol. 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections. pp.455-477, CABI Publishing, 1999.

13. Ross AJ, Rucker RR, Ewing W: Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Microbiol*, 12, 763-770, 1966.

14. Bullock GL, Shotts EB, Starlipier C: Biochemical, serological and virulence studies with *Yersinia ruckeri*. *Proc. Fifth. Ann. FHS/AFS Workshop*, Starkville, MS, 53-54, 1981.

15. Cipriano RC, Schill, WB, Pyle JM, Horner: An epizootic in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by a sorbitol - positive serovar II strain of *Yersinia ruckeri*. *J Wildl Dis*, 22, 488-492, 1986.

16. Bullock, GL, Stuckey, HM, Shotts, EB: Enteric redmouth bacterium: Comparison of isolates from different geographic areas. *J Fish Dis*, 1, 351- 356, 1978.

17. Daly JG, Lindvik B, Stevenson RMW: Serological heterogeneity of recent isolates of *Yersinia ruckeri* from Ontario and British Colombia. *Dis Aquat Organ*, 1, 151-153, 1986.

18. Romalde JL, Magarinos B, Barja JL, Toranzo AE: Antigenic and molecular characterisation of *Yersinia ruckeri*. Proposal for a new intraspecies classification system. *Syst Appl Microbiol*, 16, 411-419, 1993.

19. Candan A, Yazıcı M: Determination of time and temperature correlation when using API 20 E system diagnose *Yersinia ruckeri*. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 30, 109-113, 2000.

20. Waltman WD, Shotts EB: A medium for the isolation and

- differentiation of *Yersinia ruckeri*. *Can J Fish Aquat Sci*, 41, 804-808, 1984.
- 21. Rodgers JC:** Development of selective-differential medium for the isolation of *Y. ruckeri* and its application in epidemiological studies. *J Fish Dis*, 15, 243-254, 1992.
- 22. Davies RL, Frerichs GN:** Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *J Fish Dis*, 12, 357-365, 1989.
- 23. Kubilay A, Altun S, Didinen BI, Ekici S, Diler Ö:** Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* izalasyonu. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (5): 709-715, 2009.
- 24. Roberson BS:** Bacterial Agglutination. In, Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, Van Muiswinkel WB, Eds): Techniques in Fish Immunology. pp.81-87. CT: SOS Publication, Fair Haven, USA, 1990.
- 25. Cossarini-Dunier M:** Secondary response of rainbow trout to DNP-haemocyanin and *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, 52, 81-86, 1986.
- 26. Olesen NJ:** Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterins by ELISA and passive immunization. *J Appl Ichthyol*, 7, 36-43, 1991.
- 27. Lillehaug A:** Oral immunisation of Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis with vaccines protected against digressive degradation, *J Fish Dis*, 12 (6): 579-584, 1989.
- 28. Cossarini-Dunier M:** Protection against enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterin. *J Fish Dis*, 9, 27-33, 1986.
- 29. Davies RI, Frerichs GN:** Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *J Fish Dis*, 12, 357-365, 1989.
- 30. Savaşer S, Diler Ö:** Enterik kızılbaş hastalığı etkeni *Yersinia ruckeri* suşlarının morfolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerinde bir araştırma. *Akdeniz Balıkçılık Kongresi*, 9-11 Nisan, s. 391-405, İzmir, 1997.
- 31. Santos Y, Romalde JL, Bandin I, Magarinos B, Nunez S, Barja JL, Toranzo AE:** Usefulness of the API 20 E system for the identification of bacterial fish pathogens, *Aquaculture*, 116, 111-120, 1993.
- 32. Romalde JL, Toranzo AE:** Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the enteric Redmouth disease. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 11 (4): 147-149, 1991.
- 33. Frerichs GN, Stewart JA, Collins RO:** Atypical infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with *Yersinia ruckeri*, *J Fish Dis*, 8, 383-387, 1985.
- 34. Rintamaki P, Voltanen ET, Frerichs GN:** Occurrence of *Y. ruckeri* infection in farmed whitefish, *Coregonus peled* Gmelin and *C. muksun* Pallas, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Northern Finland. *J Fish Dis*, 9, 137-140, 1986.
- 35. Dear G:** *Yersinia ruckeri* isolated from Atlantic salmon in Scotland. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 8 (2): 18-19, 1988.
- 36. Petrie J, Bruno DW, Hastings TS:** Isolation of *Yersinia ruckeri* from wild, Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 16, 83-84, 1996.
- 37. Carson J, Wilson T:** Yersiniosis in Fish. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure, 1-12, 2002.
- 38. O'Leary PJ, Rohovec JS, Fryer JL:** A further characterisation of *Yersinia ruckeri* (enteric redmouth bacterium). *Fish Pathol*, 14, 71-78, 1979.
- 39. Pyle SW, Schill WB:** Rapid serological analysis of bacterial lipopolysaccharides by electrotransfer to nitrocellulose. *J Immunol Methods*, 85, 371-382, 1985.
- 40. Pyle SW, Ruppenthal T, Cipriano RC, Shotts EB:** Further characterisation of biochemical and serological characteristic of *Yersinia ruckeri* from different geographic areas. *Microbios Letters*, 95, 87-93, 1987.
- 41. Davies RL:** O serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates. *Vet Microbiol*, 22, 299-307, 1990.